

편집순서 1

<p data-bbox="261 1317 469 1435">주 의 (편집순서 8)</p>	<p data-bbox="549 472 576 707">2 0 0 6 - 0 1 1 4 4</p> <p data-bbox="549 801 576 1173">특수유용동물의 체세포복제기술개발</p> <p data-bbox="549 1563 576 1731">교육과학기술부</p>	<p data-bbox="635 472 1331 499">보안과제(), 일반과제(○) 과제번호 2006-01144</p> <p data-bbox="756 622 1299 757">미래기반기술사업 (특수유용동물 복제사업)</p> <p data-bbox="647 779 1410 853">(Development of Somatic Cell Nuclear transfer technology in Special Usefulness Animals)</p> <p data-bbox="916 1283 1139 1335">경상대학교</p> <p data-bbox="799 1592 1251 1644">교육과학기술부</p>
---	---	--

과제고유번호	2006-011 44	해 당 단 계 연 구 기 간	2008.4 ~ 2011.3	단 계 구 분	3/2
연구사업명	중사업명	미래기반기술개발사업			
	세부사업명	바이오·의료기술개발사업			
연구과제명	대과제명	특수유용동물 복제사업			
	세부과제명	특수유용동물의 체세포복제기술 개발			
연구책임자	공 일 근	해당단계 참 여 연구원수	총 : 45명 내부 : 15명 외부 : 30명	해당단계 연 구 비	정부 : 659,000천원 기업 : 23,000천원 계 : 682,000천 원
		총연구기간 참 여 연구원수	총 : 143명 내부 : 16명 외부 : 127명	총연구비	정부 : 2,199,000천 원 기업 : 69,000 천원 계 : 2,268,000천 원
연구기관명 및 소속부서명	경상대학교 축산전공		참여기업명	SNP Genetics, INC.,	
국제공동연구 위탁연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서면수	238

- 체세포 핵이식기술에 의해 복제된 특수유용 복제동물 및 재 복제 개체들의 복제여부 확인 및 복제 동물의 유전적 이상 가능성 규명하였다.
- 체세포복제기술을 활용한 복제고양이의 생산은 다양한 고양이과 동물의 복제 가능성을 제시하였고 실제 형질전환 복제동물 생산에 직접 활용될 수 있는 기반기술임을 증명하였다.
- 외래유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 형질전환복제 고양이·개를 생산 함으로써 형질전환복제개의 실용화가 가능성을 시사하였다.
- 확립된 체세포복제 기술을 이용하여 생산한 수컷 RFP 형질전환 복제고양이의 생식능력을 확인하고 유전형질의 유전가능성 검증 및 산자를 생산하여 형질전환 복제고양이의 대량 생산가능성을 제시하였다.
- 복제견 생산 효율 향상 및 형질전환복제개 생산 기술을 확립하였다.
- 개 복제를 위한 체세포 핵이식 표준 프로토콜을 제시하고, 난자공여견과 대리모의 선정 기준을 제시함으로써 개 복제 효율 향상에 일조하였다.
- 개 복제기술의 사업화 가능성을 제시하고, 고부가가치 유용견에 적용 및 실용화 가능성을 보여주었다.
- 이종간 배아의 미세소관 및 리프로그래밍/리모델링에 대한 매카니즘을 확인하였다.
- 멸종위기종의 복원을 위하여 이속간의 복제기술의 다양한 가능성을 제시하였다.

본 연구결과를 통하여 최적의 복제기술을 이용하여 특수유용동물의 복제·생산기술의 확립, 인류복지를 위한 질환모델동물의 생산 및 산업화 그리고 멸종위기종의 복원을 위한 원천기반기술을 확보하였다.

색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	형질전환 복제동물, 고양이, 개, 유전적 이상, 리프로그래밍/리모델링, 멸종위기종
	영 어	RFP transgenic cloned cat, somatic cell nuclear transfer, cloned embryos, inter-genus nuclear transfer

제 출 문

교육과학기술부장관 귀하

이 보고서를 "특수유용동물 복제사업에 관한 연구"과제의 보고서로 제출합니다.

2011. 2. 25

주관연구기관명 : 경상대학교
주관연구책임자 : 공 일 근
연구원 : 조수진 외 14명
" :
" :
협동연구기관명 : 충북대학교
서울대학교
(주)SNP Genetics
협동연구책임자 : 김 남 형
김 대 용
김 령 효

편집순서 3

보고서 요약서

요 약 문

I. 제 목

특수유용동물의 체세포복제기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 1) 체세포복제기술의 기술 향상의 필요성
- 2) 복제동물의 생산성 증대와 대량생산 방안 모색
- 3) 새로운 국익창출의 방안 및 국가브랜드 가치 향상
- 4) 원천기술기반 확보 및 복제강국으로의 자리매김
- 5) 고유전력 동물의 확보 및 농가의 생산력 향상
- 6) 세계적 멸종위기종의 증가 및 복원의 노력 요구
- 7) 인류의 삶의 질 향상 및 개선 필요성

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 1) 고양이의 초기 발생 기전 규명 및 체외성숙방법 개발
- 2) 개의 초기 발생 기전 규명 및 체외성숙방법 개발
- 3) 고양이 난자에 이중간 정자를 주입하였을 때 미세소관의 변화 및 epigenetic reprogramming/remodeling에 대한 조사
- 4) 고양이 정자를 이용한 이중간 배아의 epigenetic reprogramming / remodeling에 대한 조사
- 5) 확립된 유전자 표지자를 활용하여 복제 동물의 복제 여부 확인
- 6) 복제동물의 유전적 이상 부위를 분석함
- 7) Tetracycline을 이용하여 유전자 발현을 조절 가능한 virus vector 구축
- 8) RFP 형질전환 복제고양이의 생산과 유전자 전이 검증 및 생식능력 검증
- 9) 형질전환 복제고양이의 염색체 분석
- 10) 복제 효율 향상 및 RFP 형질전환 복제고양이 이용한 응용연구
- 11) 형질전환체세포 핵이식 기법의 확립 및 형질전환복제개 생산
- 12) 유용견 복제 및 노령견 복제 생산 연구

- 13) 체세포 복제개 생산 효율 향상을 통한 표준 프로토콜 제시
- 14) 이속간 복제수정란 생산 연구

IV. 연구개발결과

- 1) 고양이의 초기 발생 기전 규명 및 체외성숙방법 개발
- 2) 개의 초기 발생 기전 규명 및 체외성숙방법 개발
- 3) 고양이 난자에 이중간 정자를 주입하였을 때 미세소관의 변화 및 epigenetic reprogramming/remodeling에 대한 조사
- 4) 고양이 정자를 이용한 이중간 배아의 epigenetic reprogramming / remodeling에 대한 조사
- 5) 확립된 유전자 표지자를 활용하여 복제 동물의 복제 여부 확인
- 6) 복제동물의 유전적 이상 부위를 분석함
- 7) Tetracycline을 이용하여 유전자 발현을 조절 가능한 virus vector 구축
- 8) RFP 형질전환 복제고양이의 생산과 유전자 전이 검증 및 생식능력 검증
- 9) 형질전환 복제고양이의 염색체 분석
- 10) 복제 효율 향상 및 RFP 형질전환 복제고양이 이용한 응용연구
- 11) 형질전환체세포 핵이식 기법의 확립 및 형질전환복제개 생산
- 12) 유용견 복제 및 노령견 복제 생산 연구
- 13) 체세포 복제개 생산 효율 향상을 통한 표준 프로토콜 제시
- 14) 이속간 복제수정란 생산 연구

V. 연구개발결과의 활용계획

- 1) 복제동물생산의 향상과 안정적이고 효율적인 복제동물의 생산기술을 확보
- 2) 외래유용유전자의 도입을 통하여 biomarker 혹은 bioreactor를 생산하여 산업화 모색
- 3) 복제의 문제점을 marker를 이용하여 신속한 발견 및 복제동물의 유전적 질병의 발병을 근본적으로 차단
- 4) 복제 향상을 위한 기준을 제시하여 세계 유일 기술을 보유하고 있는 선진 국가로서의 우위 선점
- 5) 형질전환 복제기술을 활용하여 인간 질환 모델을 생산하여 질환치료 및 세포치료 가능성을 검증
- 6) 이속간의 복제기술을 확립하여 멸종 위기종의 복원가능성을 제시

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

- The confirmation of identification of cloned animals and re-cloned animals by somatic cell nuclear transfer, and possibility of genetic abnormality of cloned animals were found out.
- The production of cloned and transgenic cloned cats using somatic cell nuclear transfer technique was presented the possibility of cloning of various feline species and proofed the basic techniques for application of transgenic cloned animal production.
- The exogenous gene can be control the expression in the transgenic cat and dog, and so the possibility of practical use was presented.
- The reproductive ability of RFP TG male cat that was produced using somatic cell nuclear transfer technique was confirmed and germ line transmission also was evaluated of F1 offspring, and so suggested mass production system of transgenic cloned cat and dog.
- The efficiency of cloned dog production was improved and the production technique of transgenic cloned dog was established.
- The protocol of somatic cell nuclear transfer for cloned dog and donor dog and recipient dog's selection criteria was presented and so improved an efficiency of dog cloning.
- The possibility of business marketing of dog cloning was presented and so suggested the possibility of application in high price and useful dog.
- Confirmation of mechanisms of microtubule of inter cloned embryo and reprogramming/remodelling.
- Suggestion of various possibility of inter-genus cloning technique for endangered species restoration.

. The somatic cell nuclear transfer system using optimal cloning technique was established, and production and industrial application of disease model animal and basic research technique for restoration of endangered animal species was obtained from this study.

C O N T E N T S

I. Title

Development of Somatic Cell Nuclear transfer technology in Special Usefulness Animals

II. The purpose of the study

- 1) Necessity the improvement of somatic cell nuclear transfer technique
- 2) Groping the production efficiency of cloned animal and mass production methods
- 3) New scheme for making of national interests and improve of national brand value
- 4) Obtain the basic technology and establish the strong national for animal cloning
- 5) Securement of high genetic animal and improvement of farm's production potential
- 6) Requirement of restoration and increase of endengered animal species in the world
- 7) Necessity of imrpovement of development of living quality in the mankind

III. The contents of the study

- 1) Cat oocyte meiotic maturation and exploration of in vitro maturation method
- 2) Dog oocyte meiotic maturation and Exploration of in vitro maturation method
- 3) Epigenetic reprogramming/remodeling after interspecies ICSI in cat oocyte
- 4) Epigenetic reprogramming/remodeling after interspecies ICSI by cat sperm
- 5) Identical confirmation of cloned animal using microsatellite DNA
- 6) Analysis of genetic aberration site of cloned animals

- 7) Establishment of virus vector system to control gene expression using tetracycline
- 8) Verification of germ line transmission and reproductive ability of RFP TG cloned cat
- 9) Chromosome analysis of transgenic cloned cat
- 10) Research of cloning efficiency and applied research of RFP TG cat
- 11) Establishment of the SCNT technique using transgenic cell and transgenic cloned dog production
- 12) Studies on cloning of service dog and aged dog
- 13) Suggestion of the standard protocol for improvement of the efficiency of cloned dog production by SCNT
- 14) Research of inter-genus cloned embryo production

IV. Result

- 1) Cat oocyte meiotic maturation and exploration of in vitro maturation method
- 2) Dog oocyte meiotic maturation and exploration of in vitro
- 3) Epigenetic reprogramming/remodeling after interspecies ICSI in cat oocyte
- 4) Epigenetic reprogramming/remodeling after interspecies ICSI by cat sperm.
- 5) Identity confirmation of cloned animals using established microsatellite
- 6) Analysis of genetic aberration site of cloned animals
- 7) Establishment of virus vector system to control of gene expression of tetracycline
- 8) Verification of germ line transmission and reproductive ability of RFP TG cloned cat
- 9) Chromosome analysis of transgenic cloned cat
- 10) Improvement of cloning efficiency and applied research using RFP TG cat
- 11) Establishment of the SCNT technique using transgenic cell and Transgenic cloned dog production
- 12) The investigation into the production of service dog and the possibilities of cloned dog commercialization

- 13) Suggestion of the standard protocol for cloned dog production by SCNT
- 14) Research of inter-genus cloned embryo production

V. Application plan

We are going to work on several research items as follow,

1. HIV disease model production by co-operation with Prof. Eric M. Poeschla in Mayo Clinic of Medicine, Minesota, USA.
2. Retina differentiation in the retina damage model cat after RPC (Retina progenitor Cells) transplantation. If so, RPCs can be applied on therapy of human blind that were developed from retina damage.
3. Restoration and conseration of endangered species animal by somatic cell nuclear transfer technology and then obtain species diversity of endangered animals
4. Various disease model dogs by SCNT cloning technology, especially Alzheimer's disease and so on
5. Applied in bioreactor animal production for bio-new medicine and therapy

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

체세포복제 기반기술을 확립하여 특수유용복제동물의 생산과 이를 바탕으로 형질전환 복제동물을 대량생산하는 기술을 확립하는 노력을 기울이고 있다. 복제동물의 생산과정에서 발생할 수 있는 유전적 이상, 복제동물의 질환발생 원인규명 및 복제동물 및 형질전환 복제동물의 안정성과 효율성의 향상으로 체세포 복제기술을 활용한 다양한 응용연구에 이용하고자 한다. 많은 복제동물을 확보하여 복제동물의 유전질환, 발생과정의 질환발생 등에 대한 기초연구자료로 확보하여 확보된 기반기술로 형질전환 복제동물을 생산하고 실제 인간의 질환모델동물을 생산하여 인간질환의 치료 및 원인규명 등에 활용할 수 있을 것으로 기대가 된다. 특히 개와 고양이는 인간의 유전자질병과 아주 유사한 점이 많고 실제 인간의 유전질환을 연구할 수 있는 유전자가 개와 고양이에서 220여개와 130여개로 밝혀져 인간의 질환모델 동물로서 가장 중요한 의미를 가지고 있는 동물이다. 이러한 동물을 활용한 복제기술의 개발과 개발된 기반기술로 형질전환동물을 생산하여 대량생산 체제를 확립하여 인류복지의 향상하는 것이 궁극적인 목적이다.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 세계에서 2번째, 국내 최초로 체세포 복제고양이를 생산하는데 성공한 본 연구팀에서 보다 더 안정적이고 효율적인 기술을 정립하여 대량생산과 계대복제생산기술을 정립하고자 함
- 복제동물에서 다양한 질병과 유전적 이상이 발생하고 있는데, 이러한 연구조사가 극히 소수의 복제동물에서 한정적으로 이루어져 대량으로 생산된 복제고양이를 이용한 기초연구가 요구됨

- 고양이과 동물의 복제기술의 정립은 궁극적으로 고양이과 동물의 복제복원 가능성을 높일 수 있을 것임
- 본 연구과제의 성공은 고양이복제를 위한 일련의 기술로서 효율향상을 위하여 과배란 처리방법을 검토하여 외과적 방법으로 난소를 채취하거나 난자를 채취하여 핵이식에 공시하여, 체외성숙 배양체계의 확립함으로써 현재 체외성숙율 30-50%에서 타 가축에서의 70-80%로 제고시키고자 한다. 또한 핵이식방법에서 우선 윤등(2002)이 개발한 효과적인 탈핵방법을 고양이에 적용하여 탈핵을 시도하며 탈핵된 난자를 체세포를 주입하여 융합과 활성화를 실시한다. 핵이식 난자의 활성화는 난자의 발달과 산자생산에 미치는 영향이 크므로 다각적으로 검토되어야 한다. 또한 과배란 처리기술은 체내난자를 대량 채취하는 기술로써 난소 내 난자를 대량으로 확보할 수 있는 기술이다. 핵이식난자의 체외배양시스템을 확립하는 것은 고양이복제뿐만 아니라 고양이과 동물인 호랑이복제에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다.
- 체세포 복제의 기술은 가축개량 및 품종향상의 목적으로 시작되어 점점 부가가치가 높은 산업으로 흐름이 옮겨가고 있다. 치료용 단백질의 생산, 이종이식(Xenotransplantation), 질환 모델동물, 유전자-세포 치료 (Gene-cell therapy)에서 활용방안을 모색하고 있다. 특히 체세포 복제 기술은 형질전환 기술의 발전과 더불어 활용범위가 더욱 넓어지고 있다.
- 이 모든 분야에서의 활용 및 실현을 위해서 개 복제 기술의 효율성을 보다 높이기 위한 연구가 앞으로도 계속 되어야 하고, 복제 개의 정상성을 입증하는 연구도 필요하다. 또한 형질전환복제 동물 생산을 위한 기술 개발 및 형질전환복제 기술에 의한 성공적인 산자생산과, 형질전환체세포 복제동물의 정상성이 입증된다면 체세포 복제 기술은 무한한 가치를 창출해 낼 것이다. 본 연구팀은 체내 성숙난자를 이용한 세계 최초로, 유일하게 복제견 생산에 성공한 기술력을 바탕으로 단계별로 체계적인 연구를 수행해 나갈 것이다.
- 유전학적 및 해부생리학적으로 사람과 가장 유사한 원숭이 복제 가능 시 가장 이상적인 질환모델 개발이 가능하며 이종장기이식, 세포 치료 및 신약 개발 등 그 활용 범위가 광범위하고 고부가가치 창출 가능하므로 원숭이 복제 생산 관련 원천기술 개발 및 확보 필요
- 세계적으로 개, 소, 양, 고양이, 돼지 등의 복제 동물은 많이 개발되어 있으나, 사람과 유사한 영장류에서는 복제가 성공한 예가 없어 복제 원숭이 개발 시 원천기술 및 국제 특허확보 가능하며 기술 우위 선점

- o 영장류복제의 중요성을 인식하고 최근 피츠버그대학 등을 중심으로 원숭이 복제를 시도하여 배반포(blastocyst)까지 성공하였으나, 아직까지 복제를 성공한 연구팀은 없음
- o 난치병 치료 위한 줄기세포치료, 유전자치료 등의 재생의학 연구에 근간이 되는 환자 맞춤형 줄기세포 개발을 위하여 사람과 유사한 원숭이에서 복제 기술 개발 필요

2. 경제·산업적 측면

- o 체세포 복제고양이의 대량생산체계를 구축하여 생산된 복제고양이의 유전적 특성의 규명과 질병발생 및 수명과의 연관성 등을 규명함으로써 복제동물생산의 산업화에 기여
- o 대량복제동물의 생산기술의 확립으로 안정적인 동물복제산업의 기반을 확충하고 동물복제산업의 안정적 부가가치 창출이 가능
- o 반려동물의 복제수요가 형성되고 있어 점차 새로운 산업이 형성될 가능성이 있어 그에 대한 기반기술의 확보 가능
- o Shin 등(2002)은 난자 난구세포를 이용한 세계 최초의 체세포 복제고양이 CC(copy cat)를 생산에 성공한 연구결과 발표 후, 미국 전역을 거쳐 애완동물 복제 붐을 일으켰다. 미국의 언론기관인 NBC사에서 애완동물 복제를 원하는가? 라는 여론조사결과 애완동물 사육가의 32%가 자신의 애완동물을 복제하기를 원하고 있다는 흥미로운 여론 조사결과를 발표하였다
- o 애완견에서는 1997년 Texas A&M University의 Dr. Westusin 교수팀이 애완견 애호가로부터 600만 달러의 Missyplicity project를 수주하여 대중에 알려진 후 세계의 관심사가 되어왔다. 인간생활의 풍요와 함께 산업발달로 인한 인간성의 상실 등으로 반려동물로서 애완견 및 애완용 고양이의 사육두수는 폭발적으로 늘고 있으며, 현재 선진국에서만 약 1억 마리의 사육두수에 이르고 있을 뿐만 아니라 수조원에 이르는 시장규모를 놓고 연구결과를 선점하고자 하고 있다
- o 애완동물은 이미 동물의 개념을 초월한 반려동물인 가족의 개념으로 인식되고 있다. 그러나 애완동물의 수명은 사람보다 짧아 애완동물을 잃은 사육자는 애완동물의 복제를 원하고 있다. 이와 같이 많은 사육자들의 수요에 의해 애완동물의 복제기술의 개발이 요구되고 있으나 아직까지 애완용 고양이의 경우에서도 체세포를 이용한 복제고양이를 생산하지 못하고 있는 실정이다.

- o 생명공학기술을 이용한, 많은 포유동물에서 체외성숙, 체외수정 및 핵이식기법의 성공된 사례를 보이고 있으나, 현재 개의 경우에 있어서는 그렇지 못하다. 개의 난자 실험을 위한 조건이 매우 까다롭고 한정되어 있으며, 개의 자연 번식능력이 아주 강하기 때문에 개의 번식에 있어 많은 연구가 이루어 지지 않고 있다. 그러나 최근에 애완동물 중 가장 많은 분포를 차지하고 있는 개에 대한 관심이 많아지면서, 개의 복제에 큰 이목이 집중되고 있다. 이미 애완동물로는 처음으로 고양이도 상업적으로 복제 되었으며, 미국에서 수백만 달러의 기금으로 개 복제의 연구가 시도되었으나 성공하지 못하였다. 그러나 본 연구팀에서는 Snuppy의 성공적인 복제를 통해, 개과 동물의 체세포 복제 생산에 관한 기술을 개발하여, 그것의 효율성을 증대시키고 있다.
- o 개 난자는 매우 취약한 특성을 지녀, 체세포 복제를 위한 탈핵이 쉽지가 않다. 탈핵은 일반적으로 cytochalasin B를 처리하여 세포골격에 의한 세포질의 파괴를 억제한 후 미세조작에 의해 처리된다. 일반적으로 탈핵을 위하여 투명대를 절개한 후 곧바로 squeezing에 의해 극체 및 주변 세포질을 제거하는 방법과, 극체와 metaphase plate를 제거하는 aspiration 방법 등이 있다. 이들 방법은 모두 Hoechst 33342 등으로 난자를 형광 염색하여 탈핵여부를 판단하게 되며 이러한 과정을 통하여 최소한 양의 세포질제거 및 확실한 탈핵을 확인하게 된다.
- o 체세포 핵이식란을 적절한 시기에 대리모에 이식하기 위해 대리모를 관리하고 이식 후에도 임신유지에 필요한 관리를 지속하여야 한다. 복제동물의 생산에 있어서 난산의 위험을 줄이기 위해 대형견을 사용하기 때문에 소형견 등을 복제한 경우에는 안전하게 분만하기 위해 분만 시기에도 세심하고 체계적으로 관리해야 한다. 복제견이 태어난 직후부터 신생견 관리 및 정상성 확립을 위한 기초 자료 수집을 위해 체계적으로 24시간 케어체계가 마련되어 있다.
- o 우선 개과동물의 체세포 핵이식 복제수정란 생산에 있어 단계별 효율을 극대화할 수 있는 방법을 연구 개발하여 기존의 낮은 효율의 한계를 극복하고자 한다. 복제수정란 난관 내 이식방법 등을 개선하여 산자 생산 효율을 증대시키고자 한다. 또한 난자를 체외성숙 시킬 수 있는 시스템이 필요하다. 발정견으로부터 얻는 체내 성숙난자의 채취는 1 두당 10 여개 전후이며, 개는 연간 1-2회의 발정을 보이고 있어 실험에 제공할 체내유래 난자를 얻는 것은 많은 제약이 따른다. 그러므로 이러한 한계를 극복하기 위해서는 체외성숙 난자를 사용해야 하는 중요성이 제기된다.
- o 궁극적으로는 개에서 형질전환 기법을 이용한 질환모델 동물을 복제하여 난치병

극복을 위한 질병연구 및 신약개발에 필요한 실험동물개발 기술을 연구하여 실용화에 접근할 수 있을 것으로 기대된다.

- 본 연구과제에서 이러한 기술들이 개발된다면 복제 개 생산 및 비 설치류 개과동물의 질환모델동물 복제에 있어서 우리나라가 세계적으로 기술 우위를 점할 수 있으며 이러한 측면에서 본 연구의 중요성과 필요성이 제기된다.
- 원숭이 복제 기술을 기반으로 원천기술 확보하여 기술이전, 산업화 등 고부가가치 창출 가능
- 사람과 가장 유사한 원숭이 복제 질환모델 개발로 이종장기이식, 세포 치료 및 신약 개발 등에 활용함으로써 첨단의료산업의 활성화 및 고부가가치 발생
- 인간과 가장 가까운 원숭이 이용 복제 기술을 응용 질환모델 개발 시 이종장기 및 세포치료 연구에의 활용으로 잠재적 첨단의료시장 선점 필요
- 세계적으로 확대일로에 있는 바이오신약 개발 시장 선점을 위하여 원숭이 질환모델을 활용한 신약 전임상 평가 체계 구축 기반인 원숭이 복제 기술 개발 필요
- 21세기 바이오시대 먹거리 창출을 위한 지식 기반형 하이테크기술 개발의 일환으로 고부가가치를 창출할 수 있는 원숭이 복제 기술과 같은 원천기술 개발이 필수적임

3. 사회·문화적 측면

- 인간과 가장 밀접하게 살아온 동물인 개는, 현재는 가족의 구성원으로 생각되고 있으며, 뿐만 아니라 맹인 안내, 청각 도우미, 마약 탐지와 폭발물 탐지 등의 능력이 개발되어진 유용견의 생산으로 인류 발전에 많은 영향을 주어 왔다. 이런 반려동물의 복제는 자신이 좋아하는 동물이 평생 자신과 함께 바라는 마음에서 자신이 기르던 동물을 반복해서 복제 생산하고자 하는 가치를 지닌다. 반려동물의 영역에 체세포 복제 기법의 적용은 불임시술이나 질병으로 번식이 불가능한 동물의 복제 생산이 있을 수 있다. 특히 개와 같은 반려동물은 멸종위기에 놓인 개과동물의 번식 및 복제 연구를 하는데 없어서는 안 될 모델 동물이다. 멸종위기에 있는 동물은 그 수가 매우적어 번식 및 복제에 관한 어떠한 연구도 그 자신을 이용해서 하기는 매우 어렵다. 그러므로 번식 생리가 비슷하고 유전적 유사성이 강한 개의 체세포 복제에 관한 연구는 바로 개과동물의 복제 연구에 없어서는 안 될 중요한 근거를 제시한다.
- 최근 들어 국민소득이 일정한 수준 이상 오르게 된 이후, 과학적 경제적 발전과

더불어 환경의 피해에 대한 심각성이 증대되기 시작하였다. 성장 지향적인 산업화와 인간의 편리를 위한 개발의 부작용으로 생태계의 먹이 사슬이 흔들리고 새로운 혹은 변이 종이 생기는가 하면 기존의 종이 멸종 위기에 사라지는 동물의 피해를 직면해 있다. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (ICUN)에 의하면 멸종위협(Extinction threatens)에 놓인 동물은 전세계 존재하는 조류의 11%, 포유류의 25% 그리고 어류의 35%이며, 특히 한국늑대는 환경부 지정 제 1종 멸종위기 종이며, 국제적으로도 2종 멸종위기종으로 분류되어 있다. 뿐만 아니라, 우리사회의 상징과도 같은 호랑이는 이미 자연 상태에서는 보이지 않고 단지 국민들 가슴속에 우리 것 이라는 몽클한 감정으로만 남게 될 위기에 놓여 있다. 이러한 늑대나, 호랑이 그리고 여우와 같은 멸종위기동물의 복원과 이들의 보존을 위하여, 체세포 복제기법만이 대안으로 제시되고 있어 더욱더 체세포 복제기법의 효율적인 연구가 필요한 상황이다.

- 복제동물의 사망은 다양한 사망원인의 보고가 되고 있지만 극소수의 복제동물로부터의 결과는 신뢰성의 확보가 낮을 수 있어 복제동물과 계대복제동물을 대량생산하여 질병, 수명 및 유전적 이상여부를 조사함으로써 신뢰도 높은 결과를 도출함으로써 복제동물의 생산에 안정성을 확보할 것임
- 복제관련 법률 및 정책에 관련된 기반자료로 활용
- 애완동물은 이미 동물의 개념을 초월한 반려동물인 가족의 개념으로 인식되고 있다. 그러나 애완동물의 수명은 사람과 비교가 안 될 정도로 짧아 애완동물을 잃은 사육자는 애완동물의 복제를 원하고 있다. 이와 같이 많은 사육자들의 수요에 의해 애완동물의 복제기술의 개발이 요구되고 있다.
- 또한 현재 질환모델동물은 극히 일부의 경우를 제외하고는 설치류에서만 생산되어 전임상 실험에 사용되고 있으나 비설치류 특히 대동물(大動物)인 개에서 질환모델동물을 생산하여 질병연구에 이용된다면 인간과 유사한 크기(dimension)의 특성으로 각종 난치병 연구 및 신약개발에 지대한 영향을 미쳐 난치질환극복에 일조할 것이다. 개는 인간과 의사소통(communications)이 가능하며 복종성을 지니고 있는 등 다루기가 용이한 동물이다. 또한 유전 질병은 사람과 유사한 것이 많아 이러한 질병을 연구하는 모델 동물로 이용될 수 있다. 뿐만 아니라 개는 사람과 생리적으로 유사하며 질병의 형태와 임상적인 반응도 유사하다. 사람에서의 유전질병은 대개 여러 개의 유전적 요소와 환경적 요소가 복합적으로 작용하여 일어나는데 개는 사람과 환경적 요소를 공유하므로 질병 모델 동물로서 적합하다고 사료되어진다. 이러한 이유에서 본연구팀의 사람과 개에서의 유사한 질병에 대해

여 연구를 진행할 필요가 있으며, 효율적인 체세포복제기법을 개발하여 멸종위기에 처한 동물들의 보전과 복원에 크게 일조할 수 있을 것이다.

- 개는 인류와 오랫동안 애완동물은 개량 되어 왔고, 경제적 사회적 관점에서 볼때 수송용 견 (알래스카등지), 맹인견, 경주견, 경찰 및 군 목적견등 특수 목적으로 이용되어 국내의 식왔다. 즉 인간과 매우 친밀한 동물로 개에서 수정란 이식 및 복제동물이 생산된다면 그 자체로 쾌거일 뿐만 아니라, 세계적인 애완동물 산업으로 키울 수 있고, 견 문화에 대한 세계적인 반감을 불식시키는 데에도 일조를 할 것으로 기대된다.
- 샴(species *prionailurus bengalensis*)은 분류학적으로 집고양이(sub species *felis silvestris catus*)와 이속간으로 분류되어있으며 (<http://en.wikipedia.org/wiki/felidae>) 이들 간에 이속간 체세포 복제를 실시함으로써 멸종위기의 고양이과 동물의 복제생산 가능성을 제시하고자 한다.
- 특수유용 복제동물의 복제여부 확인을 위한 유전적 표지자 선별 및 실험 기법 확립과 이를 이용한 대량 생산 복제동물의 효율적 복제여부 확인과 유전역학연구를 통한 복제동물의 유전적 이상 가능성 규명
- 대량 복제 동물의 신속 정확한 복제여부 확인으로 안정적 동물 복제 산업의 기반을 확충하고 복제여부의 확인 및 신뢰성 제고를 통한 수요창출로 안정적 부가가치 창출이 가능
- 복제동물의 유전적 이상여부 분석으로 복제의 효율을 높이고, 대량 및 계대 복제를 통해 복제로 인해 일어날 수 있는 유전적 이상에 대한 최초의 연구를 수행함으로써 관련 연구의 활성화 기대할 수 있음
- 국내의 고양이 등의 유전적 표지자 개발과 기술숙련도 등이 미진하므로 복제여부의 과학적, 객관적, 신빙성 있는 기술 확립으로 향후 연구에 신뢰성 부여 및 기술적 체계 확립
- 복제동물의 노화, 중앙발생률 증가 등의 원인 규명 연구를 대량 복제와 이를 이용한 복제동물의 유전적 이상 가능성 분석으로 세계 최초로 밝힘으로써, 향후 동물복제에 기술적 기반이 마련
- 복제 동물의 유전정보 구축을 통해 복제동물 관리체계 확립과 복제동물의 유전적 이상 가능성에 대한 분석을 통해 복제동물의 빠른 노화와 질병 발생 문제점의 개선 방향을 제시함으로써 동물 보호 측면에서 긍정적인 기여 기대에 기여할 것으로 기대됨

- 복제 개체 샘플 확보와 특수 유용 복제 동물의 유전적 표지자 선별
- 복제 개체들이 복제 여부 확인과 고양이의 미토콘드리아 유전체 분석
- 복제 개체에서 생긴 유전자 이상 확인 loss of heterozygosity 확인과 체세포 핵이식 복제시 수명과 관련 있다고 알려진 telomere 길이를 측정
- 원숭이 복제 관련 원천기술 확보로 생명공학 분야 국제적 위상 강화 및 향상
- 원숭이 복제 연구로 환자 맞춤형 배아줄기세포 개발 연구의 활성화 유도도 난치병의 조기 정복의 기반 구축
- 복제 기술 이용 원숭이 질환모델 개발로 이종장기이식, 세포치료 등의 연구에 활용함으로써 의료 기술의 발전을 도모하고 난치병 극복을 통한 국민 복지 향상

제 2 장 국내외 기술개발 현황

* 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

1. 외국의 기술개발 현황

- 가. Bio-ART 회사는 이전의 Genetic Saving & Clone, Inc.로 현재에는 중국을 중심으로 애완동물 복제, 각종동물의 복제수정란 생산 및 판매 등을 준비하고 있으나 현재까지 개 복제에 성공하지는 못하였다.
- 나. The perPETuate 회사는 복제생산을 원하는 애완동물의 체세포를 저장해주고 있으며, 확실한 복제기술이 개발되면 상업화를 시도하고자 한다.
- 다. Lazon Bio Technologies 회사는 현재 [Global Genetics and Biologicals](#)사와 공동으로 체세포 동결보존서비스를 하고 있다. 동물번식보조기술의 서비스를 제공하면서 특히 조직배양, 동결보존, 복제, 세포은행 등을 제공하고 있다.
- 라. ALLERCA 회사는 세계 처음으로 hypoallergenic 고양이를 생산하고자 하며, 이는 알러지로 고양이를 키우지 못하는 애호가들에게 도움을 주고자한다. 현재 개발완료 시 우선 판매권을 주문받고 있으며 많은 주문이 쇄도하고 있다.
- 마. Mark E. Westhusin은 ATC(Advanced transgenesis and cloning) workshop에서 DD-RT-PCR방법을 사용하여 복제와 일반 blastocysts 세포를 연구하여, 2-5% 정도의 유전자발현의 차이를 확인하고, 그 중 하나의 유전자가 IGF-1임을 보고함.
- 바. 2004년 Li 등은 체세포 복제 소에서 배아 발달과 기관 분화와 관계된 8개 (PCAF, Xist, FGFR2, PDGFRa, FGF10, BMP4, Hsp70.1, VEGF) 유전자를 조사한 결과 유전자 발현 양상의 이상이 발견되었다고 보고함
- 사. 2003년 Han 등은 체세포 복제 배아에서 공여 체세포 핵의 재발생 단계에서 DNA methylation 양상의 차이가 관찰되었다고 보고함
- 아. 2004년 Schaetzlein 등은 쥐와 소의 배아연구에서 세포의 노화와 관련된 telomere는 초기 배아단계에서 배아 발생과 관계되며 telomerase의 활성이 이를 결정한다고 보고.
- 자. 2002년 텍사스 A&M 대학에서 세계 최초로 체세포 복제고양이 copy cat의 생산을 보고하여 애완동물 복제의 시대를 알림 (Shin et al., 2002, Nature)
- 차. 태아 섬유아세포 유래 : (Kitiyant 등, 2003; Skrzyszowka 등 2002) 등은 고양이

태아 섬유아세포 유래 복제고양이 생산을 시도하였으나 복제산자의 생산에는 실패함

- 카. 난구세포 유래 : (Skrzyszowka 등, 2002; Shin 등, 2002)등은 난구세포를 이용하여 체세포복제를 시도한 결과, Skrzyszowka 등(2002)은 복제산자 생산은 실패하였으나, Shin 등(2002)은 난구세포 유래 세계최초 체세포 복제고양이 생산 보고함
- 타. 구강내막세포 유래 : Shin 등(2002)은 복제고양이 생산의 일환으로 난구세포와 구강내막세포를 이용하여 복제고양이 생산을 시도 하였으나 난구세포에서만 복제산자를 생산함
- 파. Gomez 등(2004)은 아프리카 야생고양이를 체세포 복제기술을 이용하여 생산 보고함
- 하. Lanza 등은 소의 난자 (*Bos taurus*)에 gaurus (*Bos frontalis*)의 체세포 이용하여 복제
- 거. 염소에서는 Loi 등이 Sheep (*Ovis aries*)의 난자를 이용하여 mouflons (*Ovis orientalis musimon*)을 복제
- 너. 현재 세계 어느 팀도 이속관계에 있는 삶의 복제에 성공한 경우가 없음
- 더. 최근 체세포 핵이식기술에 의한 애완 복제 견을 생산하겠다고 하는 바이오벤처는 몇 개가 있으나 성공 예는 없다. 또 몇몇 해외 연구기관에서 복제 메커니즘에 대한 연구를 하고 있다는 설이 있으나 체계적인 연구 보고는 없는 시정이다.
- 러. 개 복제에 관해서는 외국에서도 애완견 복제 사업의 중요성에 비추어 연구되고 있지만 아직 성공 되고 있지 않다. 그 이유는 개의 경우 배란 시 타 동물과는 달리 미성숙 상태에서 배란되고 있기 때문이다. 따라서 체계적인 지원을 받아 체외 성숙/ 수정 및 배양 과정 연구를 시작하여 복제 메커니즘에 관한 연구를 진행한다면, 개복제가 가능하리라 보고 있고, 이 분야에서 우리나라는 선도적인 위치를 차지 할 수 있을 것이다.
- 머. 현재 체세포 복제는 국내외적으로 활발히 연구되고 있고, 유전적 표지자를 이용한 복제 동물의 확인 방법 시도되고 있으나, 고양이, 개 등의 동물을 대량 복제하고 복제동물의 복제여부 확인 및 분석은 세계 최초로 시도되는 것임
- 버. 고양이, 개 등의 유전적 표지자는 현재 국외 연구결과인 유전자 정보 DB, 논문 등의 자료를 통해 확보 가능함. 국내의 고양이, 개 등의 유전적 표지자 개발은 미비한 실정이나 기존 발굴된 유전적 표지자의 활용으로 복제동물의 복제여부 확인은 충분히 가능할 것임
- 서. 유전적 이상, 염색체 변이 등의 복제동물이 지닌 문제점 등을 연구하여 빠른 노화, 중앙

발생확률 증가 등의 이상 원인을 규명하는 국외 연구결과가 있으나, 소수의 복제 동물을 대상으로 하는 연구이므로 본 연구의 대량 복제와 이를 이용한 복제동물의 유전적 이상 분석은 세계 최초로 시도되는 것이며, 복제동물을 이용한 통계분석 또한 가능할 것임

- 어. 미국에서 개의 복제를 위한 “Missy Project” 시작(1997년)
- 저. 이종간 핵이식을 통해 개의 체세포 복제를 시도하였으나 임신 23일 만에 유산하였으나 개 복제에 대한 가능성 제시 (Westhusin et al, J Reprod Fertil Suppl. 2001)
- 처. 야크와 개의 난구세포와 소 난자를 이용하여 이종 간 핵이식 대한 연구 (Murakami, Cloning Stem Cells, 2005)
- 커. Domestic sheep (*Ovis aries*)의 핵 제거 난자에 Argali (*Ovis ammon*)의 핵이식을 통해 배아를 형성하고 배아이식을 통해 임신을 성공시켰다. 이를 통해 xenogenic oocyte 를 이용해 멸종위기에 있는 동물의 섬유아세포부터 초기단계의 배아 및 임신단계의 가능성을 보고하였다.(White et al., Cloning, 1999)
- 터. 핵이식을 통해 멸종 위기 동물을 포함한 포유동물 수정란의 생산 효율 향상에 대해 소, 원숭이, 햄스터에서 연구 하였다. 핵이식 과정에서 최적화된 핵치환 방법 단계로서 여러 동물에서 핵제거 난자 및 핵치환 성공률을 높이는 방법을 연구하였으며 viral influenza hemagglutinin fusion protein을 발현하는 chinese hamster ovary donor cell 을 사용하였다. 이러한 새로운 방법은 핵치환의 효율이 높음을 보고하였다 (Dominko et al., Cloning, 1999)
- 퍼. 소 난자를 이용하여 멸종위기 동물인 *Bos gaurus*를 복원, 분만 성공하였으나 분만 직후 2일 만에 폐사하였다. 하지만 이는 복제동물이기 때문이 아닌 바이러스 감염에 의한 것으로 보고하였다 (Vogel et al, Science, 2001)
- 허. 죽은 멸종위기 동물(mouflon)의 과립막세포를 이용하여 유전적으로 가까운 가축인 양의 난자에 핵이식 하여 배반포를 생산하여 두 마리의 대리모에게서 임신 성공하였으며 그 중 한 마리에서 mouflon의 복원 생산 성공을 성공하였다 (Loi et al, Nat. Biotechnology, 2001)
- 고. 고양이와 토끼 난자를 이용하여 Panda의 복원연구를 하였다. mouse와 giant panda로부터 얻은 분열 정지상태가 아닌 cell은 핵 제거 토끼 난자에 핵이식 하였을 경우 분화가 일어나며 초기 배아로 발달 가능함을 보고하였다 (Chen et al, Shi Yan Sheng Wu Xue Bao, 2002)

- 노. 멸종위기에 처한 Bangteng의 복원을 위해 핵 제거된 소의 난자에 이종간 핵이식을 통해 Banteng (*Bos javanicus*)의 배아 형성과 임신 성공을 보고하였다. bovine cytoplasm은 bangteng karyoplast의 난할을 유지하며 exotic bovid에서 핵을 배반포 배아 단계까지 이루도록 재프로그래밍 할 수 있음을 보고하였다 (Sansinena et al., *Theriogenology*, 2005)
- 도. Domestic cat의 핵 제거 난자에 African Wildcat(*Felis silvestris lybica*)의 섬유아세포를 융합하여 최초의 야생 육식 동물의 복원에 성공하였음을 보고하였다 (Gomez et al., *Cloning Stem Cells*, 2004)
- 로. 멸종 위기 동물인 takin(*Budorcas taxicolor*)의 체세포를 이용하여 소의 난자에 이종간 핵이식을 통해 복제 연구하였으며, 야크 (*Bos grunniens*)와 소에서의 배반포 형성을 비교 보고하였다. 연구 결과 intra-species cloning이 interspecies cloning보다 높은 efficacy를 보여주며 공여세포의 종이 수용 난포에 가까울수록 배반포 발달률이 높아짐을 보고하였다(Li et al., *Mol Reprod*, 2005)
- 모. Domestic ferret (*Mustela putorius furo*)에서의 배아이식 효율에 미치는 factor에 대한 연구와 이를 통해 관련 멸종위기 동물의 복원연구에 응용에 대해 연구하였다. 난관 또는 자궁에 zygote와 배반포를 이식한 결과 배반포를 한쪽 자궁에 이식한 결과가 태아 형성률이 높았다. 이 연구는 ferret의 번식 및 사람의 질 환모델 연구에 도움이 될 것으로 보고하였다 (Li et al, *Theriogenology*, 2006)
- 보. 배란 전 호르몬의 분비가 난자의 성숙률에 미치는 영향에 대해 연구하였다. progesterone 이나 estradiol의 배지 내 추가는 양질 난자의 시험관내 성숙에 어떠한 영향도 미치지 못했으며 생체내의 호르몬 환경도 시험관내 성숙된 난자의 성숙을 일으키지 못하였다고 보고하였다 (Hewitt et al., *J Reprod Fertil Suppl.*, 1997)
- 소. 개 난자의 시험관내 성숙에 BSA, gonadotrophin이 미치는 영향에 대해 연구하였다. BSA 첨가 시 가장 meiotic resumption이 좋았고 hST 첨가 시 제2중기로의 이행에 좋은 영향을 끼쳤다. 하지만 어떠한 호르몬이나 단백질의 첨가로도 개 난자의 시험관내 완벽한 성숙은 이루지 못했음을 보고하였다 (Rodrigues et al., *Reprod Domest Anim.*, 2003)
- 오. 개의 난자와 분리한 개 난관을 함께 배양하여 개 체외 난자의 배양에 관해 연구 하였으며 감수분열에 걸리는 시간과 개 난자의 생존률을 측정하였다. 이를 통해 난관이 난자와 긴밀한 생리학적 상호 작용을 통해 난자의 성숙에 긍정적인 영향을 미쳤음을 보고하였다 (Luvoni et al, *Reprod Domest Anim.*, 2003)

- 조. 개 난자에 Progesterone 첨가가 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 배양액에 Progesterone의 첨가는 성숙단계 중이거나 성숙 전의 감수분열 정지 단계 난자의 시험관내 성숙률을 높이지 못했다. 하지만 발정주기가 시험관내 난자 성숙을 위한 난자의 채취에 중요한 요소임을 보고하였다 (Willingham-Rocky et al, *Reproduction*, 2003)
- 초. Human somatotropin(hST)의 첨가가 난자의 핵성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. TCM-199에 hST와 estradiol의 첨가는 개 난자의 핵과 세포질 성숙을 향상시켰음을 보고하였다 (Rodrigues et al, *Mol Reprod Dev.*, 2003)
- 코. 개과 동물 난자의 체외성숙을 위한 배양 방법을 연구하였다. 시험관내 성숙 과정 중 물질을 첨가함으로써 배양환경을 바꾸어 주어 세포 내부의 regulatory molecule의 발현정도를 바꾸거나 순차적으로 다른 배양시스템을 이용하여 개과 동물 난자의 생존률을 높임으로서 난자의 완벽한 성숙을 이루기 위해 연구하였다. 이 논문에서는 개와 고양이 난자의 발달 연구에서 최근 진보된 점에 대해 review하였다 (Luvoni GC, *Theriogenology*, 2006)
- 토. Epidermal growth factor(EGF)와 follitropin, steroids, growth factor 등 다양한 호르몬의 첨가가 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 이 연구를 통해 EGF와 FSH, LH를 함께 첨가하였을 경우에 배양한 개 난자의 granulosa/cumulus expansion은 향상 시켰으나 제1중기, 제2중기에 도달한 무발정기, 초기 난포기 난자에는 아무런 영향을 주지 않았음을 보고하였다 (Bolamba D, *Theriogenology*, 2006)
- 포. Human chorionic gonadotrophin(hCG)의 첨가가 난소자궁절제술을 통해 얻은 감수분열중인 개 난자의 시험관내 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 실험 결과 배양시간에 따라 감수분열이 향상되었는데 hCG에 96시간동안 배양 후 가장 높은 비율로 제2중기의 난자가 관찰되었다 (De los Reyes M, *Theriogenology*, 2005)
- 호. 개 난자의 시험관내 수정 후 성숙을 위한 최적의 배양 시간에 대해 연구하였다. 난포기의 난자에서 직경 110 μm 이상의 난자를 채취하여 실험을 하여 완전한 핵 성숙은 시험관내 배양 후 72시간 후 이루어짐을 보고하였다. 하지만 시험관내 수정한 개 난자의 최적 성숙 기간은 난자의 최대 성숙률에 다다른 기간에 따라 시간이 달라질 수 있음을 보고하였다 (Otoi et al., *Reprod Nutr Dev.*, 2004)
- 구. 개는 연구를 목적으로 하거나 멸종 위기의 개과동물의 번식을 위해 유용한

model동물이 될 수 있다. 하지만 시험관내 난자 성숙률이 다른 포유동물에 비해 매우 낮아 시험관내 배아형성, 냉동보존 또는 핵이식 등과 같은 번식생명공학의 발전에 있어서 한계점이 되고 있다. 이 논문에서는 개 난자의 시험관내 성숙에 영향을 주는 요소들에 대해 고찰 하고 앞으로 연구의 focus에 대해 논하였다 (Luvoni et al., Theriogenology, 2005)

- 누. Theophylline을 첨가가 epididymal spermatozoa의 미성숙 난자 내 침투에 미치는 영향에 대해 연구하였다. theophylline의 첨가는 정자의 침투에 유의적인 차이점을 보이지 않았으며 theophylline의 존재 여부에 따라 개 별로 정자의 난자 침투는 매우 다양한 결과를 보여주었음을 보고하였다 (Hishinuma et al, J Vet Med Sci., 2004)
- 두. 발정 휴지기 난자를 다양한 조성의 배지 내에서 배양하여 체외 성숙률에 영향을 주는 요소에 대해 연구하였다. FBS, EGF, insulin, transferrin, selenium등 다양한 조성으로 연구하였으나 난자의 체외 성숙에 유의적으로 영향을 미치지 못하였다. insulin은 제1중기에서 제2중기로 핵 성숙에 긍정적인 영향을 미쳤으나 통계적으로 유의성을 가지지 못했음을 보고하였다 (Rota A, Reprod Nutr Dev., 2004)
- 루. 시험관 내 성숙, 시험관 내 수정한 개 난자의 estradiol과 human somatotropin (hST)의 첨가에 따른 배아 발달에 대해 연구하였다. TCM-199에 1ug/ml의 hST와 20ug/ml의 estradiol의 첨가가 개 난자의 핵과 세포질 성숙을 향상시켰다. 시험관내 수정된 난자에서 전핵 단계는 암개의 발정 단계에 영향을 받지만 난할은 공여 난자의 성주기와 독립적임을 보고하였다 (Rodrigues et al., Mol Reprod Dev., 2004)
- 무. 각기 다른 생식 주기에서 개의 난자를 채취하고 thiol compound가 시험관 내 성숙에 어떤 영향을 끼치는지 연구하였다. follicular stage에서는 cysteine과 cysteamine이 각각 control에 비해 metaphase II로의 발달 비율이 높았고, 각각 0.5mM, 100uM에서 개 난자내의 GSH level 또한 증가하였다(Hosseini et al., Mol Reprod Dev., 2007)
- 부. 신선하고 냉각된 동일종의 정액으로 수정된 개 난자의 시험관 내 난할에 미치는 성숙 배지의 영향에 대해 연구하였다. 난할 과정에 있어서 성숙 배지가 미치는 영향은 거의 없었으며, 난할과정과 난구 세포의 확장의 관련성도 보이지 않았다. 다정자 수정의 비율 또한 차이가 없었다(Rodrigues et al., Zygote, 2007)

- 수. 개 난자의 시험관 내 성숙에 pyruvate와 glutamine의 대사 패턴 및 요구도에 대해 연구하였다. pyruvate와 glutamine이 반드시 필요한 것은 아니나 다른 개 과 동물과 다른 대사 패턴을 보이고 glutamine이 덜 산화되었다 (Songsasen et al., Mol Reprod Dev., 2007)
- 우. 개 난자의 IVM, IVF, IVC에 있어서 Mouse embryonic fibroblasts(MEF), Canine embryonic fibroblasts(CEF)가 미치는 영향을 연구하였다. 대조군에 비해 MEF와 CEF를 처치한 군에서 난할 비율이 더욱 높았으며 CEF와 함께 배양한 배아는 16 cell까지 발달하였고 MEF와 함께 배양한 배아는 morula까지 발달하였다 (Hatoya et al., Theriogenology, 2006)
- 주. 실험동물과 산업동물에서의 유전자 적중 동물에 관해 연구하였다. 유전자 재조합법을 이용하여 원하는 유전자를 발현하는 동물을 생산하였다. 현재의 기술은 재조합 유전자를 접합자의 수컷 전핵에 넣는 방법으로 실험동물과 산업동물에서 이용가능하다. 이의 응용을 위해서는 산업동물에서 다양한 유전자를 밝혀내고 발달, 분자생리학에 대한 완벽한 이해를 필요로 함을 보고하였다 (Wagner et al., J Anim Sci., 1985)
- 추. 류마토스관절염(rheumatoid arthritis)의 동물 모델로서 유전자 적중된 산업동물에 대해 연구하였다. 난자의 핵에 미세주입법을 이용함으로써 외부 유전자를 주입한 유전자 적중 산업 동물을 만들 수 있다. 이러한 동물은 사람에서의 류마토스관절염과 매우 유사하며 질병모델로 이용할 수 있을 것으로 보고하였다 (Fischer et al., Med Hypotheses, 1992)
- 쿠. 유전자 적중된 산업동물을 이용하여 사람의 유전 질병 모델에 대해 연구 하였다. 앞으로 산업동물에서 유전자 적중 방법을 이용하여 생물의학 연구에 중요한 역할을 할 것으로 보고하였다 (Petters et al., Reprod Fertil Dev., 1994)
- 투. Farm animal에서 YAC transgenesis에 관해 연구하였다. 250kb YAC의 전핵 미세주입법을 이용하여 유전자 적중된 토끼를 생산하여 albino 표현형을 갱생시켰다. 이를 통해 약리학적으로 유용한 물질을 생산하거나 장기이식을 위한 이종장기의 생산에 YAC 유전자 적중 법이 이용될 것으로 보고하였다 (Brem et al., Mol Reprod Dev., 1996)
- 푸. 동물의 유전자 적중을 통해 protein C, factor IX, factor VIII, fibrinogen and hemoglobin등과 같은 사람 혈액 단백질의 생산을 연구하였다. 재조합 사람 혈액 단백질의 생산을 위해 유전자 적중된 산업동물의 사용이 증가될 것으로 보고하였다 (Lubon et al., Biotechnol Annu Rev., 1998)

- 후. 유전자 적중된 산업동물로부터 우유를 통해 Haemophilic factor의 생산에 대해 연구하였다. 돼지의 유전에서는 생물학적 활성을 가지고 반감기가 긴 물질을 얻었다. 또한 돼지에서는 경구, 기도 내, 피하, 근육 등 다른 경로를 통해 유용한 재조합 단백질을 다량 얻을 수 있을 것으로 보고하였다 (Van Cott et al., Haemophilia, 2004)
- 그. P347L 또는 P347S rhodopsin을 발현하는 transgenic pig에서 나이 별, 망막변성 단계별로 단일 rod photoreceptor의 빛에 대한 반응 변화에 관해 연구하였다. wild type rhodopsin 분자가 특정한 형태로 변형되면서 망막의 변성이 진행됨을 보고하였다(Kraft et al., Mol Vis., 2005)
- 느. insulin-like growth factor-I(IGF-I)를 유전 특이적으로 과발현 시킨 돼지의 생산에 관해 연구하였다. 이렇게 생산된 돼지는 우유 내 IGF-I과 IGFBP의 양이 증가되었으나 돼지의 산유량에는 영향을 끼치지 않았음을 보고하였다(Monaco et al., Transgenic Res., 2005)
- 드. 사람의 신경 퇴행성 질병의 치료 방법으로 돼지 태아 신경 세포의 사용을 위해 사람의 T cell 억압 분자인 CTLA4-Ig를 Transgenic expression 시킨 돼지 배아 신경 세포의 이종간 이식에 대해 연구하였다. 이 연구를 통해 유전자 적중 돼지로부터 얻은 신경 세포는 hCTLA4-Ig를 발현했으며 앞으로 이종간 신경 이식에 있어서 전임상단계 연구로 이용할 수 있을 것으로 보고하였다 (Martin et al., Transgenic Res., 2005)
- 르. 유전자 적중을 통한 질병저항 소의 생산에 대해 연구하였다. 유전상피세포에 lysostaphin을 발현하며 항미생물 단백질을 우유 중으로 발현하는 유전자 적중 젖소를 생산하였다. 이러한 유전자 적중 기술은 축산업에 중요한 동물에서 질병 문제를 해결하는 데 유용할 것으로 보고하였다 (Donovan et al., Transgenic Res., 2005)
- 므. 유전자 적중된 복제 송아지의 초기 care에 대해 연구하였다(Fecteau et al., Vet Clin North Am Food Anim Pract., 2005)
- 브. 유전자 적중을 통하여 Staphylococcus aureus에 의한 유방염 저항소에 대해 연구하였다. 유전자 적중을 통해 우유 중으로 lysostaphin을 농도별로 분비하도록 만든 소에서 적어도 3 μ g/ml lysostaphin이 분비되는 경우 포도상구균성 유방염의 감염이 예방됨을 보고하였다. 이를 통해 유전자 적중은 질병저항성을 증진시키는 유용한 방법이며 산업동물의 삶의 질을 향상시킬 수 있음을 보고하였다 (Wall RJ, Nat Biotechnol., 2005)

- 스. 개에서의 genomics를 인간 질병 연구에 응용에 대해 연구 하였다. 개에서의 질병은 사람 질병의 유전적 기초에 대한 이해를 높여주고 진단 방법과 치료에 대한 평가법의 향상에 기여함을 보고하였다(Mike et al., Brief Funct Genomic Proteomic, 2005)
- 으. 수정 시기에 세포에 결합하고 외부 DNA를 내부로 넣어 난자로 옮기는 정자의 내재적인 능력을 기초로 하는 Sperm-mediated gene transfer(SMGT)의 돼지에서 과정을 대동물 모델로 연구하였다. SMGT는 배아를 조작할 필요가 없으며 multigene transgenic pig을 만드는데 유용한 기술임을 보고하였다 (Lavitrano et al., Reprod Fertil Dev., 2006)
- 즈. hDAF transgenic pig의 신장을 anti-Gal 항체 중화 치료를 받은 baboon에의 이종간 장기 이식에 관해 연구하였다. 이 연구에서 transgenic pig의 신장을 항 Gal 항체가 중화된 baboon에 이종간 이식 시에 급성 체액성 이종간 이식 거부 반응과 연관되어 항non-Gal 항체가 유도 형성됨을 보고하였다(Chen et al., Transplantation., 2006)
- 츠. 1998년 마우스와 소의 복제가 성공하여, 복제동물의 재현이 가능해짐. 특히, 마우스의 성공은 양과 소의 긴 lifespan 때문에 연구진행이 어려웠던 체세포 핵의 초기화, imprinting에 관한 연구 및 세포의 발생 분화의 기전 규명에 공헌함
- 크. 원숭이 복제는 전세계적으로 많은 시도를 했지만 아직 성공하지 못했으며, 체외배양시 배반포까지 발달시키는 단계에 머물러 있음
- 트. 일본에서도 원숭이 ES세포가 확립되어 이 ES세포에 형광유전자를 주입시켜 핵치환에 의한 복제 원숭이 제작 시도하였으나 실패함

2. 국내 동향

- 가. 공 등(2004)은 고양이 태아세포, 피부 섬유아세포를 도나로 사용하여 복제고양이 생산에 성공하였음(Reproduction, 2005)
- 나. 이 등(2005)은 세계 최초로 체내 배란된 난자를 이용한 복제 개 생산을 성공하였음(Nature, 2005)
- 다. 공 등(2007)은 세계 최초로 RFP 형질전환 복제고양이를 생산을 성공하였음(BOR, 2008)
- 라. 김 등(2006)은 생리활성물질(EPO/TPO)을 생산하는 형질전환 복제돼지의 생산에 성

공하였음(Transgenic Res, 2006)

- 마. 김 등(2006)은 닭에서는 GFP 유전자 발현하는 형질전환 닭의 생산과 이들 유전자가 다음세대에 전이를 확인한 바 있음(FASEB, 2006)
- 바. 서울대 동물병원의 “세포치료 및 동물복제 클리닉”에서 유용견 복제의 상업화 시도가 진행되고 있음(2008)
- 사. 국내에서도 관세청의 마약탐지견 복제의 요구, 암 탐지견의 복제를 중심으로 사역견(service dogs)의 수요가 창출되는 상황임
- 아. 뇌과학 연구자, 신경외과 연구자를 중심으로 신경질환에 대한 개 모델의 관심과 복제 가능성에 대한 수요 요구가 있으나 현 기술상태에서는 작출이 어렵고 추가적인 연구를 통해 기술 진보되면 창출이 가능한 상황임
- 자. 이러한 연구결과와 정부의 강력한 경쟁력 확보를 위한 추진으로 국내의 BT분야 연구비가 증가되고 있을 뿐만 아니라 우수한 연구결과의 성과가 이루어지고 있음
- 차. 국내 바이오산업의 시장규모는 2000년에 약 1조원이었으며 연평균 25%의 성장률을 보이고 있어 2010년에는 그 규모가 약 9조 3천억원에 도달할 것으로 전망됨
- 카. 이와 같은 국내의 연구진행 상황에서 원천기술개발과 궁극적인 산업화가 가능한 기술개발에 지속적인 지원이 요구됨. 본 사업단에서도 2단계에서는 원천기술의 확보와 복제동물을 활용한 인간질환의 분석모델동물로 활용과 RFP 형질전환 복제고양이를 활용한 응용연구 및 특정질환 모델 개의 생산으로 연구결과의 산업화에 성공적인 모델을 제시하고자 함
- 타. 공 등 (2004)은 고양이 태아세포, 피부 섬유아세포를 사용하여 복제고양이 생산에 성공하였다고 보고하였고, 순천대 축산학과 및 서울대 수의학과에서 개 수정란 생산에 관한 박사학위 논문이 발표되고 있다
- 파. 순천대, 서울대에서 개 난자의 체외성숙 및 복제에 관련 석사학위논문과 충남대학교에서 박사 논문이 발표되고 있다
- 하. 결론적으로 개 난자 체외성숙에 관하여 세계적으로 연구보고가 거의 없는 실정인데, 개 복제 성공을 위해서는 개 난자의 배양 시스템을 체계적이고 집중적으로 연구하여 이 분야에서 세계의 선도적인 위치를 차지할 필요가 있음
- 거. 본 연구팀의 공동연구로 Bongo 체세포를 소 난자에 핵이식 하여 이숙간의 배아 형성을 성공 한 후 시험관 내에서 발달을 연구하였다. 이를 통해 멸종위기 동물 보존의 대체 방법을 연구 하였다 (Lee et al, Cloning Stem Cells, 2003)
- 너. 개에서 수술적 방법을 이용한 체내 성숙난자의 회수방법에 대한 연구로

- progesterone 측정 및 질 세포학적 검사를 통해 배란시기를 결정하고, 배란 72 시간 후에 성숙난자를 난관으로부터 회수하는 방법을 연구하였다. 특히 이 연구에서는 난자를 회수하기 위한 특별한 주사침을 개발하여 난관을 수술적으로 제거하여 회수하는 것보다 용이하며, 효율이 높은 성숙난자 회수법을 제시하였다 (Kim et al., Korea J. Embryo Transfer, 2004)
- 더. 멸종 위기 동물인 leopard cat(*Prionailurus bengalensis*)에서 domestic cat(*Felis silvestris catus*)의 난자를 이용하여 핵이식 난자의 시험관내 성숙과 핵, 미세소관의 remodeling에 관한 연구를 하였다. 연구 결과 핵과 미세소관의 remodeling 과정과 시험관 내 발달과정은 domestic cat 과 leopard cat이 유사함을 보고하였다(Yin et al., Anim Reprod Sci, 2005)
- 러. Domestic cat의 핵 제거 난자에 Leopard cat의 섬유아세포 핵을 이식하여 초기 임신 성공에 성공하였다. 표범 세포의 성에 따른 융합비율, 난할 및 배반포 형성 비율은 차이가 없었으며 일부는 태아를 생성하였으나 임신 말기 까지 발달하는 것은 실패하였다. microsatellite 분석을 통해 태아가 표범 유래임을 확인하였다 (Yin et al., Theriogenology, 2005)
- 머. Estradiol-17 β 와 progesterone이 발정주기별 난자의 체외성숙에 미치는 영향을 연구하였다. 난포기에 Estradiol-17 β 을 첨가하는 성숙율의 증진을 볼 수 있었으나 다른 시기에 첨가하는 권장할 만한 결과를 얻지는 못하였다. 또한 progesterone의 경우 첨가 효과를 찾을 수 없었다(Kim et al, Theriogenology., 2005)
- 버. 발정주기별 개 혈청의 첨가가 난자의 체외성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 기본 배양 배지에 각각 무발정기, 발정기 또는 발정 후기의 혈청과 FBS를 첨가한 결과 10%의 발정기 혈청 첨가 시에 난포기 개 난자의 시험관내 성숙율을 향상시켰음을 보고하였다(Oh et al, Zygote, 2005)
- 서. 다양한 발정 주기의 난소에서 얻은 개 난자에서 Estradiol-17beta와 progesterone의 첨가가 개 난자의 체외 핵 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 배양 배지 내에 E2 또는 P4의 단독 첨가를 통해 개 난자의 제2중기로 성숙률이 유의성 있게 증가하였으며 E2와 함께 P4의 첨가는 P4 농도에 따라 E2 단독의 영향을 받아 난자의 성숙이 향상되거나 감소됨을 보고하였다(Kim et al., Theriogenology, 2005)
- 어. Beta-mercaptoethanol 또는 epidermal growth factor의 첨가가 발정 주기별 난자의 시험관내 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 시험관내 성숙 배지에

b-ME의 첨가는 여러 종에서 배아발달이 향상되었음이 보고되었다. EGF는 사람 난자의 시험관내 수정 후 시험관내 성숙과 배아 발달을 향상시켰다. 이 연구에서는 50또는 100 μ m의 b-ME와 20ng/ml의 EGF의 첨가가 개 난자의 제 2중기로 성숙률을 향상시켰음을 보고하였다(Kim et al , J Vet Sci., 2004)

저. 개 난자의 시험관 내 핵 성숙과 난구 세포의 확장에 FSH와 LH가 미치는 영향에 대해 연구하였다. 난구 세포의 확장은 FSH 5ug/ml에서 가장 크게 나타났으며 control, 0.5, 50ug/ml에서는 큰 변화가 없었다. 그러나 LH를 동일한 농도로 실험하였을 때, 난구 세포의 확장에는 크게 영향을 미치지 않았다. 72시간동안 IVM 후, 핵 발달 단계가 MI-II의 발달 단계가 FSH 5ug/ml에서 가장 크게 나타났다 (Lee et al., Reprod Domest Anim, 2007)

처. 개 난자의 시험관 내 성숙, 시험관 내 수정, 배아의 발달에 대해 연구하였다. 시험관 내 성숙시 FBS는 시험관 내 핵 성숙에 크게 영향을 미치지 못하였고, heparin이 첨가된 배지에서 수정이 되었을 때의 효율을 비교한 결과 헤파린이 첨가되지 않은 배지에서 가장 수정율이 높았으며 molura stage까지 발달하였다. 따라서 다른 포유 동물과 달리 헤파린을 첨가하지 않는 것이 효율이 높다는 결론을 얻었다(Lee et al., Zygote, 2007)

커. 시험관 내 개 난자의 성숙에 EC-SOD 형질 전환 쥐에서 생산된 배아의 fibroblast를 첨가한 배지의 영향을 알아보았다. 이 실험은 EC-SOD(extracellular superoxide dismutase)가 항산화제로서 시험관 내 성숙에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위한 것이다. 실험 결과 개의 난자의 형질전환된 쥐 배아의 섬유아세포를 첨가한 배지에서 더 잘 성숙하였다(Lee et al., Anim Reprod Sci, 2007)

터. 국내에서도 복제소 영롱이를 비롯하여 2005년과 2006년에 서울대학교에서 개복제에 성공하였고, 순천대학교 공일근 교수팀이 고양이 복제에 성공함. 최근, 충남대 형질전환 복제돼지 연구센터에서 복제돼지 탄생함

퍼. 본 연구센터에서는 원숭이의 안정적인 증식과 형질전환 모델제작을 위해, 원숭이 정자 동결보존, 과배란 유도 및 원숭이 성체 세포 (뇌세포, 간세포, 신장세포 등)를 배양하는 연구를 진행하고 있음

3. 국내 기술현황

(1) 2004년 Li 등은 체세포 복제 소에서 배아 발달과 기관 분화와 관계된 8개 (PCAF, Xist, FGFR2, PDGFRa, FGF10, BMP4, Hsp70.1, VEGF) 유전자를 조사한 결과

유전자 발현 양상의 이상이 발견되었다고 보고하였다.

- (2) 2003년 Han 등은 체세포 복제 배아에서 공여 체세포 핵의 재발생 단계에서 DNA methylation 양상의 차이가 관찰되었다고 보고함
- (3) 2004년 Schaetzlein 등은 쥐와 소의 배아연구에서 세포의 노화와 관련된 telomere는 초기 배아단계에서 배아 발생과 관계되며 telomerase의 활성이 이를 결정한다고 보고하였다.
- (4) 본 연구팀에서는 배란 후 체내성숙 난자를 이용하여 수컷 Afghan hound 2두를 복제하는데 성공하였으며, 현재 1두가 생존하여 성견으로 성장하였다(Lee et al., Nature, 2005). 그에 이어 암컷 Afghan hound 3두(Jang et al., Theriogenology, 2007), 토이푸들(Jang et al., Theriogenology, 2008), 삽살개(Jang et al., J Vet Med Sci., 2009), 페키니즈(Park et al., Theriogenology, 2011)의 복제에 성공하였다.
- (5) 본 연구팀에서는 개의 성숙난자를 이용한 체세포복제를 시도하여 2두의 멸종위기 야생동물의 복제 생산에 성공하여 개과동물의 기술적 우위를 선점하였다(Kim et al., cloning and stem cells, 2007; Oh et al., Theriogenology, 2008).
- (6) 본 연구팀에서는 개의 체내성숙 난자를 이용하여 능력이 우수한 마약탐지견 래브라도 리트리버의 체세포복제를 시도, 총 10마리의 산자를 생산하였고 현재 7두가 생존하여 성견으로 성장하였다(Oh et al., Theriogenology, 2009). 7두 모두 마약탐지견으로써 우수한 자질을 지녔음이 입증되었다.
- (7) 본 연구팀에서는 외래 유전자가 삽입된 형질전환 체세포와 개의 성숙난자를 이용, 빨강형광단백질(Red Fluorescent Protein, RFP)을 발현하는 비글 암컷 4두, 수컷 2두의 총 6두를 생산하였고, 이 중 5두가 생존하여 성견으로 성장하였다(Hong et al., Genesis, 2009). 이러한 성공을 토대로 삽입된 외래 유전자의 발현 시기 조절이 가능한 녹색형광단백질(Green Fluorescent Protein, GFP) 발현 비글 1두도 생산하였다.
- (8) 체세포복제 기술을 이용하여 second generation cloned cat를 생산하였다(Yin et al., Theriogenology, 2008).
- (9) RFP 형질전환 복제고양이 유래 털줄에서 neuronal-like cell 라인을 확보하여 Journal of Verternaary Medical science에 보고하였다.
- (10) eCG 호르몬의 최적농도를 적립하여 (Yu et al., Theriogenology, 2010) 체내 수정란의 확보하여 고양이 stem-like cell을 분리·배양에 성공하였다 (Yu et al., Molecular reproduction and development, 2008). 뿐만아니라 줄기세포 마커인 POU5F1 및 NANOG을 이용하여 고양이 유사 줄기세포를 확인하였다 (Yu et al., Journal of reproduction and development, 2009).
- (11) 체세포복제 기술을 이용하여 확보한 RFP 셀라인을 이용하여 RFP 재복제를 성공하였으며 (Cho et al. Theriogenology, 2010), 이속간의 삶 복제수정란의

생산과 산자 생산을 위하여 도나세포에 TSA를 처리하여 복제수정란의 발달을 향상을 확인하였고 세포수가 현저히 증가되는 것을 확인하였다 (Lee et al., Theriogenology, 2010).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

[제 1과제]

제 1절 RFP 형질전환 복제고양이 재복제와 생식능력 검증

○ RFP 형질전환 복제고양이 재복제와 생식능력 검증

본 연구에서는 RFP 형질 전환 되어진 복제고양이 (Yin et al.,2008)의 체세포를 이용하여 재 복제 동물을 생산하면서 재 복제의 효율을 관찰하고 RFP 유전자의 전이를 검증하였다. RFP 유전자 형질 전환 된 복제고양이의 재생산의 기술은 사람의 유전질환의 생체 임상모델동물로써 생산하는데 중요한 역할을 할 것이다.

● RFP 형질전환 복제고양이의 체세포 확립

이 실험에서는 RFP 형질전환 고양이의 재 복제생산을 위하여 RFP 형질전환 복제 고양이의 피부조직 일부를 얻어 cell line을 확립하였다. 6 mm 피부조직을 채취하여 10% FBS가 포함된 DMEM (Lot no. 1267027, Gibco-BRL, USA)의 배양액을 이용하여 1-5번 정도 계대배양을 한 후 사용하였다.

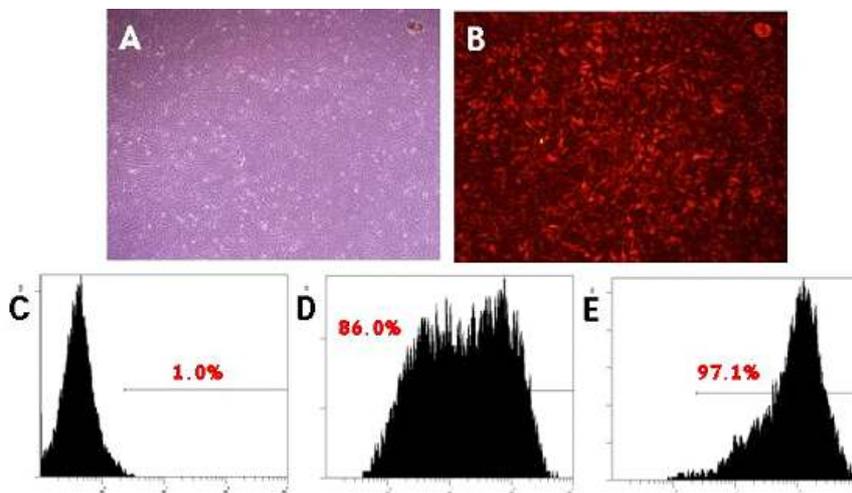


Fig 1. Flow cytometric determination of RFP expression on the donor cell surface. (A) Visible light image and (B) red fluorescence emission of donor cells. (C) Non-RFP TG cat cell line (negative control). (D) First RFP TG cat cell line (donor cells). (E) RFP gene transfected cell line (positive control).

확립된 RFP 형질전환 된 복제고양이의 체세포는 Flow cytometry (FACS, Epics XL, Beckman Coulter. USA)을 통하여 RFP 유전자 발현여부를 확인하였다. 여기서 발현여부의 확인 결과 positive control cell (Fig 1-E)은 transfection된 세포로 97.1% 발현을 보였으며, negative control cell (Fig 1-C)은 1.0% 으로 발현되지 않음을 보였다. 이 결과를 기준으로 RFP 형질전환 복제고양이의 체세포 발현 (Fig 1-D)을 측정 결과 86.0% 의 발현여부를 확인 할 수 있었으며 여기에서 확실하게 발현하는 세포만을 이용하여 재 복제 형질전환 복제고양이 생산에 이용하였다.

- RFP 체세포를 통한 핵이식

체세포를 이용한 체세포 핵이식은 micromanipulator를 이용하여 배양된 세포를 성숙된 난자에 주입하는 방법으로 Yin 등(2008)에 의한 방법을 이용하였다.

- RFP 재 복제고양이의 유전자발현 확인

이 결과 13마리의 대리모에 이식하여 1마리의 RFP 재 복제고양이를 생산할 수 있었으며, 그 재 복제고양이의 생산효율은 7.69% 정도에 미쳤다 (Fig 2-A, B). 또한 재 복제생산에 있어 전기융합 되어지는 효율성 비교에서는 복제고양이를 이용하여 재 복제고양이를 얻은 결과와 형질전환 복제고양이를 이용하여 재복제를 시도하였을 때와 비교해 보면 각각 58.8%와 56.9%로 fusion 효율성에서는 유사함을 보였다 (Yin et al. 2005, 2008). 여기서 우리는 RFP 형질전환 복제고양이의 체세포를 이용한 핵이식은 nontoxic 함을 증명해 보일 수 있었다.

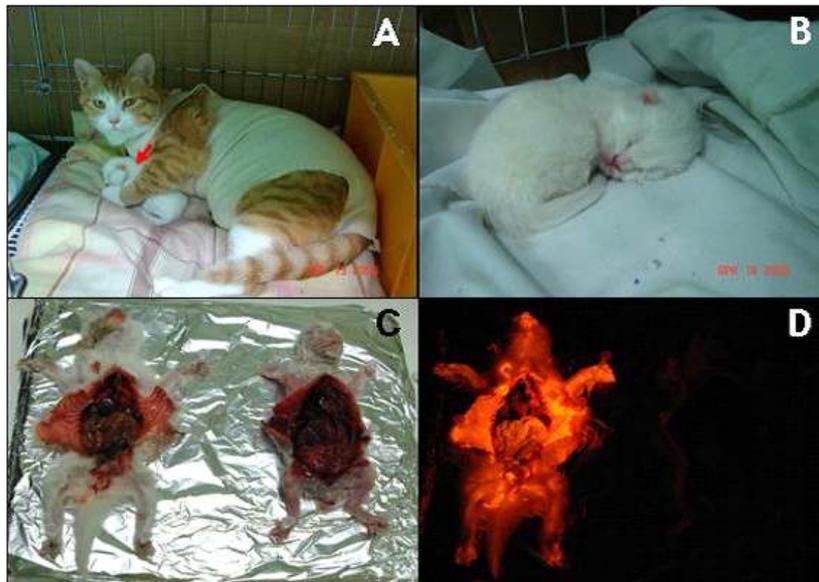


Fig 2. The Re-RFP TG kitten with surrogate mother and RFP expression in the Re-RFP TG and non-TG control cats. (A) Surrogate mother and Re-RFP TG kitten (arrow). (B) Re-RFP TG kitten. (C) Re-RFP TG (left) and

non-TG control (right) using visible light imaging and (D) fluorescence imaging.

생산된 RFP 재 복제 고양이는 RFP 형광발현의 유무를 확인하기 위하여 excitation 과 emission 필터 세트에 맞는 이동형 수술용 등으로 비교하였다. Figure 2-C와 D 에서 왼쪽의 재 복제양이는 RFP 형광의 발현을 확인할 수 있었으나, 오른쪽 대조군으로 사용된 고양이에서는 RFP 형광발현을 하지 않음을 확인하였다 (Fig 2-C, D).

RFP 재 복제고양이는 PCR 작업을 통해 mRNA와 genomic DNA에서의 RFP 유전자 발현을 확인 하였다 (Figure 3). 재 복제고양이의 genomic DNA 에서의 발현은 non-형질전환 고양이와 negative 를 대조군으로 사용하여 비교하였다(Fig 3-II). 각 장기에서의 mRNA 에서도 역시 RFP 유전자 발현 이 확실하게 관찰할 수 있었다 (Fig 3-I).

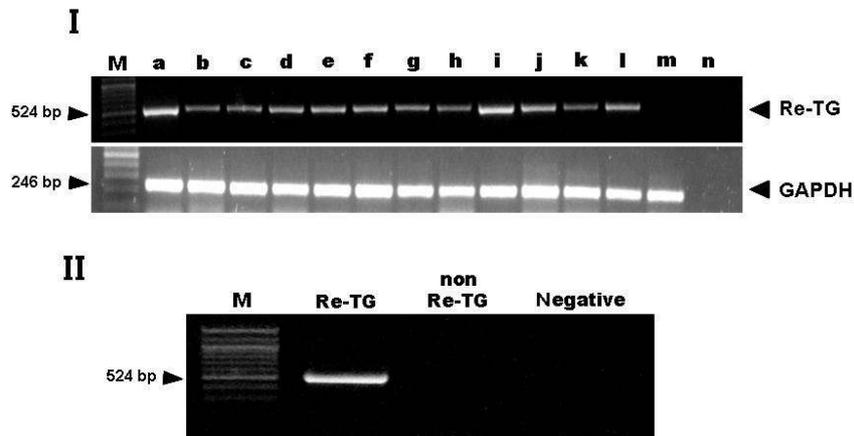


Fig 3. PCR analyses of a Re-RFP TG cat. The mRNA and genomic DNA isolated from various organs were subjected to PCR amplification: (a) testis, (b) liver, (c) large intestine, (d) spleen, (e) kidney, (f) heart, (g) duodenum, (h) stomach, (i) pancreas, (j) lungs, (k) skin, (l) placenta, (m) non-TG control cat, and (n) negative control. II: Re-RFP TG cat (Re-TG), non Re-RFP TG control cat (non Re-TG), and negative control (negative).

● 형질전환 재 복제고양이의 도너 고양이와의 유전적 일치 확인

RFP 재 복제고양이의 무게는 144.3 g 이었고 태반무게는 37.0g 으로 확인하였다 (Table 1). 또한 8개의 고양이 특이적인 microsatellite의 분석을 통하여 도너 고양이와 재 복제고양이 산자가 유전적으로 일치하다는 것을 확인하였다 (Table 2).

Table 1. Body and placental weights of the first RFP TG and Re-RFP TG cats at birth.

Cloned cat	Body weight (g)	Placental weight (g)
TG*	122.0 ± 13.0	24.0 ± 6.4
Re-TG	144.3	37.0

* Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). Re-TG is the recloned RFP TG cat (Re-RFP TG cat). *The first generation RFP TG cat (first RFP TG cat) is described in Yin et al. (2008a).

Table 2. Microsatellite analysis of donor, Re-RFP TG and surrogate mother cats using nine feline specific microsatellite markers.

Cats	Feline microsatellite markers								
	FCA07	FCA17	FCA20	FCA22	FCA22	FCA29	FCA30	FCA44	FCA30
	8	0	1	4	9	0	4	1	5
Donor cell	198/198	110/114	140/150	150/150	169/169	211/217	110/130	155/159	184/190
Re-TG	198/198	110/114	140/150	150/150	169/169	211/217	110/130	155/159	184/190
SM	ND	90/116	140/140	150/150	151/167	213/213	108/110	159/159	196/196

* ND, not determined. Re-TG is the Re-RFP TG cat and SM is surrogate mother cat.

● RFP 재 복제고양이의 태반에서의 DNA methylation 상태 분석

우리는 도너로 사용되었던 RFP 형질전환 고양이의 태반과 RFP 재 복제고양이의 태반에서 epigenetic 적 상태를 관찰하고자 Global 한 DNA methylation 상태를 관찰하였다 (Fig 4). Global 한 DNA methylation 상태를 관찰하기 위해 22개의 CpG site가 존재하는 400 bp 의 satellite DNA region에서 관찰 하였다. 먼저 도너로 이용되었던 RFP 형질전환 복제고양이의 태반 (TG 1과 2)과 RFP 재 복제고양이의 태반에서의 DNA methylation 상태는 각각 77.08, 82.29 그리고 76.38 %)로 도너로 이용되었던 RFP 형질전환 복 고양이와 유사한 DNA methylation 상태를 보여주었다. 이것은 RFP 형질전환 복 고양이에서 유래된 재 복제고양이의 epigenetic 적으로 변화가 없음을 보여줬다.

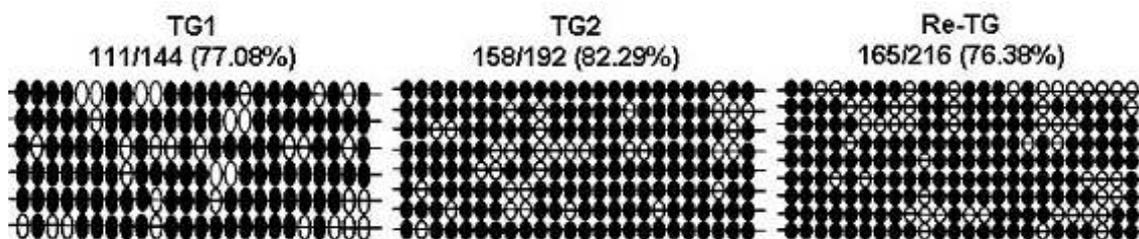


Fig 4. Methylation of the satellite DNA region in placenta. Bisulfite analysis was performed with placenta obtained from the first RFP TG cats (TG1 and TG2) and a Re-RFP TG cat (Re-TG). Each string indicates a 400-bp fragment of the satellite DNA region that was amplified by PCR from bisulfate-converted genomic DNA. Open circles indicate unmethylated CpGs, and solid circles indicate methylated CpGs. The methylated CpGs are expressed as a percentage of the total number of CpG sequences. The satellite DNA region was hypermethylated in all placentas.

○ 자연교미 및 인공수정에 의한 생산된 F1의 RFP 유전자의 발현 검증

일반적으로 고양이는 암컷 6~8개월령, 수컷 7~10개월령에 성 성숙에 도달하게 되며 성숙시의 체중은 개체차가 있으나 암컷 2.0~2.5kg 수컷은 2.5~3.0kg이다. 발정기간은 3~7일이며 배란은 교미자극에 의해 교미 후 27~30시간에 일어난다. 그리고 교배방법으로서는 다수의 암컷과 수컷의 집단 사육에 의한 교배와, 한 쌍의 암수를 동거시켜 교배하는 방식이 있다. 임신은 교미 후 18~21일에 유두의 색깔이 변화하므로 알 수 있으나 복부촉진에 의해서 교배 후 4주째부터 엄지손가락 크기 내지는 호두알의 크기의 태자가 확인되기도 한다. 보통은 6주째 이후, 체중이나 체형의 변화로 추정할 수 있으며 또 고양이에서는 임신 중에도 발정이 나타나기 때문에 다른 동물 중에서도 같이 교배후의 발정재래의 유무에 의한 임신을 추정할 수 없고 임신기간은 평균 65±3일이다. 출산에 필요한 시간은 산자수에 따라 다르나 약 2~3시간이고 산자수는 1~6마리이며 평균 4마리이다. 출생산자의 평균체중은 90~130g이다.

본 연구는 RFP 형질전환 복제 고양이의 번식능력과 생산된 산자들로 부터의 RFP 유전자 전이를 조사하면서 RFP 유전자 발현하는 고양이 계통 구축을 하고자 수행하였다.

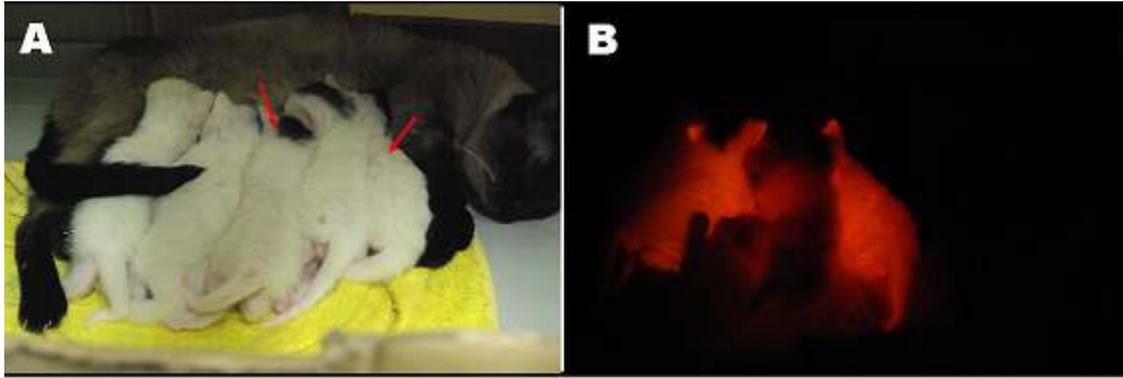


Fig 1. RFP expression in F1 progeny-RFP TG cat and mother cat (A,B). (A) visible light image and (B) fluorescence image.

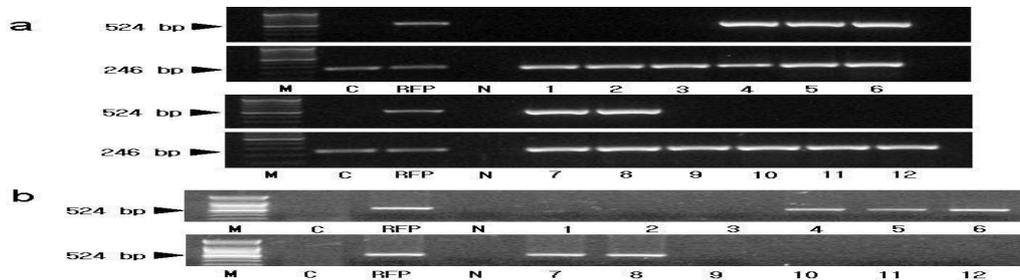
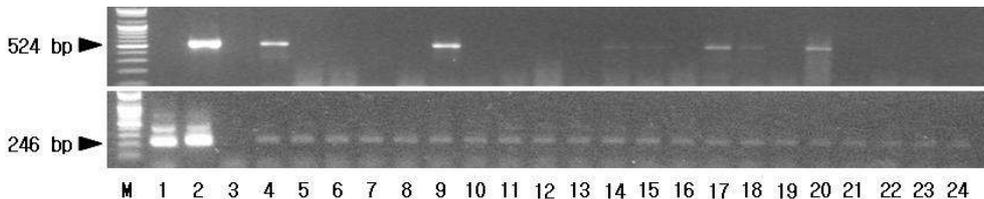


Fig 2. RFP transgene expression in the skin of F1 progeny-RFP transgenic cats. PCR analysis from mRNA (a) and gDNA (b).

암고양이와 교미 후 산자(F1)를 생산하였다. 생산된 각 산자는 gDNA 와 mRNA 를 통해 RFP 유전자발현 여부를 확인하였으며, 각 6마리 개체에서 2마리, 3마리의 RFP유전자를 지닌 F1을 생산 할 수 있었다 (Fig 1, 2). 또한 RFP 형질전환 숫컷 복제고양이의 정액채취 후 체외수정란 생산을 통해 그 수정란의 RFP유전자 발현 여부를 PCR을 통해 확인할 수 있었다 (Fig 3).

Fig 3. PCR amplification of RFP-expressing and non- RFP-expressing embryos produced by IVF using sperm from the RFP transgenic cloned male cat.



F1의 산자생산을 통해 확인 결과와 유사하게 대략 33%의 RFP 유전자발현을 하는 체외수정란을 확인할 수 있었다. 그 다음 RFP유전자 발현하는 한 개체를 이용하여 각 장기별 RFP 유전자 발현 유무를 확인하였다(Fig 4).

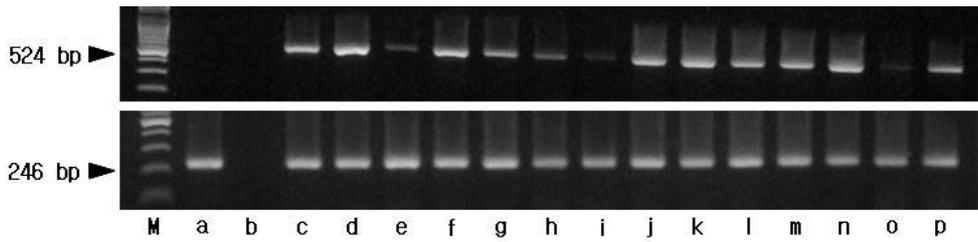


Fig 4. RFP transgene expression in several organ tissues of the F1 progeny-RFP transgenic cat (F 6).

그 결과 피부 조직을 포함 한 간,근육,뇌,대장,방광,비장,생식기,소장,신장,심장,위,췌장,폐에서 모두 RFP발현을 확인하였다. 그리고 각 F1 의 개체와 RFP 형질전환 숫컷 복제 고양이의 정자에서 FISH 분석을 이용하여 chromosome 분석을 통해 RFP 유전자의 삽입을 확인 할 수 있었다 (Fig5-6). 결과 Fig 1에서 gDNA 와 mRNA 에서 확인한결과 와 동일하게 RFP 유전자 삽입을 확인 할 수 있었고 정자에서도 역시 44.6% RFP 유전자를 확인 할 수 있었다 (Table 1).

Table 1. FISH signal counting of samples (n=300).

	Probe	n	No. of positive signal (%)
TG Cat sperm	RFP	300	134 (44.6)

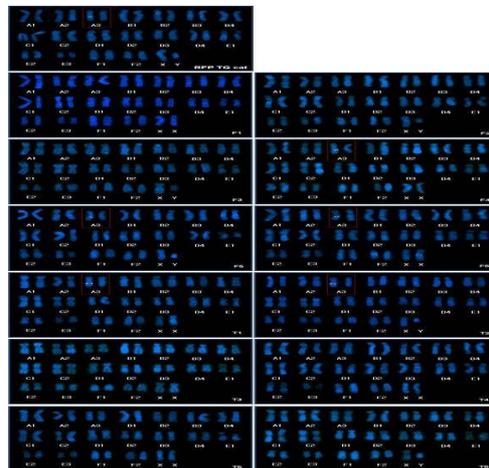


Fig 5. Karyograms for all cats from FISH analysis. Only definite signals are indicated by the red square box.

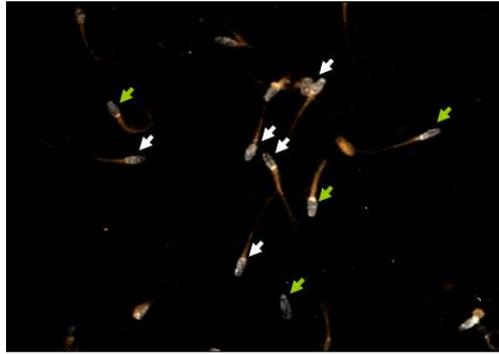


Fig 6. FISH analysis of sperm from the RFP transgenic cloned male cat. White arrow is RFP transgene expression and green arrow is non-RFP transgene expression. Original magnification: $\times 1000$. Filter: Cy3 and DAPI.

이 후에도 성 성숙된 형질전환 복제 고양이의 germ line에도 발현이 되는지 그리고 이러한 형질은 다음 세대에도 전달이 될 수 있는지 확인하기 위해 인공질법으로 형질전환 복제고양이의 정액을 채취하기 위해 암고양이에 PMSG 및 hCG를 투여 후 발정동기화유기를 하였고, 발정이 유기된 암고양이를 정액을 채취하기 위한 복제고양이와 같은 사육장에 입식하여 복제고양이의 교미를 유도하였다. 암고양이가 승가를 허용하고 복제고양이가 교미를 위해 암고양이의 뒷덜미를 물었을 때 인공질을 넣어 숫고양이의 생식기를 인공질에 유도하여 넣은 후 정액의 사출을 유도하였다. 채취된 정액은 일반 정상분석을 위하여 바로 실험실로 옮겨서 RFP 형광발현을 판별 하였다 (fig. 7 and fig. 8).

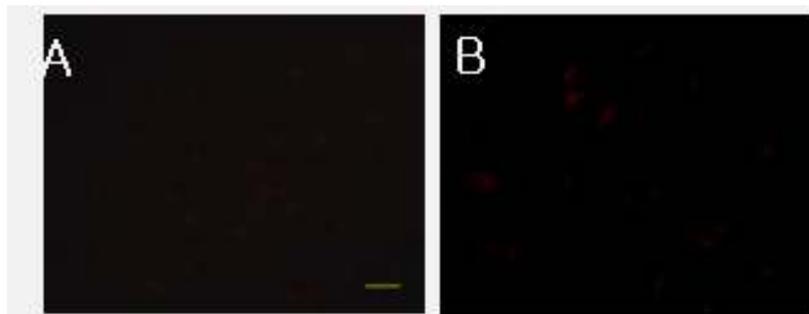


Fig 7. RFP transgenic cloned cat sperm. A and B; RFP-fluorescence sperms.

RFP 형질전환 복제고양이는 일반 대리모와 공시하여 한 쌍의 암수를 동거시켜 교배하는 방식이며, 공시한 암컷 대리모는 자연발정 확인 후 3일간을 동거를 시키고 교배하는 것을 눈으로 확인하는 방식으로 정확한 교배시점과 교배행위를 확인을 하였다. 고양이는 한 번의 교배가 아닌 여러 번의 교배를 통하여 임신이 된다. 3일간 교배 한 수컷 RFP 형질전환 복제 고양이는 최소 7~10일을 수컷 혼자만의 cage에서 자유급식과 자유급수를 통하여 휴식을 가지고 다시 교배를 시도하였다. 자연교배에

공시된 대리모도 개인용 cage에 넣어서 자유급식과 자유 급수를 하였으며 일조시간도 낮 14시간 밤 10시간을 타이머를 설정하여 자동 조절하였다.

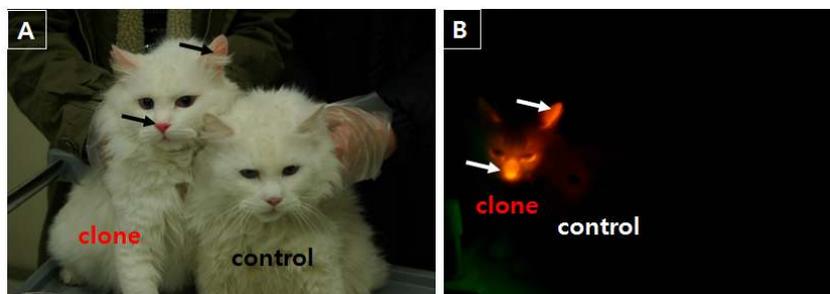


Fig 8. RFP cloned cat shown the red fluorescence nose and ears compared with control. RFP fluorescence cat was observed the red fluorescence under UV filter but control cat doesn't observed not only normal condition but also under UV condition. A; RFP-cloned cat, B; control cat.

이렇게 RFP 형질전환 복제고양이와 일반 대리모 교배 후 태어난 산자의 수 (F1)는 총 10마리가 생산이 되었으며, 이 중 암컷은 4마리가 태어났고 수컷은 6마리가 태어났다. 태어난 산자 중 RFP의 유전형질이 수컷에는 4마리 중에 2마리에게 전달이 되었으며 암컷 6마리 중에서 3마리가 전달이 되었다 (Table 2 and Figure 9).

Table 2. The RFP-kittens were birth after natural mate at day 65.

Mating	No. of kittens(♂) RFP/normal	No. of kittens(♀) RFP/normal
RFP(♂)+control(♀)	2/4	3/6

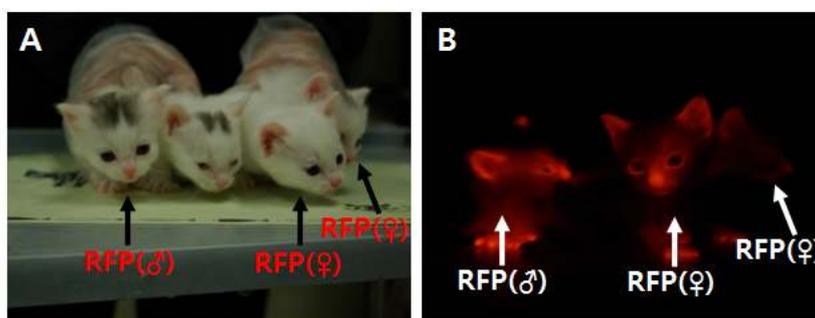


Fig 9. Kittens were birth from RFP cloned cat and control by natural mate. A; natural light picture, B; fluorescence picture. Arrows were indicate RFP cloned kittens.

이 결과 RFP 형질전환 복제 고양이의 Red fluorescence 형질이 자연교미의 의해서 다음 세대로 전달되는 것을 알 수 있었다. 이렇게 형광형질이 다음 세대로의 유전이 된다면 어렵고 성공률이 낮은 복제를 하지 않아도 생산한 복제고양이를 이용하여 대량으로 그리고 안전한 방법으로 형광형질을 지니고 있는 고양이를 생산 할 수 있을 것으로 기대되어진다.

형질전환 복제고양이와 일반고양이의 자연교배에 의해서 다음세대로 그 형질이 전달되는 것을 확인 할 수 있었다. RFP 형질이 유전된 F1의 번식능력과 생식활동에 대한 검증과 F1세대에서 F2세대로의 RFP 형질전환 및 생식능력에 대한 조사가 필요하며 계통구축의 가능성도 가늠해야 할 필요성이 대두되었다. 그래서 RFP-F1의 성 성숙이 완성되는 시점인 10개월경부터 인공질법을 이용하여 자연교미를 훈련하였고, 이후 RFP F1과 일반 대리모의 자연교배를 유기하고 F1의 생식능력과 F2산자의 RFP 형질이 유전이 되는지를 확인하였다. 자연 교배 방법은 암수를 동거시켜 교배하는 방식이며, 공시한 암컷 대리모는 발정확인 후 3일간을 동거를 시키고 교배하는 것을 눈으로 확인을 하는 방식으로 교배를 확실하게 확인을 하였다. 3일간을 같은 cage에 넣어서 자유교배를 유기하고 교배 후 암컷은 자유 급식과 급수하여 임신유지를 하였다.

RFP F1산자의 정자에 RFP 형질이 있는지를 확인하기 위해서 인공질법으로 사정을 유도하여 멸균된 1.5ml tube에 사출된 정액을 담아서 일부는 동결을 해두고 나머진 RFP 형광형질을 확인하기 위해 slide glass에 도말하여 형광 microscope에서 RFP 형광을 확인하였으나 형광은 발현되지 않았다 (Fig. 10).

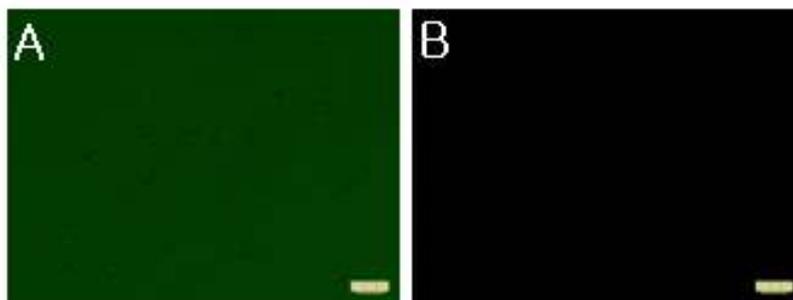


Fig 10. F1 cat sperm did not observed red fluorescence. A and B; the picture was F1 sperm under light and fluorescence microscope.

자연 교배를 했던 대리모 한 마리가 임신에 성공을 해서 임신기간 (day 65)에 2마리의 kittens을 분만하였다. 이렇게 분만된 kittens은 암·수 각각 한 마리였으며, RFP의 형질은 유전이 되지 않았다 (Table 3).

Table 3. The F2 kittens were birth after natural mate at day 65.

Mating	No. of kittens(♂) RFP/normal	No. of kittens(♀) RFP/normal
RFP F1(♂)+control(♀)	0/1	0/1

이 결과로 F1의 번식능력은 정상적임을 알 수 있었지만 다음 세대로의 RFP 형질의 유전은 확인을 하지 못했지만 한 마리의 임신이 성공으로 그 결과는 몇 번의 반복 실험을 통해서 알 수 있을 것으로 사료된다. 나아가 F2 이후 세대의 번식능력과 RFP 형질의 유전도 검증해야 할 숙제이다.

○ RFP 형질전환 복제고양이의 유전자원 보존을 위한 동결정액제조기술 개발

본 실험에서는 고양이의 정액 채취방법으로 인공질과 전기자극을 이용한 채취를 하여 보다 더 안정적이고 개선적인 방법으로 정액 개량을 위한 방법을 모색하기 위하여 실험과정을 수행하였다. 고양이의 인공질을 이용한 정액 채취 방법은 (Sojka 등 1970)에 의해 처음 보고 되었다. 인공질을 이용한 정액 채취는 비용이 저렴하고 시간의 소모가 적은 장점이 있다. 그러나 암컷이 있어야지만 교미활동을 유도하여 정액을 채취할 수가 있어 수컷만 사육하는 환경에서는 채취가 곤란하다. 반면에 고양이의 전기자극 정액 채취법은 (Scott 등 1970)에 의해 처음 보고 되었다. 전기자극 정액채취법은 마취를 한 후 안전하게 채취 할 수 있으나 시중에서 쉽게 구할 수 없는 고가의 전기자극기와 마취제 등이 필요하여 비용적인 면에서 인공질법과 상반되는 단점이 있다. 고양이의 인공질에 의한 정액의 사출은 전기 자극에 의한 채취량보다 그 양이 매우 적지만 정자의 농도는 매우 많은 편이다. 그러나 정자의 성상은 정액채취방법에 크게는 영향을 받지 않는다. 또한 정자는 수정과도 크게 연관이 있어 정자의 비정상 발현율은 수정란의 생산과 더 나아가 산사 생산에도 영향을 미치므로 정자의 성상은 매우 중요하다.

먼저 인공질 방법은 자연발정이 오거나 호르몬으로 발정 유기를 시킨 성격이 온순한 암컷을 수컷이 있는 케이지에 1:1로 합사를 시킨 후 교미활동을 유도하여 수컷이 암컷 등에 오르면 인공질 내로 수컷의 페니스를 삽입하여 정액을 채취하였다. 그리고 전기자극 채취법은 304 PTE 220 VAC 모델 전기 채취기(U.S.A)를 이용하여 24시간 동안 절식시킨 고양이를 10~15mg/ml당 Zoletil 50 (Virbac.co)을 근육주사하여 전신 마취 시킨 후 고양이를 수술대에서 페니스와 정소 부위를 알코올로 소독하고 털을 제거한다. 고양이가 완전히 마취가 되면 전기 채취기 7.5cm 길이의 prove에 sono gel을 묻히고 고양이의 항문 부분에도 적당량의 젤을 도포하여 부드럽게 삽입될 수 있도록 한 후 직장으로 조심스럽게 삽입 시킨다. Prove가 직장 내에서 복강 가까이로 깊게 삽입되도록 위치시킨다. 전기의 통전은 총 3 part로 나누

게 되는데 한 part당 10번씩 80번의 자극을 준다. 자극을 줄 때는 0~1초 사이에서 0 Volt, 그리고 원하는 volt에서는 2~3초간 유지 시켰다가 voltage를 내린 후 2~3초 동안 간격을 준다. 그리고 각 파트가 끝나면 5분 동안 휴식기를 준다. 전기 세기는 Table 1과 같다(Fig 1).

Table 1 Protocol for electroejaculation of male cat.

	1 part	2 part	3 part
Voltage (V)/	2 volt / 10	3 volt / 10	4 volt / 10
Stimulations (n)	3 volt / 10	4 volt / 10	5 volt / 10
	4 volt / 10	5 volt / 10	

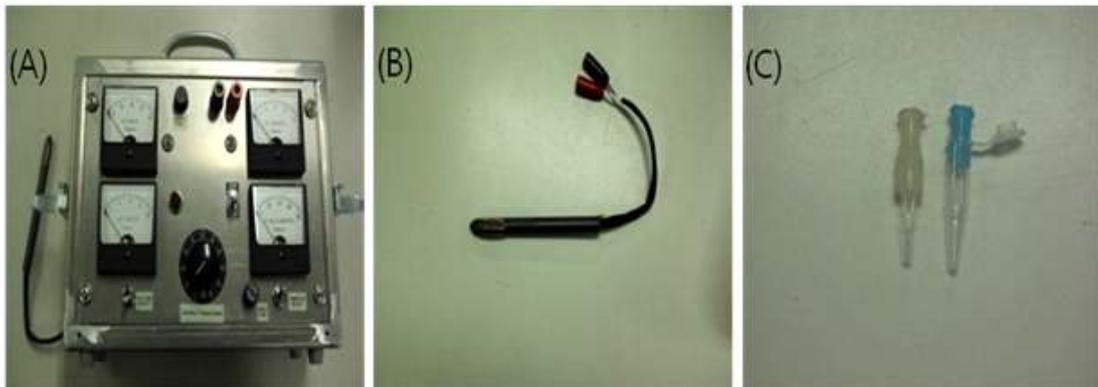


Fig 1. (A) The electro stimulate machine for semen collect of male cat. (B) Teflon rectal probe (C) Artificial virginal for the cat semen collect.

정액을 채취한 후 실험실로 정액을 37°C로 온도를 유지하여 저온에 대한 충격을 최소화시켜 운반한다. 그런 다음 정액을 EXT 1 Buffer (Tris-buffer + 20% egg yolk)에 넣어 온도를 4°C로 2시간 이내로 천천히 하강하여 EXT 2 (Tris-buffer + 20% egg yolk + 8% glycerol+ 1% Equax STM paste)와 1:1 비율로 15분씩 10%, 20%, 30% 그리고 40% 로 나누어 최종 mix 하였다. 이것을 Straw에 담아 silling 한 후 스티로폼 내에 LN2 수면으로부터 5.5cm 위치에서 증기 동결 한 후 LN2에 최종 침지하였다. 용해는 37.5°C 온수에서 15초간 Straw를 흔들며 용해 시킨 후 D-PBS의 1800rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 그런 다음 상층액을 제거하고 다시 D-PBS로 희석하여 정자의 생사여부, 운동성, 형태학적인 양상을 관찰하였다. 정자의 staining은 모든 샘플을 미리 도말하여 염색하였다.

Eosin-B는 정자의 생사 여부를 판단할 때 쓰이는 염색액으로 살아있는 정자는 염색이 되지 않으나 죽은 정자는 핑크색으로 두부가 염색이 된다. 정자의 운동성은 Makler counting Chamber (sefi-medical instruments itd)를 이용하여 정자를 카운트 하였으며 SMI (Sperm Motility Index)에 의해서 평가하였다.(Table 2)

Table 2. Morphological evaluation before frozen-thawing according to semen

collected method of male cat (Mean \pm SD)

Treatment	Volume, μl	Sperm concentration, $\times 10^6/\text{ml}$	Motility,%	Viability,%
EE	-	89 \pm 2.2	53.1 \pm 3.6	22.6 \pm 10.6
AV	42.5 \pm 3.5	128 \pm 7.8	73.6 \pm 5.7*	37.1 \pm 26.1

P<0.01*

정액의 농도는 전기자극법으로 채취한 정액이 89 \pm 2.2, 인공질법을 이용하여 채취한 정액이 128 \pm 7.8로 유의적인 차이는 없었다 (P<0.05). 정자의 운동성은 전기자극법과 인공질법이 각각 53.1 \pm 3.6^a, 73.6 \pm 5.7^b으로 고도의 유의적인 차이가 인정되어 전기자극법의 정액 활력이 다소 낮았다. 그리고 생존율은 전기자극법과 인공질법은 각각 22.6 \pm 10.6, 37.1 \pm 26.1로 유의적인 차이는 없었다 (P<0.05).

그리고 형태학적인 평가는 Diff-quick kit를 이용하여 정자의 normality와 abnormality를 평가하였다 (Table 3).

Table 3. Perportion of morphologically abnormal or normal thawed spermatozoa of male cats by Diff-quick (Mean \pm SD)

Treatment	Morphologically Abnormal sperm (%)			Morphologically Normal sperm (%)
	Head defects	Midpiece defects	Flagella defects	
EE	9.0 \pm 21.9	19.2 \pm 24.0	42.8 \pm 46.6	27.0 \pm 50.2
AV	11.9 \pm 17.6	11.4 \pm 17.6	31.9 \pm 45.9	45.61 \pm 123.0

정자의 형태학적인 측면에서는 정상 정자 출현율은 전기자극(EE)과 인공질(AV)에서 각각 27.0%, 45.7%로 매우 낮았으며, 그 외 비정상정자 출현율은 전기자극(EE)과 인공질(AV)에서 각각 73%, 54.3%를 나타내었다 (Table 3). 그리고 두 처리구간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다 (P>0.05).

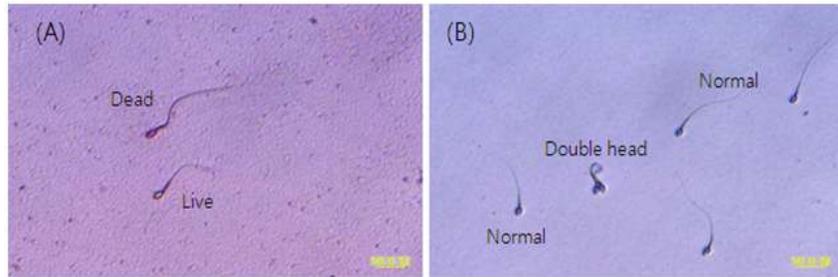


Fig 2. (A) Live- dead were evaluated by the Eosin-B (B) Morphologically of cat sperm were evaluated by the Diff quik.

본 연구의 결과를 요약하면 실험간에 채취방법에 따른 성상과 퀄리티에는 유의적인 차이는 없었으나 활력 면에서 다소 전기자극법의 정자 활동성이 떨어지는 결과를 볼 수 있었다. 그러나 생존율과 농도, 형태학적으로는 크게 다르지가 않다. 고양이는 인공질 법으로 모든 개체의 정액 회수가 가능하지가 않는다 더구나 훈련을 하는데 오랜 시간이 필요하고 어렵다. 그래서 전기 자극을 이용한 채취법은 정액 채취가 불가능한 동물에서 더욱 효율적인 방법이라 사료되며 더 나아가 RFP 유전자 형질 전환 고양이의 정액의 채취에 이를 도입한다면 고양이의 종 보존과 개량에 큰 효과를 얻을 수 있을 것이다.

○ 복제고양이 번식능력 검증

본 연구는 복제고양이의 번식능력 및 동물복제가 생식능력에 미치는 영향을 분석하기 위하여 수행 하였다. 먼저 정액은 인공질법으로 채취하였다. 간략히 인공질법은 암고양이에 hCG를 투여 후 발정유기를 하였고 발정이 유리된 암고양이를 정액을 채취하기 위한 복제고양이와 같은 사육장에 입식하여 복제고양이의 교미를 유도하였다. 암고양이가 승가를 허용하고 복제고양이가 교미를 위해 암고양이의 뒷덜미를 물었을 때 인공질을 넣어 숫고양이의 생식기를 유도하여 인공질에 넣은 후 정액의 사출을 유도하였다. 채취된 정액은 일반 성상분석을 위하여 바로 실험실로 옮겨서 정액의 농도와 총 정자수 및 색깔을 판별 하였고, 희석 Buffer에 희석 후 정자의 운동성을 분석하였다. 정자의 생존능력을 살펴보기 위하여 5% Eosin B solution에 염색하여 1000배율 현미경 아래 400정자수를 세어 두부가 연분홍색으로 염색된 것은 사멸정자로 흰색으로 염색이 되지 않은 정자는 살아있는 정자로 분류하여 생존율을 분석 하였다. 또한 기형율을 조사하기 위하여 Diff-Quick 염색 키트를 이용하여 염색 후 총 200개의 정자를 세어 기형율을 조사하였다. 조사된 복제고양이 정액의 일반성상은 다음 Table 1과 같다.

Table 1. Fresh semen parameters of cloned male cats and control (Mean \pm S.D.)

Cat	Cloned A	Cloned B	Cloned C	Control
Volume (μ L)	50.6 \pm 9.1	49.1 \pm 14.7	58.2 \pm 21.4	56.5 \pm 24.7
Sperm concentration ($\times 10^6$ /mL)	596 \pm 216 ^a	459 \pm 159 ^{ab}	321 \pm 134 ^b	680 \pm 452 ^{ab}
Motility (%)	69.7 \pm 6.3	66.1 \pm 15.9	72.5 \pm 1.9	72.8 \pm 2.0
Viability (%)	91 \pm 5.6	92 \pm 6.0	87.7 \pm 6.0	88.4 \pm 5.5
Abnormality (%)	39.4 \pm 3.4	32.1 \pm 5.7	28.5 \pm 10.0	32.1 \pm 5.5
Osmosis (mOmol/kg)	332.5 \pm 17.8	352 \pm 12.4	326 \pm 11.0	360 \pm 16.4

* a,ab,b Values with different superscript in the same column are significantly different (P < 0.05).

일반 정상분석 결과 정액의 농도는 Cloned A에서 가장 높았고 Cloned C에서 가장 낮은 결과를 보였다. 일반 숫고양이는 Cloned B와 비슷한 농도를 보였고, 다른 정상 즉 정액량, 운동성, 생존율, 기형율, 삼투압 등은 비슷한 양상을 보였다.

일반 정상분석 후 정액을 동결 Buffer에 희석하여 액체질소에 동결하였다. 동결방법은 20%의 난황이 첨가된 동결 버퍼 I 에 희석하고 12%의 Glycerol이 함유된 동량의 동결버퍼 II와 함께 4°C 냉장고에 넣어 2시간 동안 예냉 하였다. 냉각된 동결버퍼 II를 동결버퍼 I 과 희석하는데 15분 간격으로 4회에 걸쳐 희석하였다. 이때 희석량은 최초 10%를 희석하고 20%, 30%, 40% 순으로 순차적으로 양을 늘려가며 Glycerol의 피해를 최소화하는 방법으로 희석하였다. 완전히 희석된 정액은 다시 4°C 냉장고에서 20분간 버퍼간 평형을 하고 0.25 ml 스트로우에 충전한 후 밀봉을 하고 액체질소 표면 15cm 위에서 10분간 1차 냉동을 시켰다. 10분후 다시 액체질소 표면 5cm 위에서 5분간 2차 동결을 실시한 후 액체질소에 집어넣어 동결하였다. 동결된 정액은 분석 전까지 액체질소 안에서 보관하였다.

동결된 정액은 용해 후 운동성, 전진운동성, 생존율 등을 조사하였고 이모든 방법은 CASA (Computer Associate Sperm Analysis)를 이용하여 분석하였다. 용해 후 운동성 및 전진운동성, 생존율은 다음 Table 2와 같다.

Table 2. Post-thaw sperm analysis of motility, progressive motility and viability from genetically identical cloned cats and control by CASA (Mean \pm S.D.)

	Motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)
Cloned A	47.67 \pm 1.5 ^b	33.33 \pm 3.1 ^b	52.00 \pm 1.0 ^b
Cloned B	33.00 \pm 1.00 ^a	24.00 \pm 3.00 ^a	36.00 \pm 3.6 ^a
Cloned C	44.33 \pm 5.5 ^b	33.00 \pm 6.2 ^b	47.67 \pm 5.0 ^{ab}
Control	43.33 \pm 4.7 ^b	31.00 \pm 7.9 ^b	44.00 \pm 8.0 ^{ab}

* a,ab,b Values with different superscript in the same column are significantly different (P < 0.05).

동결 용해 후 정액의 운동성을 보면 Cloned B가 가장 낮은 운동성을 보였다. 마찬가지로 전진운동성 및 생존율에서도 비슷한 양상을 보였으며, Cloned A와 B는 일반 숫고양이와 비슷한 운동성 및 전진운동성, 생존율을 보였다.

동결용해 후 Diff-Quik 염색 후 기형율을 보면 동결전보다 기형율이 높았다. 두부나 미부의 기형율은 복제고양이와 일반고양이와의 차이를 보이지 않았으나 체부의 기형율은 Cloned B에서 높은 양상을 보였다. 이는 동결 후 운동성과도 비슷한 결과이다.

Table 3. After thawed, morphologically abnormal or normal spermatozoa of cloned male and control cats by diff-quick (Mean \pm S.D.)

	Morphologically abnormal sperm (%)			Morphologically normal sperm (%)
	Head defects	Midpiece defects	Flagella defects	
Cloned A	16.04 \pm 4.9	7.58 \pm 2.0 ^b	37.52 \pm 3.5	38.86 \pm 8.0
Cloned B	15.21 \pm 1.4	8.53 \pm 0.9 ^{ab}	44.78 \pm 1.9	31.47 \pm 2.0
Cloned C	14.84 \pm 4.3	7.14 \pm 1.7 ^b	38.69 \pm 3.6	39.34 \pm 8.9
Control	15.50 \pm 4.5	11.16 \pm 1.4 ^a	44.96 \pm 5.6	26.33 \pm 11.7

* a,ab,b Values with different superscript in the same column are significantly different (P < 0.05).

또한 동결 용해 후 CASA에 의한 운동성 양상을 보면 다음 Table 4와 같다.

Table 4. Post-thawed sperm analysis of curve liner, straight-line, average path velocity and straightness, linearity of cloned male cats and control by CASA (Mean \pm S.D.)

	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	STR (%)	LIN (%)
Cloned A	135.80 \pm 8.4 ^b	52.67 \pm 3.1 ^b	63.87 \pm 2.2 ^b	81.33 \pm 2.5 ^{ab}	38.67 \pm 3.5
Cloned B	167.47 \pm 2.2 ^a	71.50 \pm 6.6 ^a	88.67 \pm 4.7 ^a	79.33 \pm 4.0 ^b	42.33 \pm 4.0
Cloned C	126.67 \pm 5.0 ^b	56.57 \pm 2.7 ^b	65.00 \pm 3.5 ^b	86.00 \pm 1.0 ^a	44.00 \pm 1.0
Control	133.33 \pm 9.1 ^b	53.33 \pm 11.6 ^b	64.00 \pm 3.0 ^b	86.33 \pm 3.8 ^a	39.67 \pm 4.0

* a,ab,b Values with different superscript in the same column are significantly different (P < 0.05).

동결융해 후 정액의 수정능력을 보기 위해 In vitro fertility 를 실시하였다. 결과는 다음 Table 5와 같다.

Table 5. In vitro embryo development of with post-thawed spermatozoa of cloned male cats and control

	No. of oocytes	No. of embryos developed to (%)	
		Cleaved	Blastoyst/cleaved
Cloned A	43	32 (74.4)	11 (34.4)
Cloned B	21	15 (71.4)	4 (26.7)
Cloned C	29	25 (86.2)	12 (48.0)
Control	51	42 (82.0)	18 (43.9)

IVF 결과 Cloned A, B, C 와 일반고양이 모두 정상적인 수정능력을 보였고 통계적 유의차는 없었다. 이상으로 복제고양이의 정액 일반성상과 동결의 영향을 살펴 보았다. 본 연구를 통하여 복제고양이의 정액도 일반고양이와 비교 했을 때 다소 차이를 보이긴 하였으나 모두 정상적인 성상을 보였고 수정능력 또한 정상 이었다. 이러한 결과는 고양이에서 체세포 핵이식 방법이 생식능력에 어떠한 영향을 미치지 않고 정상적임을 증명한 것이다. 하지만 일반적으로 복제고양이에서 모두 같을 것으로 알려졌으나 정액의 성상과 동결에 대한 감수성등 약간의 차이를 보이는 것으로 나타났으며 이는 복제고양이가 완벽하게 똑같은 것이라는 가설을 뒤집는 것으로 실제로 복제고양이에서도 차이가 있을 수 있음을 나타낸다. 이러한 차이는 성장과정에서의 환경적인 영향이나, 건강 및 영양상태, 과거의 질환 경력 등 다양한 외적 요인과 유전자의 메틸레이션 상태나 미토콘드리아 DNA등 내적요인이 원인이 될

수도 있다. 이렇듯 복제고양이간 차이를 나타내는 보다 명확한 원인을 찾기 위해서는 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

○ 감염성 질병차단을 위한 예방대책 정립

실험동물을 건강하게 생존할 수 있도록 사육환경을 적절하게 유지하고 적합하게 처치를 행하여 재현성 있고 정확도 높은 실험성적을 얻기 위한 노력이 필요하다. 생명개체에서 가장 치명적으로 건강을 좌우하는 것 중 하나는 병원성 세균·바이러스이다. 병원균으로 통칭되는 세균, 바이러스 같은 미생물들은 작은 생물이므로 소수 개체에서는 인간이나 동물에 영향을 미치지 않는다(발병하지 않음). 미생물은 병원성을 나타내기 위하여 고등생물의 체내에서 맹렬한 증식을 필요로 한다. 병원성 미생물이 숙주에서 증식이 되는 조건은 숙주동물의 면역약화와 원인되는 사육시설의 위생관리가 주원인이다.

병원성 미생물의 감염을 막기 위해서 먼저 시설의 위생관리이다. 그리고 혹 병원미생물이 시설 내에 침입하였을지라도 이것이 실험동물 개체 간 또는 인간에게 전파되지 않는다면 문제는 간단하며, 전파저지의 원칙은 격리와 철저한 위생관리 등이 기본이 될 것이다. 미생물이 전파되지 않기 위해서는 개체간의 거리를 유지하거나, 또는 개체 간을 차단하는 수단으로 독립된 다른 cage를 장소를 준비하였고, 기구, 기자재의 소독작업 역시 진행하였다.

이와 비등하게 중요한 질병 예방대책으로서 백신투여가 있다. 백신 접종을 계획하기 위해 아래 표와 같이 계획(표1, 표2, 표3)을 준비하여 해당 개체의 접종시기 때 접종을 실시하였다. 백신은 FIP (프리뮤셀 FIP, 한국화이자), FIV백신 (Fel-O-Vax FIV, FORT DODGE ANIMAL HEALTH), 종합백신 (FEL-O-VAX Lv-K IV, 랫 DODGE ANIMAL HEALTH)을 각각 사용하였다.

실제 복제 수정란 이식을 위해 사육되는 대리모 사육장에 외부 새로운 대리모 고양이를 입식 시켰다. 며칠 후 그 고양이가 죽었고 부검 결과 FIP 감염으로 판명되었으나 다행이도 FIP백신을 앞서 예방접종 된 다른 고양이들의 이후 건강에는 이상이 없었다. FIP는 고양이 집단 폐사를 쉽게 일으키는 감염성 질병 중 하나이다. 최대한 외부 유입되는 새로운 고양이를 자제하고 자체 생산된 산자를 실험동물로서 사용하는 등 고양이 사육장 자체 내 정화작업 역시 동시에 진행되고 있어, 그 결과로 현재 큰 건강이상이가 있는 고양이는 없으며 이는 질병차단을 위한 이러한 접근과 방법으로 인한 효과로 보인다.

Table 1. 사육 고양이에 대한 FIP 백신 접종 계획

시기	횟수	연차
유아/성묘	유아/성묘	유아/성묘

16주령 이상

2~3주 간격 총2회
비강 접종

1년에 한 번
추가 접종

Table 2. 사육 고양이에 대한 FIV 백신 접종 계획

시기	횟수	연차
유아/성묘	유아/성묘	유아/성묘
8주령 이상	2~3주 간격 피하 주사	1년에 한 번 추가 접종

Table 3. 사육 고양이에 대한 종합백신 접종 계획

시기	횟수	연차
유아/성묘	유아/성묘	유아/성묘
8~10주령 이상	3~4주 간격 피하 주사	1년에 한 번 추가 접종

제 2절. 복제효율의 향상을 위한 다양한 방법적 제시

본 연구는 체외배양액 구성에 따라 배반포 발달률을 조사하면서 특정 유전자가 발현되는 실험동물로 활용 및 복제동물 연구의 응용성을 널리 향상시키기 위함이다.

실험은 도너고양이에 200 IU 의 pregnant mares serum gonadoreophin (PMSG) 호르몬 처리를 하여 100 IU human chorionic gonadotrophin (hCG) 를 투여 후 24 시간째 외과적 방법으로 난소를 적출하여 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 4 h 정도 체외성숙을 유도시킨 후 고양이의 정자 1×10^6 개/ml를 사용하여 체외수정을 시켰다.

체외수정 24시간 후 난구세포를 제거한 다음 각각의 체외배양액에 3일 동안 BSA 첨가한 배양액에 배양을 하였고 다음 4일 동안 FBS첨가된 배양액에 체외배양을 하면서 배반포 발달률을 관찰하였다. 발달 결과 Gomez 등 (2006)은 고양이 체외 배양액으로 Tyrode's solution 을 이용하여 최적의 결과를 얻은 반면 본 연구실에서는 TCM 배양액을 이용하여 체외 배양을 하면서 가장 효율적인 체외배양 시스템을 구축하였다.

Table 1. Effect of types culture media on in vitro development of cat embryos.

Culture media	No. of oocytes	No. (%) of	
		2, 4-cells	blastocysts
TCM	153	132 (86.27)	88 (57.51)
CR1-aa	97	75 (77.31)	39 (40.20)
Tyrode's	57	31 (54.38)	9 (15.78)

Table 1에서와 같이 TCM199 배양액의 조건에서 57.51% 배반포기 발달율을 보여 CR1-aa 및 Tyrode's 배양액의 조건보다 월등히 높은 배발달율을 얻을 수 있었다. 이러한 연구결과는 궁극적으로 복제수정란의 체외배양에 적절히 활용될 수 있는 배양체계를 구축하였다고 판단된다. 복제수정란의 체외배양은 궁극적으로 복제효율의 향상을 위해 반드시 개선되어야 할 기본 체계로서 안정적인 배양체계의 구축이 매우 중요한 조건이라고 판단된다.

체세포 핵이식 기술은 복제 동물 생산뿐만 아니라 초기 발달에서 발생 할 수 있는 여러 요인을 관찰할 수 있는 수단 중의 하나이다. 그러나 체세포 핵이식을 이용한 수정란의 초기 발달과 관련하여 생물학적으로 발생할 수 있는 mechanism 변화에 관해서는 아직도 미지의 부분이 많다. 본 연구에서는 체세포 복제 수정란 생산의

질적 향상을 위해 체세포 복제 기술 단계중의 하나인 세포 융합 방법의 개선을 통해 체세포 핵이식기술의 효율을 향상시켰다. 핵이 제거된 난자와 공여세포의 전기 융합 동안에 잘못된 핵의 재조합과 세포내의 칼슘 이온의 증가로 동반되는 난자의 활성화 이상을 유발되기도 한다. 따라서 본 연구는 HVJ-E를 이용한 fusion 방법에 따라 생산된 복제수정란의 epigenetic reprogramming에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험을 수행하였다. 특정 유전자를 이용하여 DNA methylation 변화를 관찰해봄으로써 HVJ-E를 이용한 복제연구에서 가장 큰 문제점인 reprogramming을 개선하기 위해 실행하였다.

1) 체세포 핵이식

체세포를 이용한 체세포 핵이식은 micromanipulator system을 이용하여 배양된 도나세포를 탈핵된 난자에 주입하는 방법으로 Yin 등 (2008)에 의한 방법을 이용하였다.

2) 도나 세포와 탈핵된 난자와의 융합

탈핵된 난자와 도나세포와의 융합은 GenomONE™-CF EX (Cosmobio co., Japan)을 이용하여 Kaned.Y., 등(2002)에 의한 방법을 이용하였다 (Fig 1).

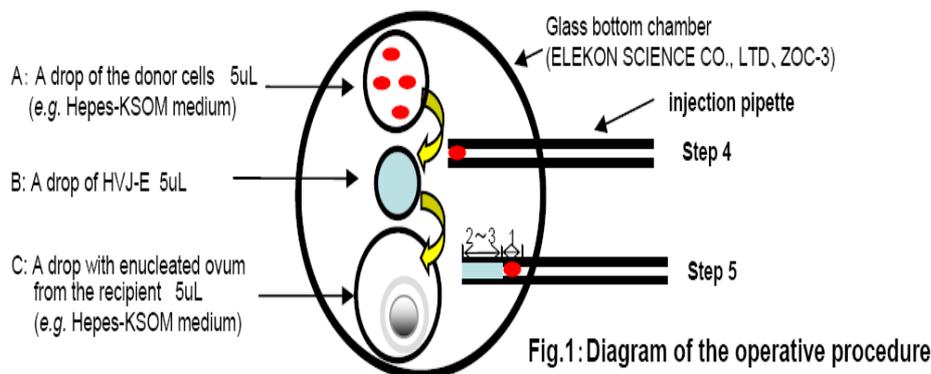


Fig 1. Diagram of the operative procedure of HVJ-E (www.Cosmobio.co.jp).

또한 대조구로써 전기융합을 이용한 융합은 Yin 등 (2008)의 방법 (Fig 2) 을 이용하여 비교 실험 하였다.

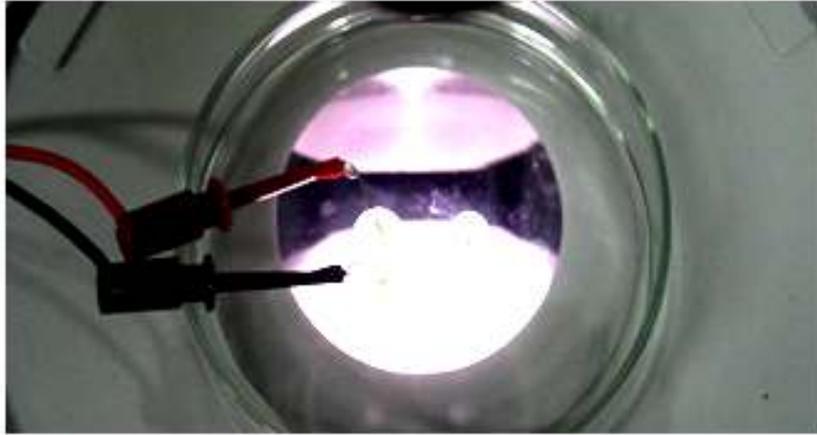


Fig 2. Electronic fusion method

3) Real time PCR을 통한 Methylation 분석

HVJ-E를 이용한 fusion 방법으로 생산된 복제 수정란의 정상적인 발달 과정에 관여하는 유전자를 확인하기 위해 상실배의 genomic DNA (gDNA)의 methylation 정도를 확인하기 위해 Real Time PCR을 실행하였다. 복제수정란 상실배 5개에서 genomic DNA를 뽑기 위해 Lysis buffer (Tris-EDTA pH 7.6) 처리하여 embryos를 lysis하고 phenol chloroform isoamyl alcohol을 이용하여 상실배의 gDNA를 추출하였다. 이렇게 추출된 gDNA는 bisulfide를 처리하고 상실배의 DNA methylation 정도를 확인하였다. 이 때 사용한 DNA primer는 Table 1.에 정리하였다. 사용되어진 상실배 gDNA 11.5ng/ul을 이용하였고, 모든 reagents를 microtube에 넣었다. real time PCR은 95°C에서 3분 15초, 57°C에서 20초 72°C 30초의 조건으로 44 cycles을 반복하여 분석하였다.

Table 2. Information of primers used for gene expression analysis by real-time PCR.

Gene	Primer	Product	Size (bp)
DNMT 1	tccggctcaacaaccctgggt		130
	agcatctccacgtctcccttctgag		
DNMT 3a	tggaaagcagtgacacgcca		103
	ccccgttggggtacagctctga		
DNMT 3b	accgaaggcggcctattcga		151
	cctcgtgcttaacggtgcc		
HDAC1	ggaccgattgacgggagggga		144
	tgcgattcggtgaggcttc		
HDAC2	ggacagggtcatccatgaaacct		111
	ggcagtggtttatggggcctac		

그 결과 지금까지 일반적으로 이용되어진 전기융합 방법과 HVJ-E를 이용한 도너 세포와 탈핵된 난자와의 융합은 HVJ-E 를 이용한 융합결과에서 fusion rate와 development rate 개선되었음을 관찰 할 수 있었다 (Table 2).

Table 3. The effect of bovine embryos development from sendai virus fusion compared with electro-fusion method.

	No. of culture	No. of fusion (%)	No. of cleaved (%)	No. of M stage (%)
SeV fusion	335	226 (67.46%)	129 (57.07%)	45 (34.88%)
Electro fusion	343	245 (71.42%)	118 (48.16%)	16 (13.55%)
Control (IVF)	273	.	221 (80.95%)	85 (38.46%)

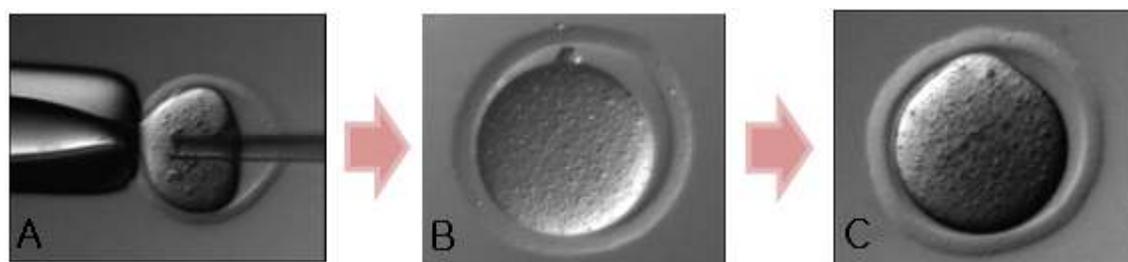


Fig 3. Transfer of the donor cell to an enucleated oocyte (A). Immediately after transplantation (the donor cell has adsorbed to the top of the enucleated oocyte; B). Fifteen to 30 minutes after transplantation (fusion of the donor cell and the enucleated oocyte by HVJ-E has been completed; C).

또한 수행하는 과정 또한 전기자극을 통한 융합보다는 수행방법이 간편한 기술이 될 수 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig 3). 또한 real time PCR을 통해 상실배 단계에서의 DNA methylation 분석 결과 전기자극을 이용한 융합에 비해 HVJ-E를 이용한 융합방법에서 reprogramming의 개선을 확인 할 수 있었다 (Fig 4).

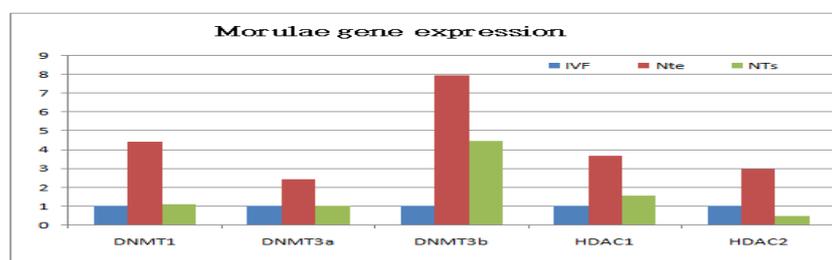


Fig 4. The analysis of morula embryo Methylation by real time PCR.

○ eCG 농도가 고양이 배반포 생산에 미치는 영향

체내유래 배반포 수정란을 생산하기 위하여, 야생고양이를 5개 그룹으로 나누어

0 (대조군), 50, 100, 200, 400 IU 의 eCG를 각각 주사하였으며, 100 hr 후에 100 IU hCG 를 주사하여 과배란을 유도하였다. 30 hr 후 수컷으로부터 신선정액 (5×10^6 /dose) 을 채취하여 외과적 방법으로 인공수정을 실시하였으며, 7일 뒤에 자궁으로부터 수정란을 회수하였다.

체외배양 배반포 생산을 위하여 동일한 농도의 eCG 처리에 따라 5개 그룹으로 나누고 hCG 처리 후 24시간 뒤에 난소적출 및 난자를 채취하고, 체외에서 0, 6, 12, 18, 24 hr 을 각각 배양한 후 제1극체의 유무를 관찰하여 시간에 따른 각 그룹 유래 난자의 체외성숙율의 차이를 확인하였다. 그리고 성숙된 난자를 이용하여 체외 수정 (in vitro fertilization, IVF), 체세포 핵이식 (somatic cell nuclear transfer, NT), 단위발생 (parthenogenetically activated, PA) 등 다양한 방법을 통해 체외 배반포를 유도하였고 그 발달율과 세포수를 비교하였다.

결과적으로, 체내수정란 생산은 200 IU의 eCG 처리군 에서 임신율과 생산효율이 가장 좋았으며, 50 IU 처리군은 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았다. 고농도인 400 IU 에서는 200 IU 와 유의적 차이가 없었다 (Table 1).

Table 1. Effect of eCG dosage on ovulation and production of in vivo blastocysts

Dosage of eCG (IU)	No. of cat used	No. and (%) of embryos collected	Total no. of collected embryos	Mean no. of blastocysts/cat
0	45	3 (6.6)a	8	0.18a
50	58	5 (8.6)a	13	0.22a
100	55	12 (21.8)b	45	0.82b
200	66	21 (31.8)c	101	1.53c
400	62	15 (24.2)b	57	0.92b

* a,b,c Values with different superscripts in the same column differ significantly (P < 0.05).

* All of treatments were injected 100 IU hCG.

그리고 200 IU 와 400 IU 처리군에서 성숙난포가 형성된 난소가 다른 처리군에 비하여 현저히 많았고, 이 두 처리군의 난소로부터 채취한 난자에서 cumulus cell 이 확장된 난자의 비율도 다른 처리군에 비하여 현저히 높았다 (Table 2; Fig. 1).

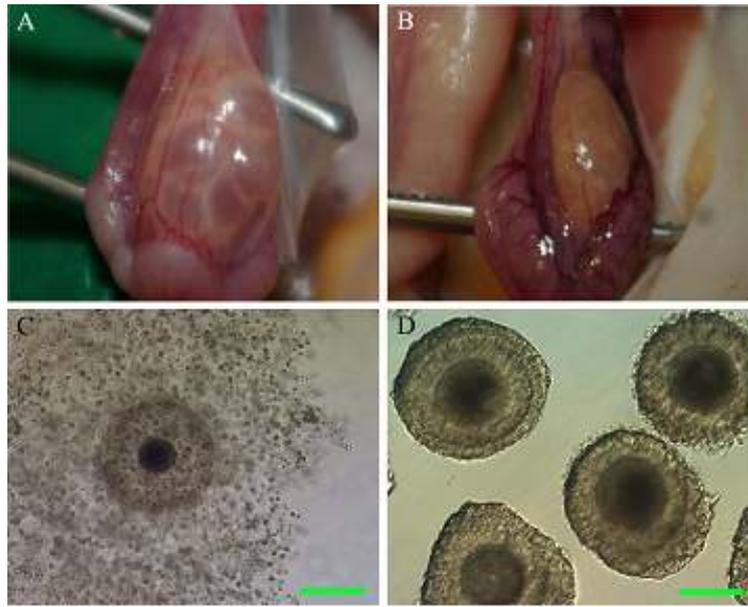


Fig. 1. Follicular responses and morphology of cat COCs recovered from ovary with hormonal stimulation. A, hormonal stimulated follicular ovary; B, non response to ovarian hormonal stimulation; C, in vivo matured oocytes with cumulus cell expansion; D, non-expanded COCs.

Table 2. Effect of eCG dosage on the number of recovered COCs

eCG dosage (IU)	No. and (%) of follicle developed cat	No. and (%) of recovered COCs			
		Non - expanded cumulus cells	Expanded cumulus cells	Total no of COCs	Mean no. of oocytes/cat
0	3 (10.0)a	379 (81.2)a	128 (18.8)a	507	16.9a
50	4 (13.3)a	386 (80.6)a	133 (19.4)a	519	17.3a
100	9 (30.0)b	353 (54.5)b	295 (45.5)b	648	21.6b
200	17 (56.7)c	248 (31.6)c	537 (68.4)c	785	26.2c
400	16 (53.3)c	273 (34.0)c	529 (66.0)c	802	26.7c

* a,b Values with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

* All of treatment groups were used 30 cats and injected 100 IU hCG.

뿐만 아니라 시간에 따른 체외 성숙율에서도 기타 처리군에 비하여 현저히 높았다 (Fig. 2).

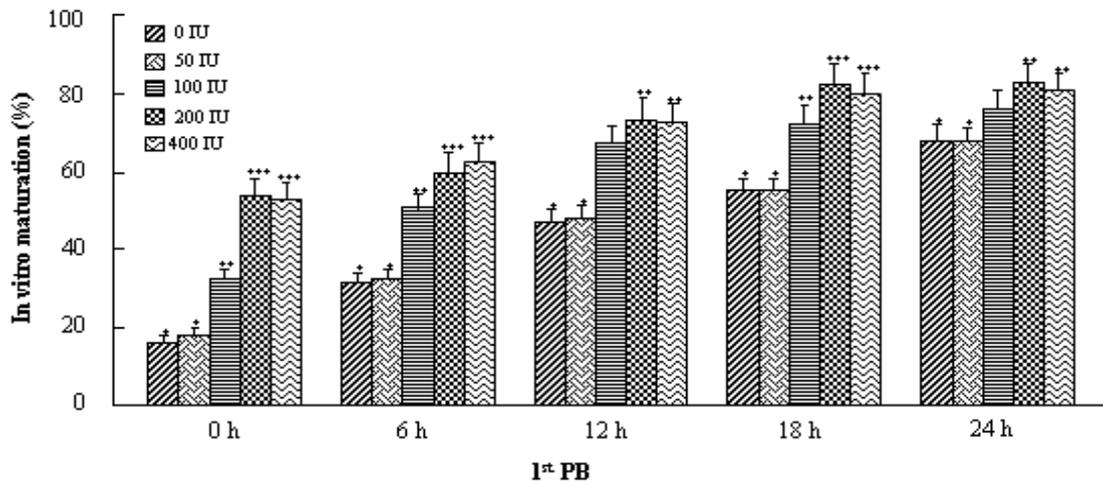


Fig. 2. Effect of in vitro culture time (0 to 24 h) on 1st PB extrusion in cat COCs recovered from 0, 50, 100, 200, and 400 IU eCG treatment groups, respectively. Bars with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

그리고 다양한 방법에 의한 체외 배반포 생산에서 체외수정 방법은 단위발생방법보다 배반포기의 생산효율과 세포수가 다소 높은 성적을 보였으며, 체세포핵이식 방법이 가장 낮은 성적을 보였다. 비록, 체내 배반포의 생산은 체외 수정 배반포 생산 효율에 비해 낮았지만 배반포의 Quality 및 세포수가 체외 생산한 배반포에 비해 월등히 높았다 (Table 3; Fig. 3).

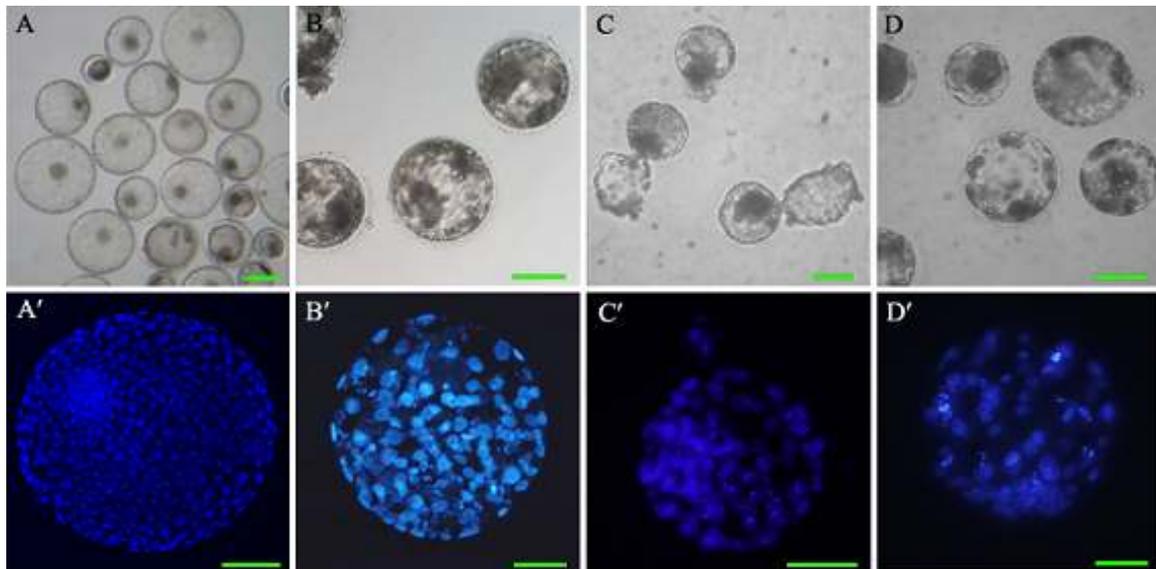


Fig. 3. In vivo and in vitro produced cat blastocysts. A, B, C, and D, In vivo, IVF, NT, and PA blastocysts (Scale bar: 200, 100, 50, and 100 μm); A' , B' , C' , and D' , In vivo, IVF, NT, and PA blastocyst stained with Hoechst 33342 (Scale bar: 100, 50, 50, and 50 μm).

Table 3. In vitro development and cell number of cat embryo by in vivo, IVF, NT and PA

Types of embryo	No. of oocyte	No. cleaved embryos (%)	No. of blastocysts (%)	Blastocysts/cleaved (%)	Total cell no. of blastocyst (Mean \pm SEM) (n)
In vivo	—	—	—	—	986 \pm 297.3a (15)
IVF	232	146 (62.9)	77 (33.2)	52.7a	125.8 \pm 27.5b (28)
NT	229	85 (37.1)	13 (5.7)	15.3b	37.5 \pm 15.8c (7)
PA	118	93 (78.8)	28 (23.7)	30.1c	85.2 \pm 21.3d (19)

a,b,c Values with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

○ Clone cat 유래 태반에서 발현되는 단백질 패턴 분석

이전 연구를 통해서 확인된 복제 고양이 태반에서의 이상 발현 단백질 (prohibitin, cathepsin D)과 세포사와 관련된 단백질의 발현이 fetus의 생명을 유지하는 태반의 세포사를 유도하는 것을 western bolt, 활성산소의 발현, 효소의 발현, 미토콘드리아 분포와 유전자의 발현을 통해서 확인을 할 수 있었다. 그래서 in vivo에서 복제 고양이 유래 태반에서 가식적인 세포사를 확인하기 위해서 TUNEL stain assay를 이용하여 세포사의 위치를 확인하였다 (Figure 1). Negative control과 positive control을 각각 준비하여 control과 clone 태반에서 세포사가 일어나는 것을 확인한 결과 Fig 12에서 보는 바와 같이 control은 negative control과 같은 세포사가 거의 일어나는 부위가 없는 것을 확인 할 수 있지만 clone 태반에서 positive control과 마찬가지로 태반의 전반적인 부위에서 세포사가 일어난 것을 확연하게 확인할 수 있었다.

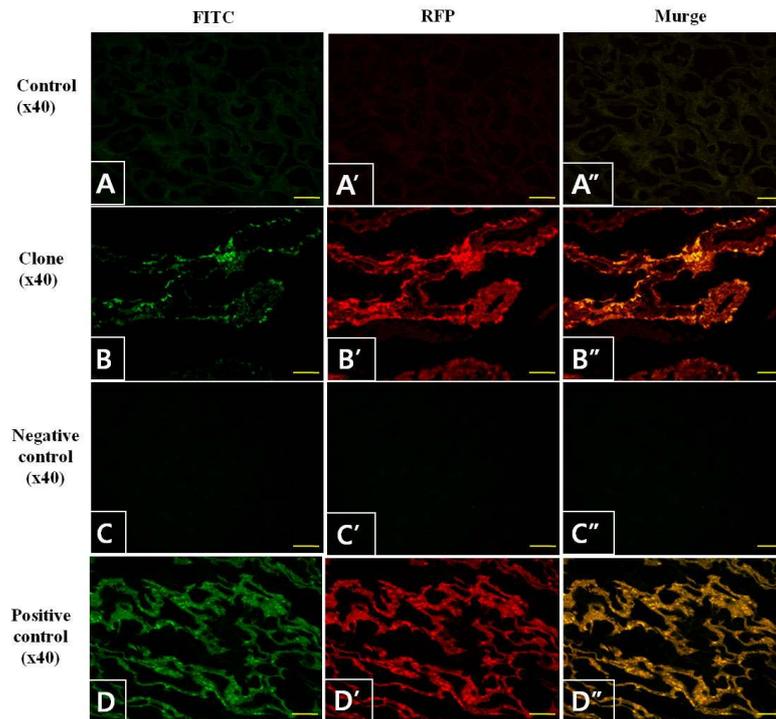


Figure 1. analysis of placenta cell apoptosis by TUENL assay. In control term placentas (A, A' and A''), apoptotic cells were rarely detected. In contrast, a marked increased in TUNEL-positive cells was observed in cloned term placenta (B, B' and B''). Negative controls are shown in C, C' and C'' and positive controls in D, D' and D''.

이렇게 동정된 단백질 간의 어떠한 상관관계를 보이는지 확인하기 위해 I²D database을 이용하여 동정된 단백질 간의 상호관계를 보고되어진 여러 논문의 database (BIND, DIP, HPRD, IntAct and MINT)를 바탕으로 동정된 단백질 간의 연관 관계를 예측 할 수 있었다. Fig 2 를 보면 I²D database를 통하여 각 단백질 간의 accession no. 정보를 이용하여 NAViGaTOR software로 동정된 단백질 간의 연계성 을 가시화 할 수 있었다. 동정된 12개의 단백질은 468개의 연결된 네트워크 를 이루고 있으며 상호간 interactions하는 것을 알 수 있었다.

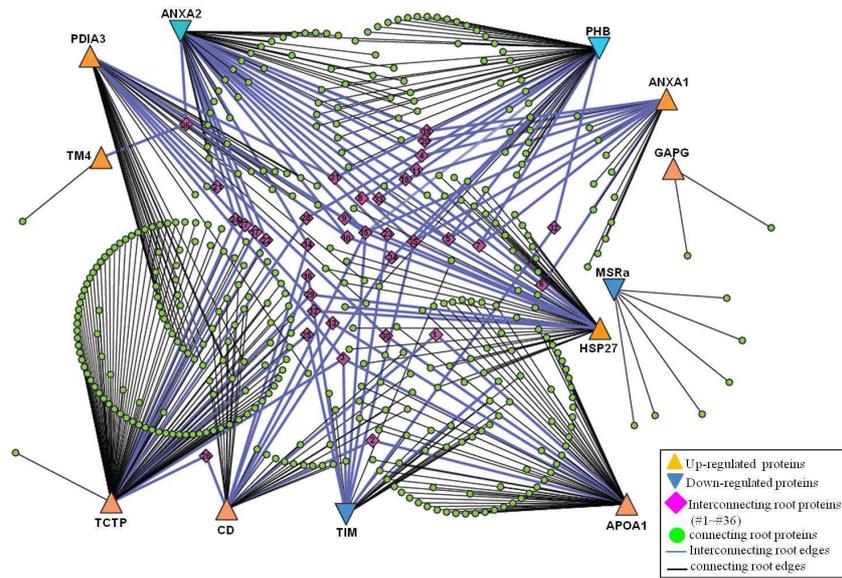


Fig 2. I²D protein-protein interaction search results. Identified proteins of cloned term placenta were search against human proteome using the I²D database. protein-protein interaction network is visualized and graphed using NAViGaTOR software. △; up-regulated proteins, ▽; down-regulated proteins, ◇; interconnecting root proteins (#1 ~ #36; supplementary Table 1.), ○; connecting root proteins, -; interconnecting root edges, -; connecting root edges.

이와 같은 결과는 태반의 정상적인 기능과 환경을 산자에 제공하지 못하고 산자의 발달과 생존에 영향을 주어 분만 전·후 산자의 생존성에 지대한 영향을 미치는 것으로 판단이 된다. 이러한 유전자를 조기에 조절을 함으로써 복제고양이 생산의 증대와 형질전환 복제고양이의 생산성의 향상과 나아가 멸종위기동물의 복원에 일조할 수 있을 것으로 기대된다.

·복제 임신초기 태반에서 발현되는 단백질 발현패턴 분석 및 동정

이미 분만된 복제고양이 유래 태반의 단백질 동정은 이미 확인하였으며 control과 비교했을 때 여러 유전자의 이상 발현이 확인되었다. 게다가 이미 여러 연구사에서도 볼 수 있듯이 다양한 복제동물 중에서 임신 초기에 유산이나 사산되는 경우가 빈번히 보고되어졌고 이러한 현상은 다양한 원인들이 보고되어지고 있지만 태아의 생존력을 담당하는 태반에서 이상이 빈번히 보고되었다. 조기 유산이나 조기 임신의 실패는 복제고양이에서도 종종 나타났다. 그래서 이러한 문제점을 해결하고 복제동물 생산의 향상을 위해서 임신 초기인 21일령 복제고양이 유래 태반을 회수하여 복제고양이 태반의 이상 유·무를 확인하고 어떤 문제점이 있는지 확인하기 위해 프로테오믹스란 기술을 이용하여 태반의 발달과정의 문제점을 파악하고자 하였다.

체세포 복제기술을 이용하여 이미 복제 고양이와 형질 전환 복제 고양이 생산을 성공하였지만 그 성공률은 아직 낮다. 임신 초기에 사산이 되는 경우를 이전 경험을 토대로 그 원인을 분석하기 위해서 21일령 복제고양이 유래 태반을 분석을 하였다. Figure 3.에서 보는 것과 같이 복제고양이 유래 태반의 형성과 혈관형성이 control에 비하여 확연한 차이가 나는 것을 알 수가 있었다. 임신초기의 혈관형성이나 태반의 정상적인 형성과 기능은 산자의 생존과 밀접한 관련이 있기 때문에 중요하다.

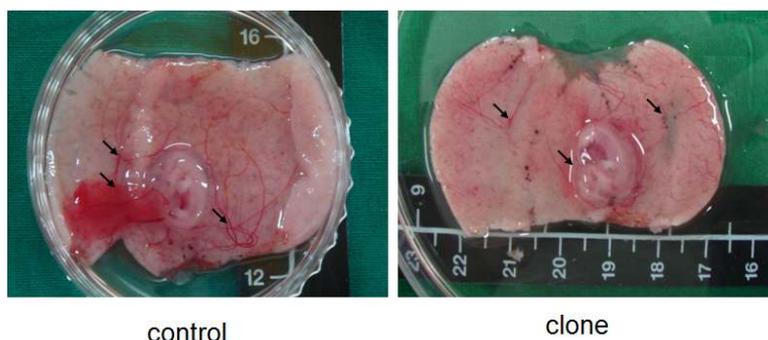


Figure 3. Control and SCNT fetus and placenta tissue on the 21th day of pregnancy. The SCNT-derived placenta tissue was observed small-size compared with control. Additionally, defective blood vessel development was observed in SCNT-derived placenta tissues.

정상적인 태반 형성에 있어 태반조직 형성이 불완전하거나 혈관형성이 결핍되어 정상적인 발달이 이루어지지 않으면 산자의 생존력을 감소시키게 된다. 이렇게 복제 고양이의 태반형성과 혈관형성의 결핍현상의 원인을 규명하고자 회수한 태반의 총 단백질을 추출하여 그 농도를 확인하였다. 추출한 단백질의 분리 정도를 확인하기 위해서 SDS-PAGE로 확인을 하였다 (Fig 4).

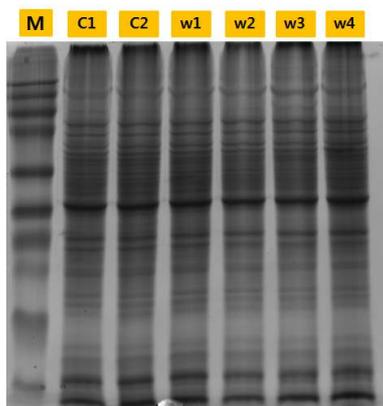


Fig 4. 12.5% SDS-PAGE of early-stage cloned placenta proteins. M; marker, C1 and C2; cloned placentas, W1~W4; control placentas.

6	6	16915/8.46	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) phosphoinositide-3-ki	28189771	51	75	up
7	7	24230/5.17	nase, regulatory subunit 3 (gamma) BMP and activin	gi56205425	22	44.4	up
8	8	24448/7.2	membrane-bound inhibitor homolog precursor	73948824	18.1	57	up
9	9	26542/6.4	Rab15 effector protein	114645541	28.8	66	up
10	10	21619/8.9	adenylate kinase 1	62898734	40.2	87	up
11	11	25653/8.5	Glutathione S-transferase A2	149642068	12.1	36	up
12	12	29587/9.8	40S ribosomal protein S3a	P61246	15.8	50	up
13	13	41630/4.9	HSPA8 protein	158262600	17.3	60	up
14	14	36948//6.2	Padi2 protein , Recombinant Rat Annexin V, Quadruple Mutant	126153395	13.3	45	up
15	15	49625/5.1	PDIA6 protein	151553573	19.2	50	up
16	16	49767/8.65	beta-1,3-galactosyl- O-glycosyl-glycoprot ein beta-1,6-N-acetylglu cosaminyltransferase	gi21614523	13	100	up
17	17	42764/7.7	cathepsin D protein	56417363	8.6	80	up
18	18	49721/5.9	RuvB-like helicase 1	Q4WPW8	12.2	66	up
19	19	21048/8.3	Triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-phosphate isomerase) isoform 2	73997310	45.1	60	up
20	20	47139/7.01	enolase 1	gi4503571	17	63	up

No	Spot	MW/PI	Protein name	Accession No.	Cov(%)	Match	U/D
21	21	77708/9.1	NF-kappa-B-repressin g factor	Q8BY02	7.0	40	up
22	22	55347/6.4	SH2 domain containing 3C	gi194033623	17	54	up
22	22	56252/8.43	Cytochrome P450 2B12 (CYPIIB12)	gi62639273	13	55	up
24	24	53285/6.9	Calcium-binding mitochondrial carrier	A5PJZ1	10.3	36	up

25	25	54962/5.74	protein SCaMC-1 sorting nexin 4 isoform 2	gi114588954	14	83	up
26	26	60266/7.53	TROVE domain family, member 2 isoform 2 chaperonin containing	gi76636871	12	50	up
27	27	57432/6.0	TCP1, subunit 2 isoform 1 unnamed protein	73968673	15.5	60	up
28	28	37349/5.5	product , Actin, cytoplasmic 1 [BOVIN]	194375899	23.1	77	up
29	29	41005/5.6	beta-actin	14250401	23.6	46	up
30	30	41736/5.4	actin, beta	197099682	27.7	61	up
31	31	46382/4.3	calreticulin [CATTLE, BRAIN, PEPTIDE, 400 AA]	545920	17.5	58	up
32	32	58761/6.9	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) protein disulfide	74005076	27.4	76	up
33	33	76009/8.9	isomerase-associated 3 precursor protein disulfide	74000349	11.8	66	up
34	34	76009/8.9	isomerase-associated 3 precursor protein disulfide	74000349	19.4	61	up
35	35	76009/8.9	isomerase-associated 3 precursor	74000349	21.0	73	up
36	36	77690/9.80	NF-kappaB repressing factor A-kinase anchor	gi78191784	9	42	up
37	37	93117/6.2	protein 4 isoform 1 isoform 2	74006942	8.1	66	up
38	38	15956/7.3	Hemoglobin subunit beta-2	55584062	48.6	75	up
39	39	15915/7.25	Hemoglobin subunit beta	gi729688	42	23	up
40	40	15248/8.72	alpha 2 globin [Homo sapiens]	gi4504345	26	36	up

복제고양이 유래 태반에서 40개의 proteins이 up-regulated 되었으며 (Table 2), 이와 반대로 49개의 proteins은 down-regulated 된 것을 확인 할 수 있었다 (Table 3).

Table 3. Identification of down-regulated proteins derived from early-stage cloned cat placenta

No	Spot	MW/PI	Protein name	Accession No.	Cov(%)	Match	U/D
1	41	11106/8.84	C19orf12 protein	gi3945269	17	27	down
2	42	10945/9.9	serine/threonine protein kinase 11	149435685	26	83	down
3	43	4629/9.69	dopa decarboxylase	gi62006170	73	13.3	down
4	44	19893/5.1	Diamine acetyltransferase 1	Q28999	27.5	36	down
5	45	21229/6.2	cell division cycle 42	73952550	24.1	50	down
6	46	18706/5.3	myosin light chain 2 isoform 2	114646958	27.1	40	down
7	47	28141/5.39	apolipoprotein A-IV	gi563320	16	37.5	down
8	48	19003/9.5	mitochondrial ribosomal protein S24	114613007	32.3	50	down
9	49	24147/8.1	RAB21, member RAS oncogene family	115496760	33.3	50	down
10	50	26239/4.9	centromere protein H, isoform CRA_b	119571690	25.4	66	down
11	51	21644/5.7	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2 isoform 3	74003810	29.5	50	down
12	52	65910/5.2	albumin	30962111	10.8	50	down
13	53	29745/8.3	RIKEN cDNA 4930583C14 gene Tyrosine-protein	114685397	22.9	36	down
14	54	37366/5.9	phosphatase non-receptor type substrate 1 precursor	109092636	13.8	57	down
15	55	32722/4.8	40S ribosomal protein SA (p40)	109100789	16.9	57	down
16	56	28065/5.2	Centromere protein H	Q3T0L1	15.2	50	down
17	57	24312/8.7	GTP:ATP phosphotransferase Triosephosphate isomerase (TIM)	33150530	20.5	66	down
18	58	26715/6.9	(Triose-phosphate isomerase) isoform 1	57106546	41.8	50	down
19	59	31741/6.4	chimaerin 1, growth hormone-like protein 5	189098231	18.5	45	down
20	60	31359/6.1	chimerin (chimaerin) 1 isoform 3	109100158	21.1	44	down

No	Spot	MW/PI	Protein name	Accession No.	Cov(%)	Match	U/D
21	61	30342/6.5	CYP20A1 protein	81674786	19.1	40	down
22	62	28047/5.22	centromere protein H	gi77735423	25	41	down

23	63	25970/7.7	glutathione S-transferase M1	6754084	33.5	50	down
24	64	27335/5.68	5-azacytidine induced gene 2	gi149018302	23	56	down
25	65	28522/4.7	tropomyosin 1, alpha isoform 2	4507651	28.2	75	down
26	66	32270/5.5	spermidine synthase tropomyosin 1 alpha	149695532	22.1	50	down
27	67	30965/4.7	chain isoform 7 isoform 8	109081421	18.5	66	down
28	68	32080/5.24	beta-actin [FELIS CATUS]	gi11191964	26	56	down
29	69	43176/6.2	Phosphoglycerate kinase 1	62642907	15.8	57	down
30	70	53813/5.5	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	P1724	10.7	44	down
31	71	40351/7.5	phosphoglycerate kinase 1 isoform 4	109131310	14.3	66	down
32	72	30401/5.77	unnamed protein product	gi194374345	32	53	down
33	73	34444/6.9	protein disulfide isomerase-associated 3 precursor	169409566	15.0	60	down
34	74	41857/6.36	Chain A, 70kd Heat Shock Cognate Protein Atpase Domain, K71a Mutant	gi157831589	28	57	down
35	75	34790/10.5	fibroblast growth factor 22	126323748	13.6	50	down
36	76	37476/8.2	mCG19980	148670961	25.8	33	down
37	77	60998/5.7	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	Q5NVM5	25.0	63	down
38	78	65910/5.2	albumin	30962111	13.7	100	down
39	79	65910/5.2	albumin	30962111	11.6	83	down
40	80	55578/6.6	Perilipin	Q8CGN5	12.8	36	down

spot	spot	MW/PI	protein name	Accession No.	Cov(%)	Match	U/D
41	81	37107/4.5	Calumenin precursor	O43852	16.508	100	down
42	82	47485/7.1	MDN1, midasin homolog	109072093	14.8	25	down
43	83	46063/4.9	Keratin, type I microfibrillar, 47.6 kDa	P25690	24.8	33	down
44	84	45967/4.30	calreticulin isoform 4	gi73986464	6	57	down
45	85	29074/5.39	prohibitin isoform 3	gi109114262	38	77	down

46	86	34356/6.6	5-azacytidine induced gene 2, isoform CRA_a tropomyosin 1 alpha	148677310	17.8	57	down
47	87	30946/4.7	chain isoform 7 isoform 8	gi109081421	20	55	down
48	88	34537/8.5	Serine/threonine-protein kinase Nek7	Q9ES74	14.9	21	down
49	89	65910/5.2	albumin	30962111	8.6	57	down

동정된 up-regulated proteins 중에 main function을 조사한 결과 혈관형성과 관련된 단백질인 beta-actin and phosphoglycerate kinase 1과 외부자극이나 환경의 의한 스트레스반응을 나타내는 단백질인 heat shock protein family (8kDa, 10kDa and 60kDa)등의 발현도 증가됨을 알 수 있었고, 모체와 산자간의 면역을 담당하는 alpha-enolase 1, adenylate kinase 1 and peptidylprolyl isomerase A 뿐만아니라 endocytosis와 intracellular trafficking 관련 단백질은 sorting nexin 4의 발현이 증가됨을 확인 할 수 있었다. 이와 반대로 Down-regulated proteins 중에 cell motility와 antiangiogenic activity와 관련된 protein인 tropomyosin과 apoptosis와 연관된 유전자인 prohibitin은 그 발현정도가 control과 비교했을 때 감소되는 것을 확인 할 수가 있었다. 이와 같이 복제고양이 유래 태반에서 발현되는 유전자들이 정상 태반에서 발현되는 유전자간의 많은 차이를 보이는 것을 이번 연구를 통해서 알 수 있었으며, 이러한 유전자의 이상발현이 아마도 복제동물 생산의 저하에 영향을 미치며 복제동물의 생존성에도 지대한 영향을 줄 것이라 예상 된다. 정확한 시기의 적절한 유전자의 발현을 조절 할 수만 있다면 복제동물의 생산성과 생존성의 향상을 기대할 수 있으며 나아가 멸종 위기종의 복원에도 이바지 할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3절. Tetracycline을 이용하여 유전자 발현을 조절 가능한 virus vector 구축

본 실험실에서는 복제고양이 생산을 위함에 있어 질환모델동물을 생산 연구하고자 tetracycline계의 유전자와 marker 유전자 GFP (Green fluorescence protein)를 이용하여 virus vector를 구축한 후 고양이의 체세포에 transfection을 유도하여 이 유전자를 지닌 형질전환 복제고양이를 생산하여 질환모델 복제고양이를 생산하고자 이를 수행하였다.

Retrovirus의 생산과 표적세포의 감염

구축한 pTet2-GPTW vector DNA 10 µg을 PT67 세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 1,500 µg/ml의 hygromycin B가 첨가된 배양액에서 2주간 배양하였다. 선별된 PT67-Tet2-GPTW 세포의 배양액을 수확하여 GP2 293 세포에 infection하였으며 1,500 µg/ml의 hygromycin B가 첨가된 배양액에서 2주간 배양하였다. 구축된 GP2 293-Tet2-GPTW 세포에 pVSV-G plasmid DNA 10 µg을 calcium phosphate 방법으로 transient transfection한 후 virus 배양액을 수확하였다. 이 virus는 본 연구실에서 확립한 표적세포인 흰털을 지닌 커티쉬 앙골라 암고양이의 피부세포 (WCFE)에 5 µg/ml의 polybrene을 첨가하여 infection하였으며, 1,500 µg/ml의 hygromycin B가 첨가된 배양액에서 2주간 배양하였다. 선별된 colony는 계대배양하여 충분한 세포수를 확보한 후 다음 실험에 사용하였다.

pTet2-GPTW retrovirus vector의 구조



Fig. 1. Structure of Tet2-GPTW. LTR, LTR, long terminal repeat; Hyg^r, Hygromycin resistant gene; TREtight, which contains a modified TRE upstream of an altered minimal CMV promoter; EGFP, enhanced green fluorescent protein gene; PGK, phosphoglycerate kinase promoter; rtTA2^{SM2}, rtTA consist of the reverse tetracycline repressor (rTetR) fused to a VP16 transactivation domain; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

제 4절. RFP 형질전환 복제고양이 염색체 검사

○ RFP TG cat 염색체 내의 RFP 유전자 삽입 위치 확인을 위한 FISH 방법 정립

형질전환에 사용한 적색형광단백질 유전자(RFPgene)가 염색체내에 삽입된 위치(insertion site)를 FISH를 이용하여 명확히 밝히고자 본 실험을 시행하였으며, 현재까지 고양이의 염색체 분염분석과 염색체 분리 기법이 확립되어 염색체 검사가 이루어졌었고 FISH실험을 위해 본 연구가 진행되었다.

방법으로는 RFP 형질전환 고양이의 핵형검사는 선행되었고 FISH 작업을 위하여 RFP (target) 특정 프로브를 Dig nick translation mix kit (Roche, Mannheim, Germany)에 label 시켰다. label된 100 ng의 프로브를 Salmon sperm DNA와 Hybridization mixture (50% formamide, 10% dextran sulfate (Sigma), 2XSSC)와 혼합시켜, 75 °C에 5분 동안 denature시킨 후 37°C에 하룻밤 incubator에 저장하였다. 슬라이드를 30분 동안 45 °C에 2× SSC와 50% formamide에 씻은 후 5분 동안 2× SSC에 씻었다. 4xSSC/0.1% Tween20에 한 차례 rinse한 후, 30분 동안 37 °C에 3% BSA 첨가된 곳에서 block 처리하여 다시 1시간 동안 37 °C에 fluorescein avidin DCS (Vector Laboratories INC., Burlingame, USA) 또는 Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Roche, Mannheim, Germany)와 incubator에 저장하였다. 15분 동안 4xSSC/0.1% Tween20에 씻은 후, 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories Inc.)에 대조 염색을 하였다. FISH 이미지는 Leica DMRXA2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 현미경을 통해 관찰하였으며, CoolSNAP cf digital camera (Roper Scientific photometrics, Tucson, USA)으로 촬영하였다. 분석은 Analyzed using Leica CW4000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 사용하였다.

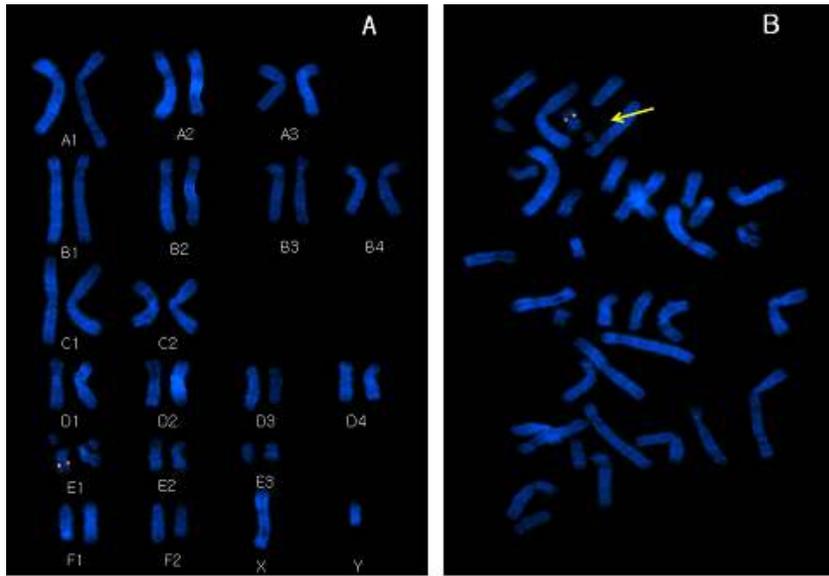


Fig. 1. Localization of the RFP(target) specific probe to the cat chromosome E1 (A, B).

고양이의 염색체는 18쌍으로 36개 염색체로 구성되어 있다는 것은 선행 실험으로 확인 되었었고, RFP을 발현시키는데 관여하는 유전자가 TG-A(Fig 1) 경우 E1에 위치하고 있음을 보았고, TG-C의 경우 D1 염색체에 각각 위치해 있는 것을 알 수 있었다 (Fig 2). 이로써 RFP 발현 유전자가 삽입된 곳이 TG-A와 TG-C의 염색체 좌위 확인과 그리고 서로 다른 곳에 삽입된 것을 확인하였고 상기 유전자의 발현이 삽입된 위치와 상관없이 발현된다는 점을 알 수 있었다. 향후 그 유전자의 germ line transmission 분석을 위한 형질전환 고양이와 일반 고양이 사이에서 생산된 F1 세대의 고양이에서 TG-A와 TG-C의 유전자가 어떻게 전이되는지를 밝히는 작업이 계획 · 진행 중이다.

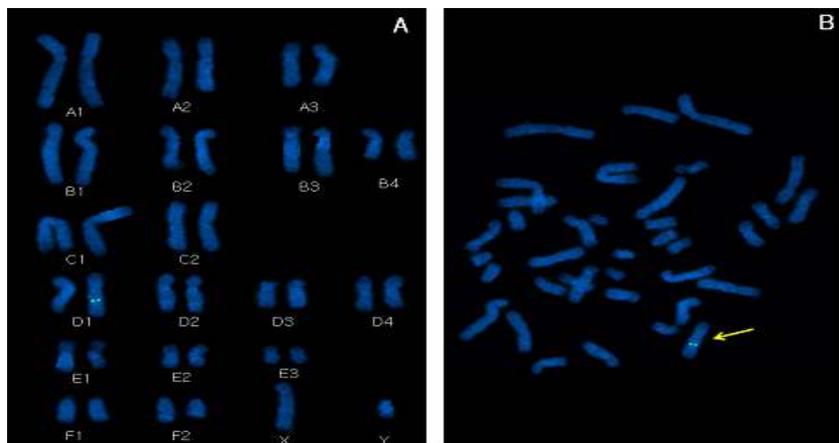


Fig. 2. Localization of the RFP(target) specific probe to the cat chromosome D1 (A, B).

제 5절 줄기세포 관련 유전자 cloning

○ 고양이 유사배아줄기세포 분리배양 및 검증

고양이 배아줄기세포를 분리유도하기 위하여 체내유래 배반포로부터 기계적 방법으로 내세포괴 (Inner cell mas) 를 분리하여 FBS-배지와 KSR-배지에서 각각 키워 초기 내세포괴의 부착율과 증식율을 비교하였다. 결과 KSR-배지에서 초기유사 배아줄기세포 부착율은 FBS-배지 보다 좋은 성적을 보였으나 세포의 증식율은 FBS-배지가 더 높았다 (Table 1; Fig. 1.2).

Table 1. Isolation of ES-like Cells from In Vivo-Derived Blastocysts Cultured in KSR- or FBS-medium

Culture medium	No. of blastocysts used	No. of attached ICMs on Day 1 (%)	No. of colonies on Day 2-3 (%)	No. of ES-like cells per colony on day 5 [Mean \pm S.E.M (n)]
KSR-medium	52	46 (88.5)a	32 (61.5)a	476 \pm 65 (5)a
FBS-medium	49	32 (65.3)b	18 (36.7)b	972 \pm 89 (5)b

* a,b Values with different superscripts in the same column differ significantly (P < 0.05).

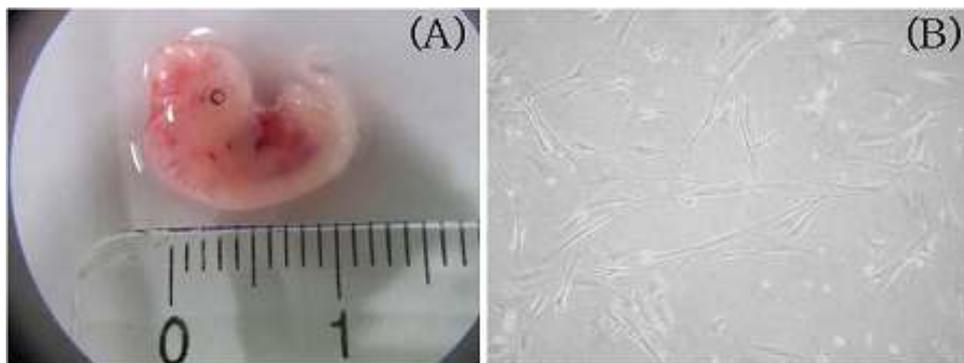


Fig. 1. Cat embryonic fibroblasts (cEFs) derived from a cat fetus. (A) The fetus was collected from a female cat after 4 weeks of gestation. (B) Proliferation of cEF cells during culture (100 \times).

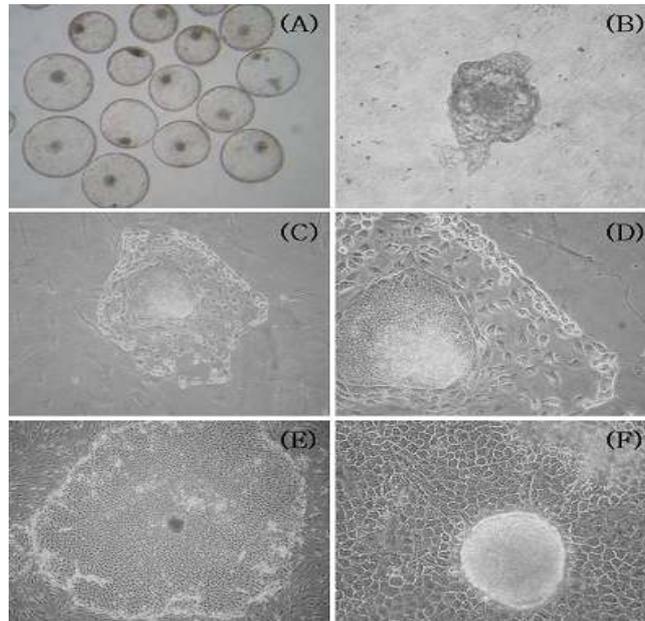


Fig. 2. Cat ES-like cells derived from in vivo-produced blastocysts after their growth on cEF feeder layers. (A) In vivo-produced blastocysts (63 \times). (B) ICM of a blastocyst (100 \times). (C-F) Formation on day 5 of cat ES-like cell colonies in KSR-medium (C, 100 \times D, 200 \times) or FBS-medium (E, 40 \times F, 200 \times).

FBS-배지에서 유도한 32개의 고양이 유사배아줄기세포군체 (Colony)와 KSR-배지에서 유도한 18개의 유사배아줄기세포군체를 기계적인 (Mechanical) 방법과 효소적 (Enzymatic) 방법 등 두가지 방법으로 각각 계대 (Passage) 하였다. 그 결과 효소적 방법으로 계대한 유사배아줄기세포는 계대한 즉시 분화된 반면 기계적 방법으로 계대한 유사배아줄기세포는 보다 장기간 미분화 상태를 유지하였다 (Table 2).

Table 2. Progressive Loss of Cat ES-like Cell Line Viability Upon Prolonged In Vitro Culture After Enzymatic or Mechanical Dissociation

Culture medium	Method used to dissociate colonies	No. of primary cultures	No. of cell lines surviving to passage					
			1	2	3	4	5	6
KSR	Enzymatic	12	4	0	0	0	0	0
	Mechanical	15	9	4	2	1	0	0
FBS	Enzymatic	6	3	1	0	0	0	0
	Mechanical	7	4	3	3	2	2	2

이렇게 유도한 유사배아줄기세포들은 핵이 크고 세포질이 적은 배아줄기세포의 형태학적 특징을 갖고 있었으며 미분화 상태의 배아줄기세포 검증은 alkaline phosphatase (AP), Oct4, SSEA-1, SSEA-3와 SSEA-4 와 같은 줄기세포 특이성 마커 (Marker) 들을 사용하여 검증하였으며 그 결과 이러한 마커 들이 명확히 발현됨을 확인하였다 (Fig. 3).

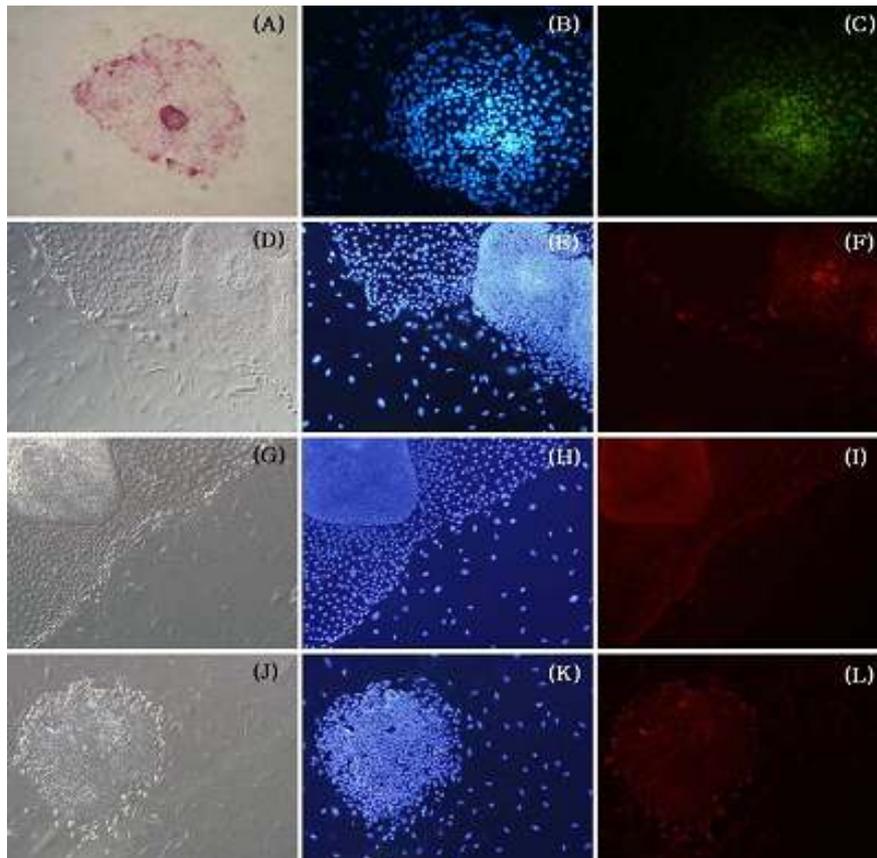


Fig. 3. Characterization of an undifferentiated passage 3 ES-like cell colony. (A) Expression of AP (100 \times). (D, G, J) Phase contrast imaging of ES-like cells. (B, E, H, K) Counterstaining with Hoechst33342. (C, F, I, L) Immunofluorescence staining to detect Oct-4, SSEA-1, SSEA-3 and SSEA-4 expression, respectively (100 \times).

유사배아줄기세포의 분화능력을 검증하기 위하여 우선 배아체 (embryoid bodies, EBs) 를 만들었고 배아체를 조직배양접시에 배양시킨 결과 유사 상피세포, 유사 신경세포 등으로 분화된것을 형태학적으로 확인 하였으며 배아체에서 중배엽 마커 인 Desmin 의 발현을 확인하였다. 또한 일부 유사배아줄기세포군체 (colony) 는 배양 과정에서 자율적으로 박동하는 심근세포로 분화되었으며 이또한 심근세포 특이성 마커인 α -actinin 의 발현으로 검증하였다 (Fig. 4). 본 결과는 우리가 고양이 유사 배아줄기세포를 분리배양하는데 성공했음을 시사한다.

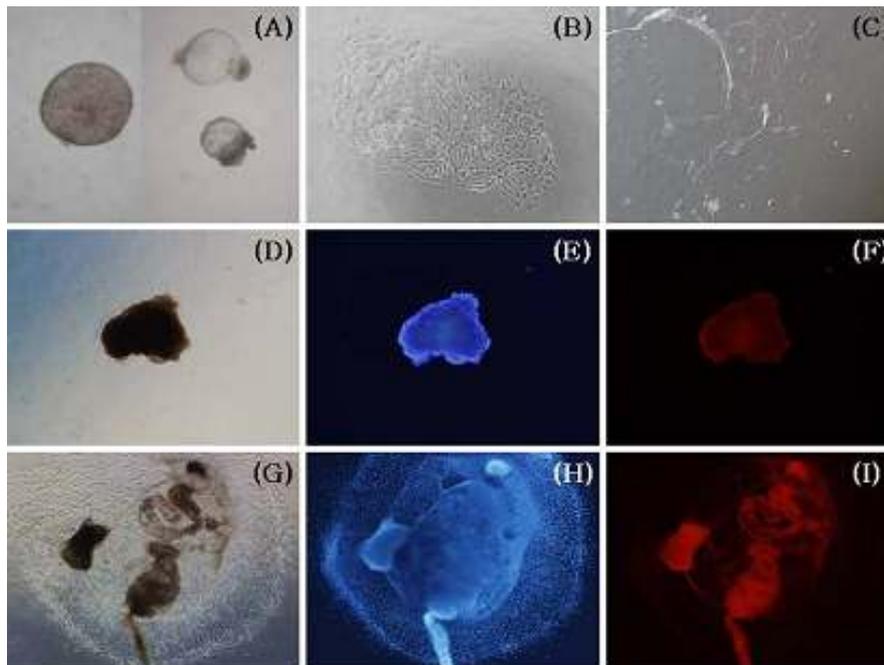


Fig. 4. Differentiation of EBs into various cell types. (A) A simple EB (Left) and cystic EB (Right) (40 \times). (B) An epithelium-like cell (100 \times). (C) Neuron-like cells (200 \times). (D) Phase contrast imaging of EB from cat ES-like cells (40 \times). (E and F) The same EB showing counterstaining with Hoechst33342 (blue) and immunofluorescence staining with mesoderm marker, desmin (red) (40 \times). (G) Phase contrast imaging of ES-like cell colony that spontaneously differentiated into myocardiocytes after 2 weeks of culture (40 \times). (H and I) The same colony showing counterstaining with Hoechst33342 (blue) and immunofluorescence staining with α -actinin (red) (40 \times).

○ 고양이 다능성 유전자의 클로닝

고양이 유사배아줄기세포의 분리배양에 성공한후 배아줄기세포 검증에서 매우 중요한 두 다능성 유전자 (Pluripotency gene) 인 POU5F1 와 NANOG 염기서열이 고양이에서 아직 밝혀지지 않았기 때문에 이 두 유전자를 클로닝 함으로써 고양이 배아줄기세포 검증과 고양이 유전학 연구에 이용하고자 하였다. 고양이 POU5F1 와 NANOG 두 유전자의 coding sequences (CDSs) 부분을 밝혀내었고 사람과 마우스 유전자와의 상동성을 분석한 결과 고양이 POU5F1 유전자는 뉴클레오티드 레벨 (nucleotide level) 에서 사람과 마우스와 각각 92%와 82%의 상동성을 보였고 아미노산 레벨 (amino acid level) 에서는 각각 94%와 83%의 상동성을 보였으며 POU5F1 의 CDS 에서 POU 특이성과 POU homeodomain sequences 를 확인하였다 (Fig. 1).

Cat	-----RTWLSFQGPFGSSGIGPGVGPGAIVVGI	28
Human	MACHLASDFAFSPPPCGGGDCPCGPEPCWDDP.....P.....S.....	60
HouseSA.L.....I...S...L..	55
Cat	PPCPDPYEFCCGNTYCCPQVCVCLVPCGGLTSQPECHPCACVENSERGASPEPCAAPP	88
HumanA.....A.V.....D.....TVT..	120
House	S...A.....A.....L.....V.V..L....QA.AR.....E.T.S...ADR.N	115
Cat	AUKPDKKLEQNTESQDIKALQKLEQERKLLKQKRITLGYTQADWGLFLCVLFCRVFS	148
Human	...LE...P.....E.....	180
House	...LE.--V.PTP...M...E.....	173
Cat	<u>QTTICREERLQLSEFKMCKLRPLLQKVVHEADNNE</u> <u>SLQICFAETLVQARKKRY</u> <u>SIENR</u>	208
HumanN.....	240
HouseL.....E.....N.....S.....	233
Cat	<u>VRCNLENQELQCPKPTLQI</u> <u>SHIAQLGLEKDVVRWF</u> <u>CNRRQNGKRS</u> <u>SSDY</u> <u>SQR</u> <u>EDF</u> <u>EA</u>	268
HumanL.....A.....	300
House	..WS..TH..K...S...T...N.....YE.S...EY..	293
Cat	AGSPFSGAPVSPFLAPGPHFGTIPGYGSPHFTIILYSVVPFPCRAFPSVSVTILGSPHNS	328
HumanG.....A.....P.....	360
House	T.T..P.GA...P.....T...-.....S.P..A.....	352

Fig. 1. Comparison of the predicted amino acid sequences of cPOU5F1 (GenBank accession no. EU366914) and its human (GenBank accession no. NM_002701) and mouse (GenBank accession no. NM_013633) orthologs. POU-specific and POU homeodomains are indicated in bold and underlined bold letters, respectively. The linker region connecting the two domains is underlined. A dash indicates a gap introduced for optimal alignment, and a dot indicates that the residue is identical in all three species. Sequences were aligned using Clustal W [19].

NANOG 를 분석한 결과 뉴클레오티드 레벨에서 사람과 마우스와 각각 69%와 68%의 상동성을 보였고 아미노산 레벨에서는 각각 69%와 58%의 상동성을 확인하였다. 또한 NANOG의 CDS에서 Homeodomain, SMAD4 domain과 tryptophan repeat domain (W/QXXXX)을 확인하였다 (Fig. 2).

271 and 246 bp, respectively. Li, liver; St, stomach; Sp, spleen; Ov, ovary; Lu, lung; Br, brain; S, cat ES-like cells; F, fibroblast feeder cells; B, blastocyst N, negative control.

또한 면역염색법으로 이 두 유전자의 발현을 검증하였다. 그 결과 고양이 유사배아줄기세포 에서는 높은 발현을 보였으며, 반면 배아섬유아세포 에서는 검출되지 않았다 (Fig. 4).

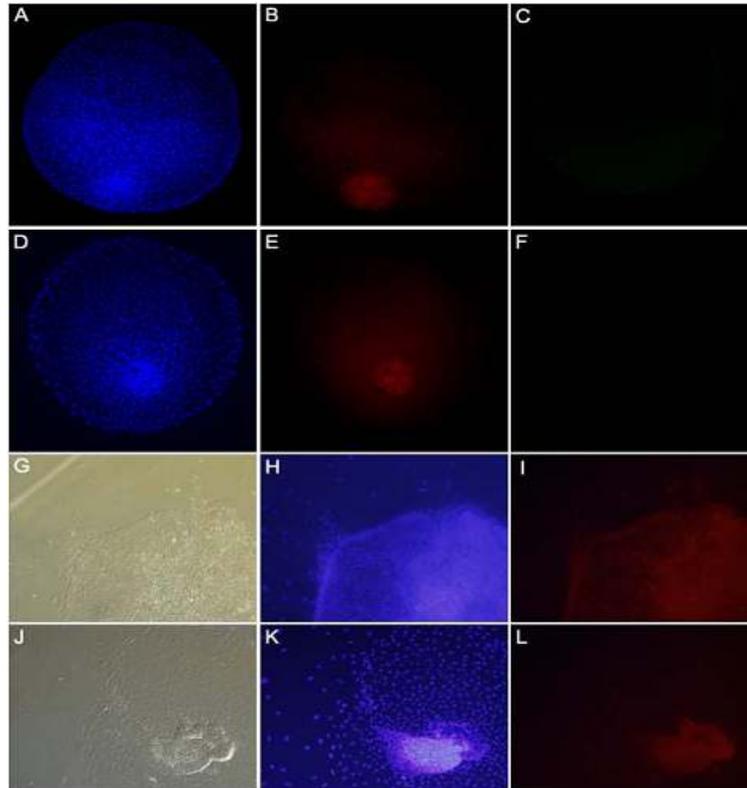


Fig. 4. Immunocytochemistry of in vivo-produced cat blastocyst and undifferentiated ES-like cell colonies (passage 3). A and D, Nuclei were counterstained with Hoechst33342 in blastocysts (blue); B and E, POU5F1 and NANOG expression in ICM cells of blastocysts respectively (red) for positive control; C and F, Stained with second antibody only for negative control; G and J, Phase contrast images of ES-like cells; H and K, Counterstaining with Hoechst33342 (blue); I and L, POU5F1 and NANOG expression in ES-like cells respectively (red). Magnification, 200 \times .

이상의 결과로부터 볼 때 우리가 성공적으로 고양이 유사배아줄기세포를 분리배양 했음을 확인할 수 있으며 이러한 고양이 다능성 유전자의 염기서열을 밝혀냄으로써 앞으로 고양이 줄기세포 검증을 위한 Biomarker 에 사용되는 등 다양한 연구에 활용되리라 믿는다.

제 6절 RFP 고양이를 이용한 응용연구

○ RFP 형질전환 복제 고양이를 이용한 응용연구 - 망막 전구 세포와 뇌 전구 세포 확립

RFP 형질전환 복제고양이의 안정적인 germ line transmission 을 확인 후 형질전환 복제고양이의 망막전구세포와 뇌전구세포의 확립을 통해 인간 질병모델동물로써의 가능성과 다양한 유전 연구의 실험모델동물로써의 가능성을 확인하고자 이 연구를 수행 하였다. 채취된 망막세포와 뇌세포는 23일 동안 4번의 계대배양을 시도하였으며 이 세포는 RFP 발현도가 높음을 확인할 수 있었다 (Fig 2). 또한 이 세포가 progenitor 세포로써 의 기능을 지니고 있는지 확인하기 위해 PCR 분석을 이용하여 progenitor marker인 nestin, sox2, vimentin, pax6, Hes1, Hes5, proliferation marker로써 Ki-67와 the neural markers β -III tubulin and map2, and the glial marker GFAP의 다양한 marker 를 이용하여 progenitor 세포임을 확인하였다 (Fig 3). 본 실험으로 망막전구세포를 이용한 망막질환의 세포치료와 뇌전구세포를 이용한 신경줄기세포 치료연구의 가능성을 보여준다.

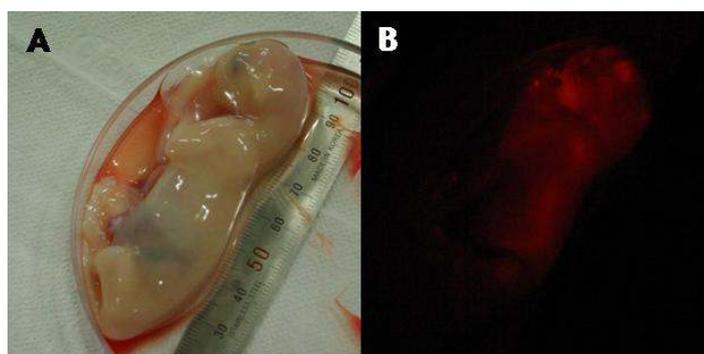


Figure 1. Images of an embryo collected from a pregnant domestic short-haired cat at 45 days' gestation. Photographic (A) and fluorescence (B) images of an embryo expressing red fluorescence protein are shown.

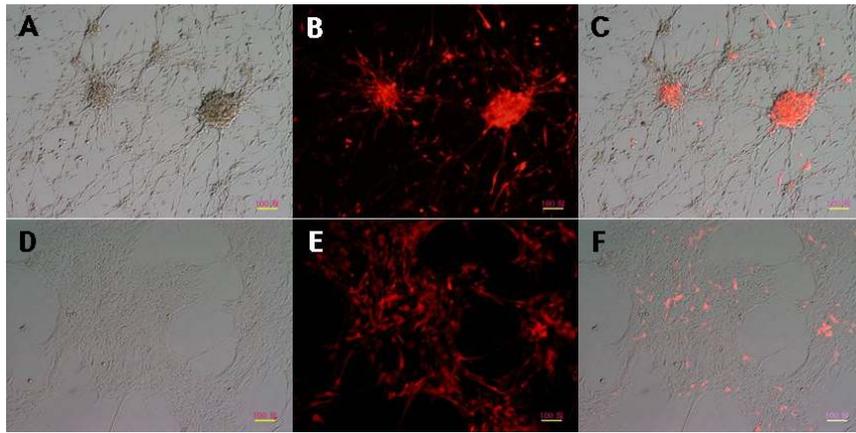


Figure 2. Phase contrast and fluorescence images of retinal and brain progenitor cells 10 d post-isolation. Phase contrast (A), RFP-fluorescence (B), and merged (C) images of BPCs. Phase contrast (D), RFP-fluorescence (E), and merged (F) images of RPCs. Bar = 100 mm.

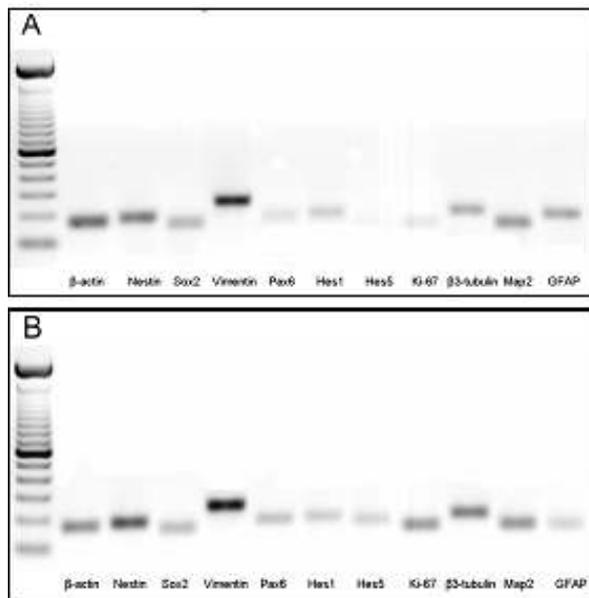


Figure 3. RT-PCR analysis of neural progenitor cells. Cells shown are passage 3 from isolation. Cat BPCs (A) and RPCs (B) labeled by progenitor markers nestin, sox2, vimentin, pax6, Hes1, Hes5, proliferation marker Ki-67 and neural markers β -III tubulin, map2, as well as glial marker GFAP. β -action served as endogenous control.

○ RFP 단백질발현 형질전환 복제고양이의 골수 유래 중간엽줄기세포의 분화 가능성에 관한 연구

RFP-형질전환 중간엽줄기세포의 여러 조직으로의 분화 가능성을 알아보기 위해,

적색형광단백질을 발현하는 형질전환 복제고양이의 골수에서 중간엽줄기세포를 분리하여 계대 4번째 되는 때에 조골세포, 지방세포, 연골세포로의 분화유도를 시도하였다. RFP 형질전환 중간엽줄기세포를 분화배양액에 각각 유도배양한 결과 지방세포, 조골세포 및 연골세포로 분화한 것을 확인하였다.

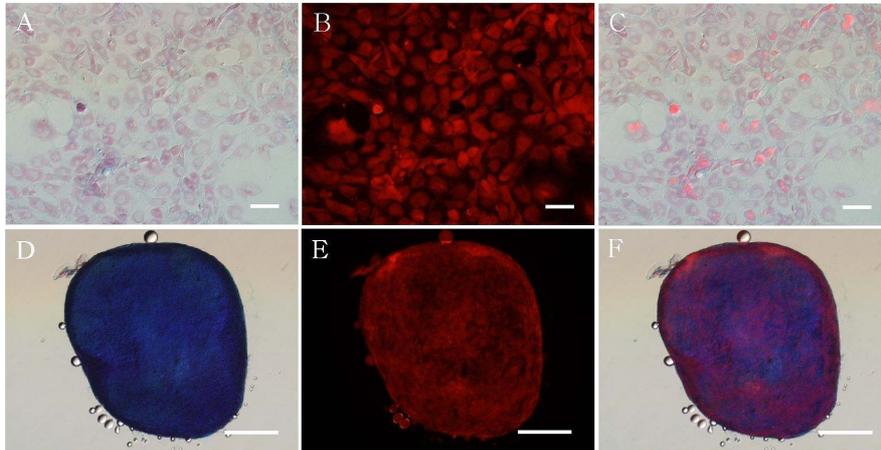


Fig 1. RFP 형질전환 중간엽줄기세포에서 조골세포 분화 배양액에 21일 동안 배양시켜 조골세포로 분화된 모습. 미분화 대조군 사진 (A), (B), (C). 조골세포로 분화된 사진 (D), (E), (F).

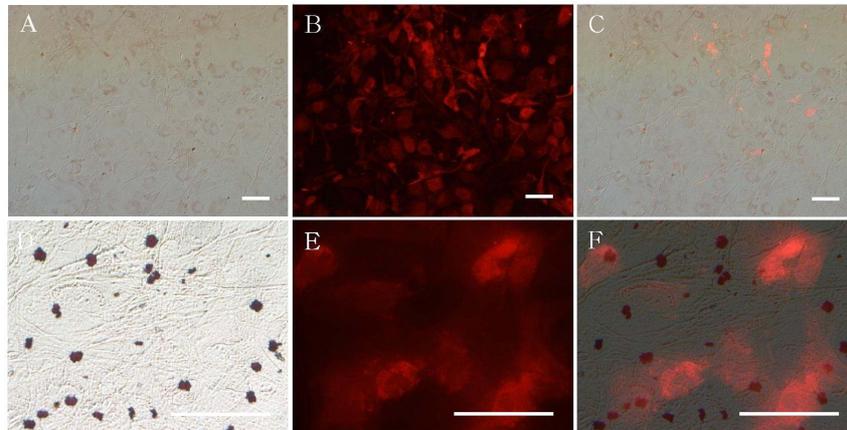


Fig 2. RFP 형질전환 중간엽줄기세포에서 연골세포 분화 배양액에 21일 동안 배양시켜 연골세포로 분화된 모습. 미분화 대조군 사진 (A), (B), (C). 조골세포로 분화된 사진 (D), (E), (F).

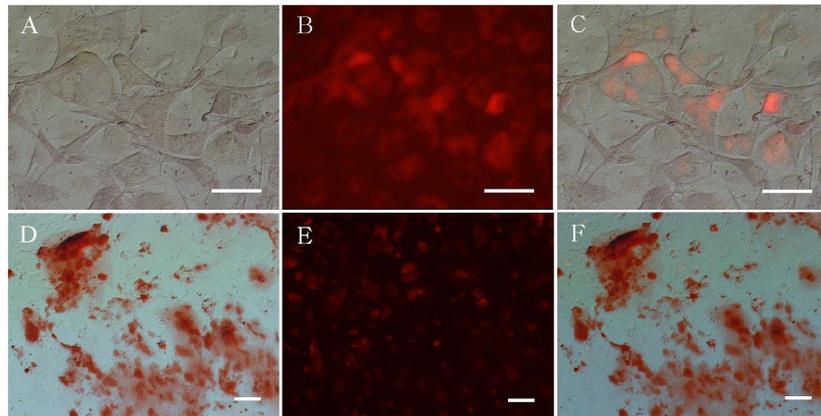


Fig 3. RFP 형질전환 중간엽줄기세포에서 지방세포 분화 배양액에 21일 동안 배양시켜 지방세포로 분화된 모습. 미분화 대조군 사진 (A), (B), (C). 조골세포로 분화된 사진 (D), (E), (F).

또한 이 모든 분화조직에게서 RFP가 발현하는 것을 알 수 있었으므로 적색형광 단백질 발현 형질전환 골수 중간엽줄기세포가 줄기세포 이식의 추적자로서의 활용 가치를 확인함과 동시에 중간엽줄기세포가 잠재적으로 가지는 조직으로 분화 역시 가능성을 증명하였다.

○ 정상 Rat 선조체에 이식된 RFP-형질전환 복제고양이 골수에서 유래된 중간엽줄기세포 (MSCs)의 생존과 신경분화 연구

RFP 형질전환 복제고양이의 골수에서 MSCs의 구축

RFP-형질전환 복제고양이 생산 목적은 바이오마커로써 형광마커를 이용하여 특정 질병을 찾기 위한 방안으로 연구되어졌다. 고양이의 유전 질병은 인간의 유전질환과 150가지의 유사성이 보고되었다. 이 형광유전자를 이용하여 특정 질환의 marker와 같이 탐침자로 개발되면 특정 질환(Parkinson's Disease과 huntington's disease 같은 신경 퇴행성 장애)을 치료하는 새로운 방법이 될 수 있을거라 기대된다. 본 연구는 RFP 형광고양이의 골수에서 유래한 중간엽줄기세포 (MSCs)를 정상 rat 선조체에 이식하여 생존과 신경분화 가능성을 알아보고자 진행하였다.

중간엽줄기세포 (MSCs)를 12개월령 RFP-형질전환 고양이 큰 대퇴 돌기를 통해서 채취하였고, Dulbecco's Modified Eagle high glucose medium (DMEM, 4.5 g/l glucose; Gibco-BRL, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco-BRL, USA) and penicillin/streptomycin (50 IU/ml / 50 µg/ml; Sigma, USA)에 passage 4 때까지 배양을 하였다 (Fig 1).

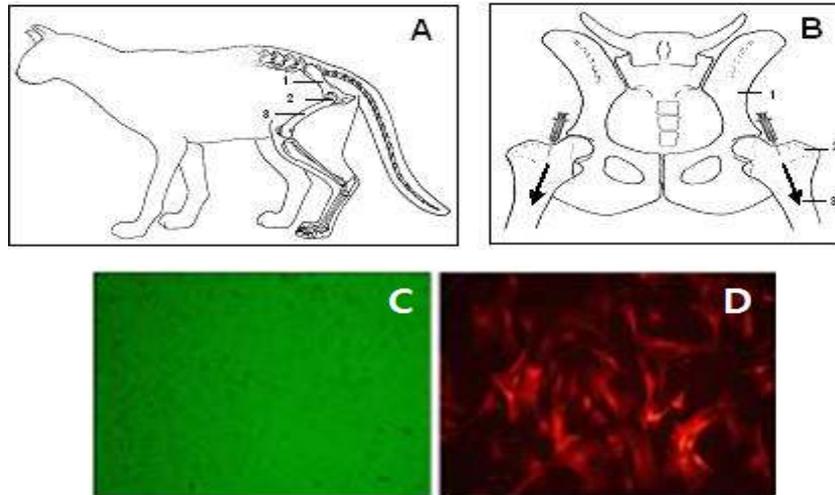


Fig 1. Lateral view and expression of RFP in cat MSCs. (A) and anterior view (B) of the cat leg bone. 1, hip bone; 2, greater trochanter; 3, femur; arrows, direction of the needles. The cells were grown (C) and shown under fluorescence light (D).

36마리의 성체 수컷 Sprague Dawley rats (실험 개시 때 200-250g)를 이식 2 주 후부터 주 별로 해서 6개 군으로 나누었다. 모든 군의 포함되어 있는 6마리 rat들 중 3마리는 cyclosporin A (CSA, 10 mg/kg bodyweight)를 면역억제제를 급여 하였다. passage 4 단계의 $8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ MSCs를 6군으로 나누어 각각의 6마리 rat 선조체에 주입을 하였다. 6마리 중 1마리는 positive control로서 MSCs 대신 PBS (5 ul/rat)를 주입하였다. 6마리 실험군에 이식된 rat들을 이식 후 2, 3, 4, 5, 6주에 sacrifice 시켰다. 이식된 세포의 immunohistochemistry를 위해서 microsection된 sample들을 말린 후 β III-tubulin, NF-M, GFAP 그리고 MOSP으로 염색하였다.

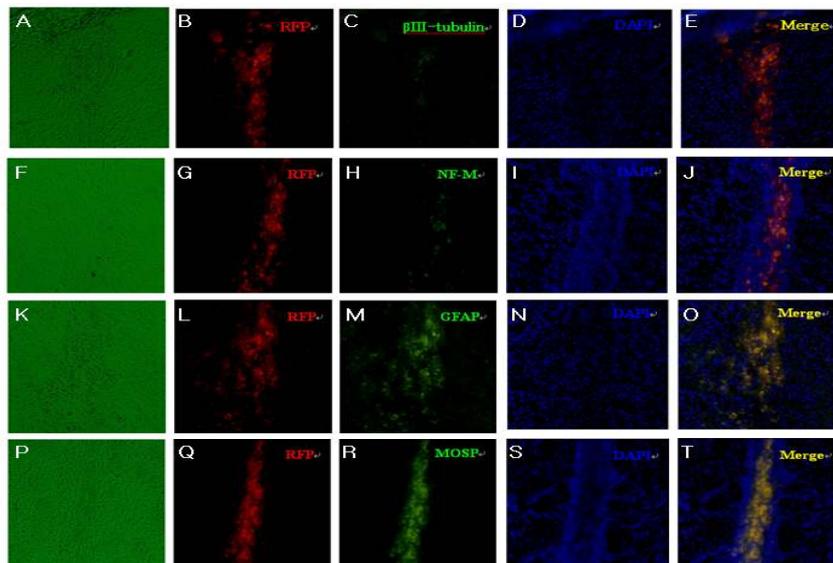


Fig 2. Phase contrast and fluorescence micrographs of a graft 2 weeks after implantation of RFP-transgenic cat BM-derived MSCs into right intact adult rat striatum. A, F, K and P; phase contrast image, B, G, L and Q; RFP-expressing graft. C, H, M and R; positive for β III-tubulin, NF-M, GFAP and MOSP. D, I, N and S; nuclei of the cells were counterstained with DAPI. E, J, O and T; merged image of B, C and D, G, H and I, L, M and N, Q, R and S . All images are shown at a magnification x 200.

이식된 세포들은 이식 후 2주(Fig. 2)와 3주 (Fig. 3)에 회수한 샘플에서 이식한 RFP fluorescence cell의 분화와 생존율을 확인해 본 결과 rats의 선조체에 강하게 β III-tubulin와 RFP 형광이 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

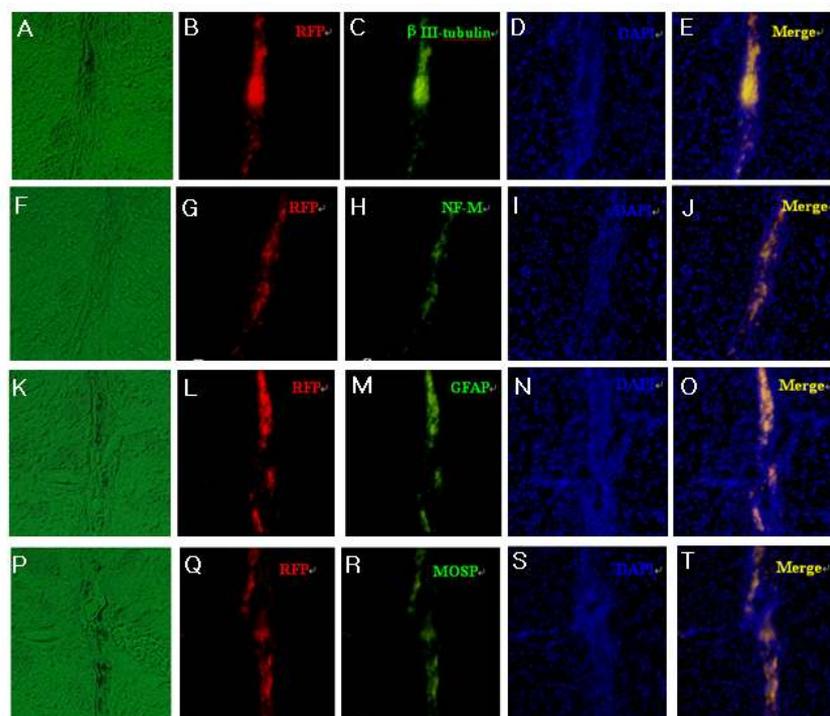


Fig 3. Phase contrast and fluorescence micrographs of a graft 3 weeks after implantation of RFP-transgenic cat BM-derived MSCs into right intact adult rat striatum. A, F, K and P; phase contrast image, B, G, L and Q; RFP-expressing graft. C, H, M and R; positive for β III-tubulin, NF-M, GFAP and MOSP. D, I, N and S; nuclei of the cells were counterstained with DAPI. E, J, O and T; merged image of B, C and D, G, H and I, L, M and N, Q, R and S. All images are shown at a magnification of x200.

계다가 세포들이 β -III tubulin, NF-M, GFAP 그리고 MOSP에 양성반응을 보여주

었다. 이는 RFP 형질전환 고양이 유래 MSCs가 neuron, astrocyte 그리고 oligodendrocyte로 분화되었다는 것을 의미한다. 한편 이식 후 4-5주째 이식된 세포가 급격하게 줄어들었고 이식 후 6주째 되는 시점에 사라진 것을 확인하였다 (Fig 4).

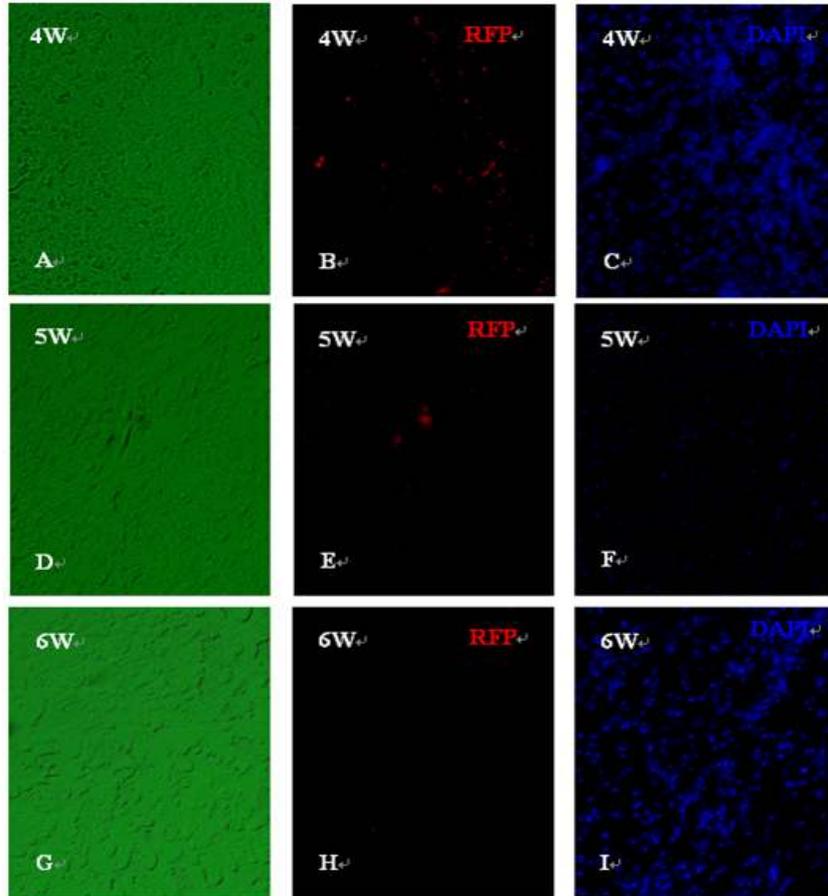


Fig 4. Phase contrast and fluorescence micrographs of a graft 4, 5 and 6 weeks after implantation of RFP-transgenic cat BM-derived MSCs into right intact adult rat striatum respectively. A, D and G; phase contrast image, B, E and H; RFP-expressing graft. C, F and I; nuclei of the cells were counterstained with DAPI. All images are shown at a magnification x 200.

이 결과는 이식 부위에서 영양인자들의 고갈과 낮은 혈관형성으로 인한 것으로 사료된다. 게다가 이식 후 3주에서 4주 때에 이식된 세포들의 이동 역시 확인을 하였다. CSA 처리가 이식 세포들의 생존과 신경분화에는 커다란 영향을 주었던 것으로 예상된다. 이로써 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSCs가 rat 선조체에서 생존과 신경분화가 가능하다는 것을 확인하였다.

제 7절. 이속간 복제수정란 생산 연구

○ 이속간 복제동물 생산에 관한 연구

* 체세포 복제수정란 및 인공수정 유래 배반포 생산:

ICM 대체 복제 수정란을 Yin (2008) 등의 방법에 준하여 체외생산 후 이를 대리모에 이식하여 양질의 체세포 복제 수정란을 생산하고자 한다. 또한, 복제수정란의 ICM을 주입할 인공수정유래 수정란을 회수하기 위하여 대리모는 연구실 사육장에서 2달 이상 적응 사육한 후 외관적으로 건강한 개체를 이식에 공시한다. 언급된 발정 동기화된 암고양이를 마취하여 일반 외과수술방법에 의해 복부 정중선을 절개하여 생산된 복제수정란을 난관에 이식한다. 또한, 인공수정을 위하여 채취된 정액을 자궁에 주입함으로써 인공수정을 완료한다.

* 인공수정 유래 체내 배반포와 ICM 대체 복제 배반포 공동 이식:

기존의 보고에 의하면 이종간 수정란 이식에 있어 타종을 직접 자궁에 주입 하였을 시 산자를 생산할 수 없음을 보고 하였다. 따라서 본 연구에서는 인공수정유래 체내 배반포와 ICM 대체 복제수정란을 대리모에 공동이식 한다면 복제 수정란의 착상과 산자 생산을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

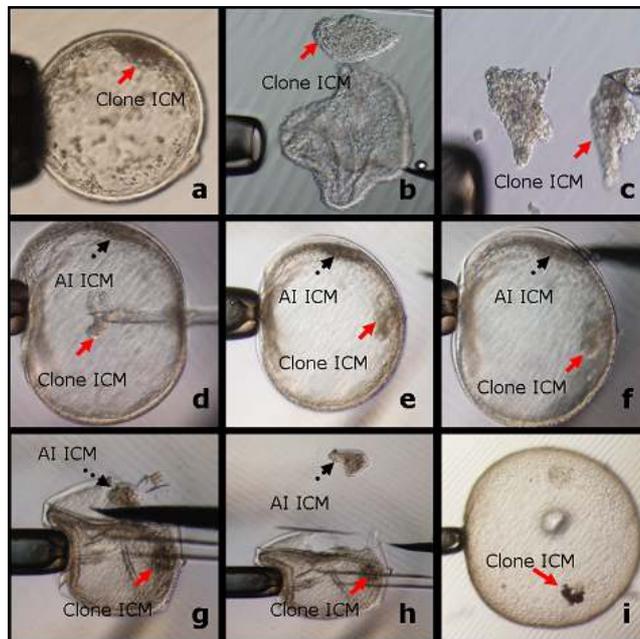


Fig. 1. 내세포피 대체를 이용한 복제 a) 복제삽 수정란, b) 복제삽 수정란의 내세포피 절개, c) 절개된 내세포피의 흡입, d) 인공수정유래 배반포에 복제삽 수정란의 내세포피 주입, e) 와 f) 복제 삽 내세포피가 주입이 완료된 수정란, g) 인공수정 유래 배반포의 내세포피의 절개, h) 절개된 인공수정 유래 내세포피 I) 재조합된 수정란의 재확장.

* 체내유래 복제수정란 및 인공수정유래 배반포의 회수:

본 연구에 사용되는 배반포 단계는 난관을 거쳐 이미 자궁에 이동한 단계이다. 체내유래 배반포는 인공수정 완료 약 7일 후 외과적 수술방법으로 자궁을 적출하여 실험실에서 자궁관류를 통해 수정란을 회수한다.

* 체내유래 복제 수정란과 인공수정유래 체내 할구수 조사:

체내유래 복제 및 인공수정유래 수정란의 할구수를 비교 조사하고자 한다.

* 인공수정 및 복제수정란의 내세포피와 영양배엽세포의 분리:

인공수정을 하여 생산된 배반포를 실험실에서 아래 그림과 같이 micro blade를 이용하여 내부세포피와 영양배엽세포를 분리 하고자 한다. 또한 같은 방법을 이용하여 삶 복제수정란 유래 배반포에서 2종류의 세포를 분리하고 삶 복제 수정란 유래 내부세포피를 인공수정유래 영양배엽 세포에 주입하여 ICM 교체를 완료한다. 이런 방법으로 생산된 복제 수정란을 상기 언급한 방법으로 발정 동기화된 대리모의 난관에 이식하여 산자 생산을 유도 하고자 한다.

최근에 많은 연구 보고에 의하면 히스톤탈 아실화효소저해제 (Histone deacetylation)인 TSA를 처리하여 복제 수정란의 질적 향상을 보고 하였으며, 최근 Wee (2005) 등의 보고에 의하면 도너세포에 TSA를 처리함으로 인해 복제 소 수정란의 체외발달을 향상을 보고 하였다. 따라서 본 연구에서는 삶의 donor 세포에 Histone deacetylation 저해제를 첨가하여 복제수정란을 생산한 후 수정란의 질적 향상을 유도하고자 한다.

1-1 내세포피 대체를 이용한 삶 복제 수정란의 생산 및 이식

Table 1. 삶 복제수정란 내세포피의 대체를 이용한 삶 복제수정란의 이식

Rec.	No. of SCNT BL	No. BL	No. ICM	No. re-exp. BL &ET	No. preg. at 30 d	No. delivery
1	3	5	3	2	No	No
2	2	5	2	3	No	No
3	4	4	2	2	Yes	No
4	3	5	2	2	Yes	No
5	2	3	1	0	No	No
6	4	4	2	2	Yes	No
7	3	4	3	1	No	No
8	3	5	3	2	No	No
tot.	24	35	18	17	3 두	-

Table 1. 에서와 같이 내세포괴 대체를 이용한 삶의 복제수정란을 생산후 대리모에 이식한 결과 총 23개의 내세포괴 대체 수정란을 생산하였고, 이를 인공수정 유래 복제수정란과 혼합하여 6두의 대리모에 이식한 결과 3두의 대리모가 임신을 하였으나, 산자 생산에는 실패하였다.

* 도너 세포에 TSA를 처리하여 삶 복제수정란의 질적 향상

삶 도너세포에 TSA를 처리한 결과 처리시간이 지날수록 기존에 보고된 많은 종에서와 같은 현상을 삶 체세포에서도 처리시간이 증가할수록 증식력은 현저히 감소함을 보였다 (Fig 2).

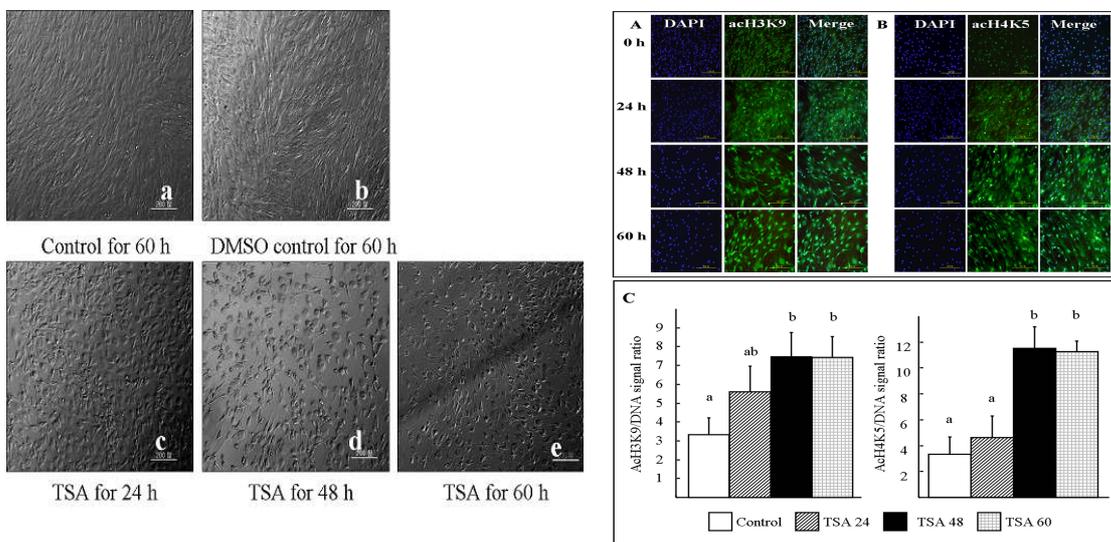


Fig 2. TSA 를 첨가한 삶 체세포의 변화.

Table 2. 삶 복제 수정란의 체외 발달을

	Control	TSA-igSCNT
No. of oocyte used (replicates)	185 (5)	217 (5)
% of fused embryos (\pm SEM)	58.4 \pm 1.9 ^b	79.7 \pm 3.6 ^c
% of cleavage (\pm SEM)	67.6 \pm 2.9	71.1 \pm 2.8
% of blastocyst ^a (\pm SEM)	11.0 \pm 2.6	12.2 \pm 2.6
No. (\pm SEM) of total cells	71.8 \pm 2.9 ^b	109.1 \pm 6.9 ^c

Table 2에서 보는바와 같이 TSA를 처리하여 복제수정란을 생산하여 체외 발달을 유도한 결과 TSA 처리구와 대조구에서 배반포 생산율에서는 차이가 없었다. 그러나 그림 5와 같이 총세포수에 있어서는 TSA를 처리한 복제수정란의 경우 대조구에 비해 월등히 높은 총세포수를 보였다.

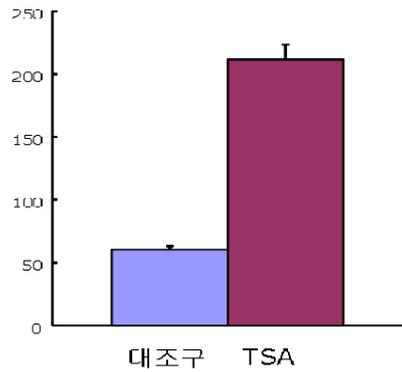


Fig 3. 삶 체외 복제수정란의 총세포수.

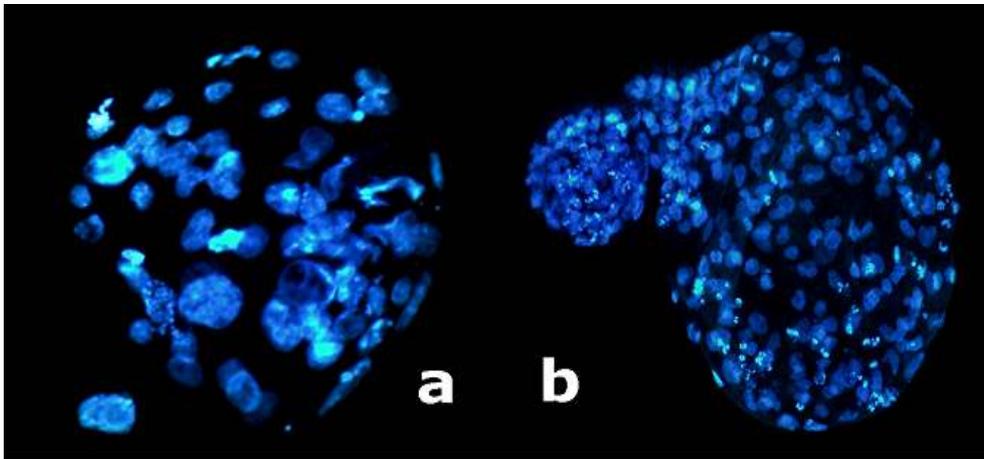


Fig 4. 삶 복제수정란의 체외 배반포 총 세포수. a) 대조구, b) TSA-NT.

Table 3. 삶 복제수정란의 체내 발달율

		Control	TSA-igSCNT
No. of oocyte used (replicates)		303 (5)	229 (5)
% of fused embryos (\pm SEM)		63.4 \pm 4.6	61.1 \pm 1.9
% of recovered embryos (\pm SEM)		73.4 \pm 3.7	82.9 \pm 3.1
% of collected blastocyst ^a (\pm SEM)	Total	5.7 \pm 2.2 ^b	20.7 \pm 3.0 ^c
	Expanded	\pm 1.7 ^b	12.9 \pm 2.7 ^c
	Middle / Early	3.5 \pm 1.4	7.8 \pm 2.1

Table 3.에서와 같이 도너세포에 TSA를 처리하여 복제수정란을 생산하여 대리모에 이식후 복제수정란을 회수한 결과이다. 대조구에 비해 TSA를 첨가한 처리구에서 양질의 배반포를 생산할 수 있었다(Fig 5). 또한 총 세포수에서도 TSA-NT 처리구에서 대조구에 비해 세포수도 증가됨을 확인하였다 (Fig 6).

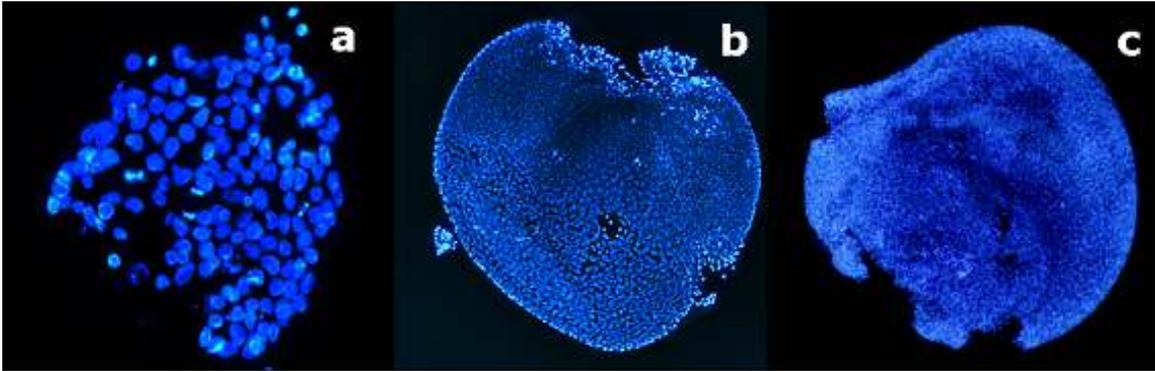


Fig 5. 삶 복제수정란의 체내 배반포 총 세포수. a) 대조구, b) TSA-NT, c)고양이 AI control.

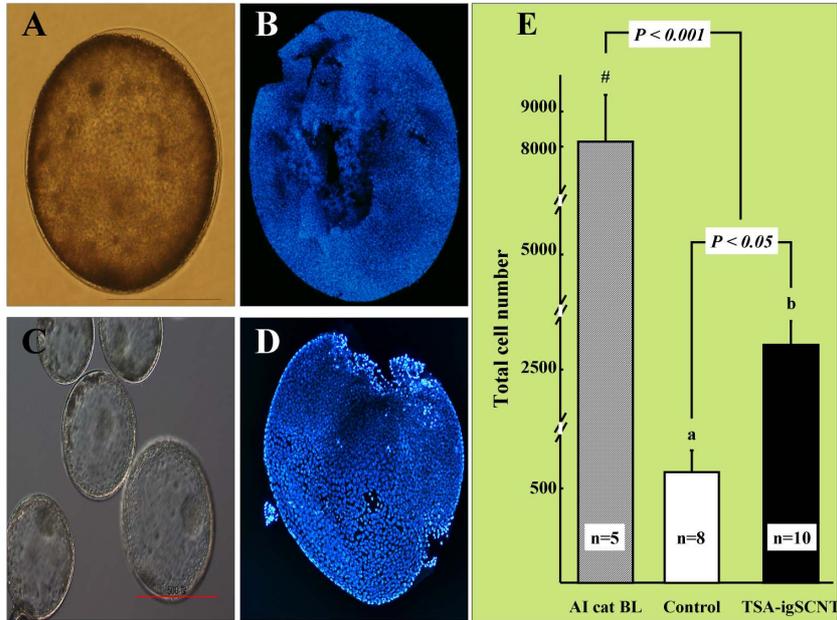


Fig 6. 체내 삶복제수정란의 총세포수.

○ Tetracyclin virus vector 도입된 GFP cell line 구축 및 복제수정란 생산 효율 검증

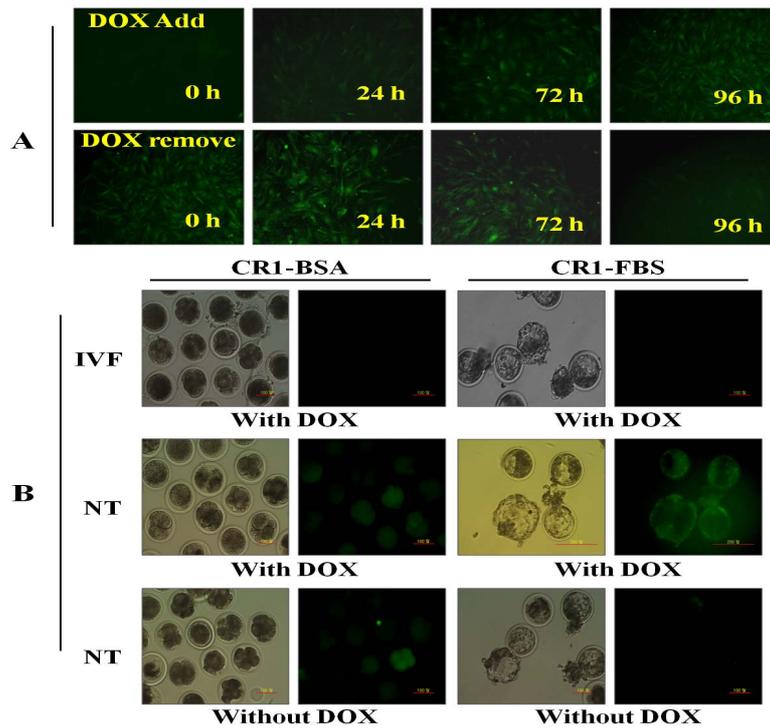


Fig 1. GFP가 도입된 tetracyclin virus vector로 적중된 고양이 도나세포의 DOX 처리시간에 따른 GFP 발현변화와 복제수정란의 발현 확인. A; DOX 처리시간에 따른 도나세포의 GFP 형광의 발현변화, B; DOX처리에 따른 GFP-donor cell을 이용한 복제수정란의 발현 검증

고양이 fibroblast cell line에 GFP가 도입된 tetracyclin virus vector로 적중이 시킨 후 150 ug/ml hygromycine으로 선발하여 cell line을 구축하고 1 ug/ml doxycycline으로 tetracycline tune on/off system 확인하였다. 48시간 배양 시 cell line에서 완벽하게 발현되는 것을 확인하였고 NT 수정란에서도 발현을 확인하였다(Fig 1)

Tet 유전자 적중된 cell line으로 NT 실시 후 발달율을 검증한 결과 대조구에서는 20.2% BL율을 얻었지만 Tet-NT 처리구에서는 10.4%로서 유의적으로 낮은 발달율을 보였다. 그러나 발달된 BL에서 1 ug/ml doxycycline에 48시간 배양 후 GFP 유전자가 발현되는 것을 확인하여 GFP 유전자가 도입된 tetracycline virus vector system 정상적으로 작동하는 것을 검증하였다.

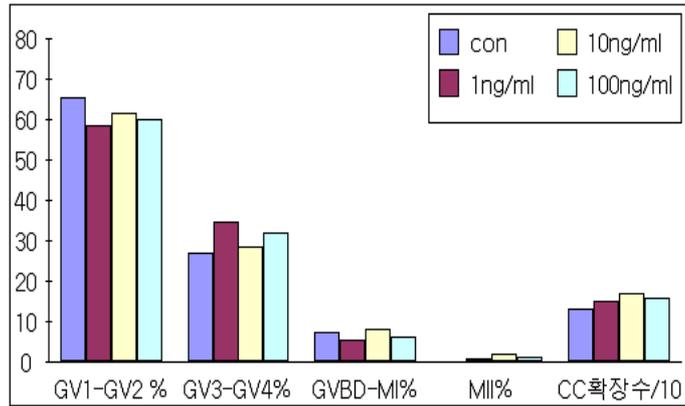
Table 1. Comparison of developmental competence between bovine nontransgenic and transgenic cloned embryos

	No. of oocyte used	No. of fused embryos (%)	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocyst (%)
Control	204	166 (81.4)	119 (71.2)	34 (20.2)
Tet -NT	261	182 (69.7)	133 (73.1)	19 (10.4)

[제 2세부]

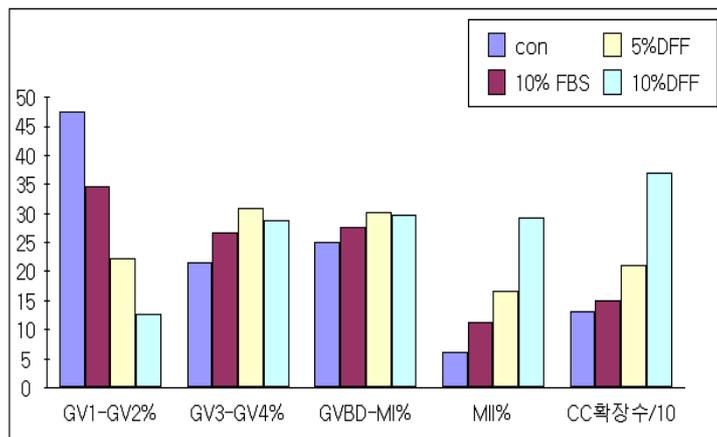
1. 개의 초기 발생 기전 규명 및 체외성숙방법 개발

1). 개 난자의 체외성숙 배양액에 PGF2a 단백질을 첨가했을 때 난구세포에 대한 변화 및 난구세포의 영향에 대한 조사



본 그림은 FOCM 기본 배양액에 PGF2a를 첨가하여 72시간 배양 후 난자의 성숙율을 관찰하였을 때 GV1-GV2단계까지 발달율은 큰 차이가 없었으며, GV3-GV4 단계/ GVBD-MI/MI%까지 발달율도 유의적 차이는 없었고, 또한 난구세포확장배수 (난구세포확장배수 1/10) 큰 변화가 없다.

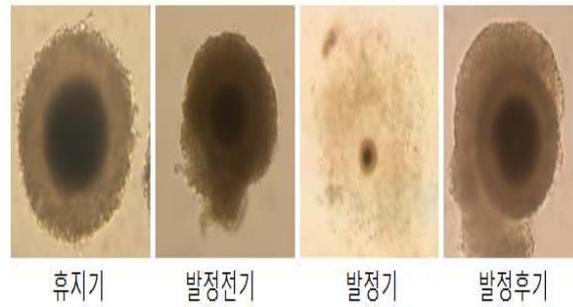
2). 개 발정기 난소의 난포액을 첨가하였을 때 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향에 대한 조사



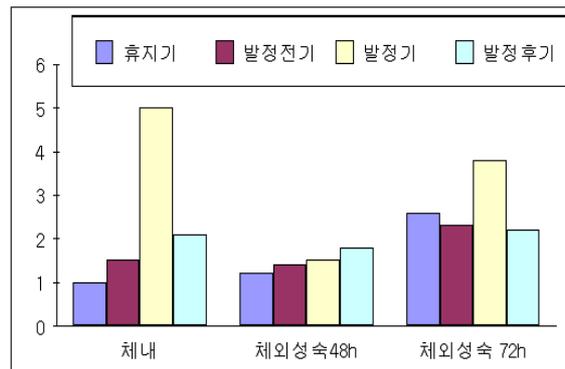
본 그림은 FOCM 기본 배양액에 소혈청 및 개 발정기 난소의 난포액(DFF)을 첨가하여 72시간 배양 후 난자의 성숙율을 관찰한 결과: GV1-GV2단계까지 성숙율은 con, 10FBS, 5%DFF 혹은 10%DFF 순서로 차례로 감소되고,

GV3-GV4/GVBD-MI단계까지 성숙율도 증가되고, MII까지 성숙율과 난구세포 확장배수는 10% DFF 처리군은 현저히 증가되는 것으로 나타났다.

3). 개 발정주기에 따른 체내와 체외 성숙단계에 따른 난구세포 확장 상태의 변화에 대한 조사

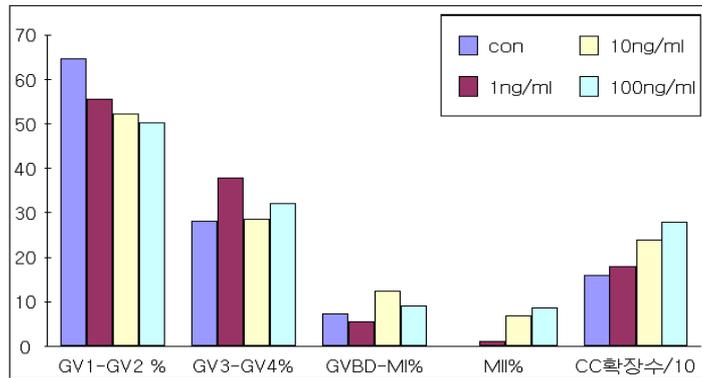


체내난자가 성숙될수록 난구세포 확장 상태가 더 커진다. 체외난자의 성숙정도와 난구세포 확장 상태에는 큰 영향 없으며, 대부분 난구세포들은 확장되지 않는다.



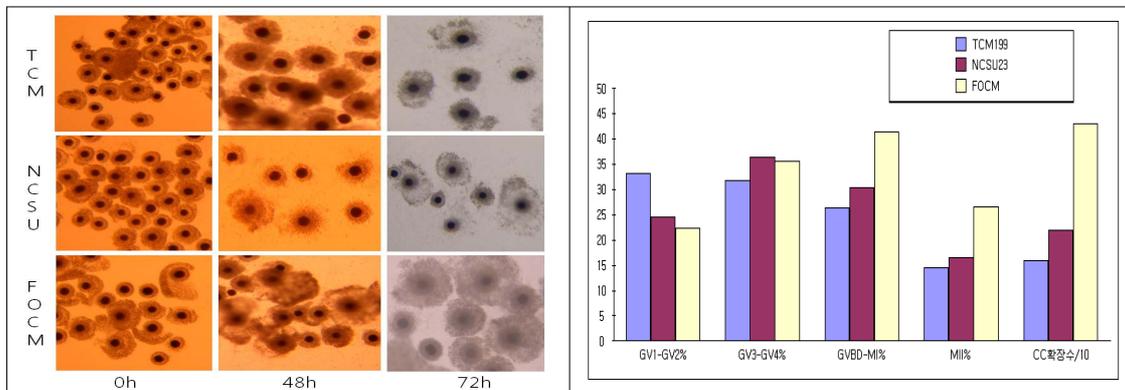
본 그림은 체내 각 발정단계별로 난소에서 채취한 난자들과 체외성숙 48h/72 시켰을 때 난구세포 확장배율을 관찰한 것으로써 체내 발정기 난포에서 채취한 난자의 난구세포 확장율은 5배정도로 현저히 크며 휴지기, 발정전기와 발정후기 난소에서 채취한 난자의 난구세포 확장율에는 큰 차이가 없다.

4). 개 난자의 체외성숙 배양액에 Leptin 호르몬을 첨가하였을 때 체외성숙난의 성숙율에 대한 조사



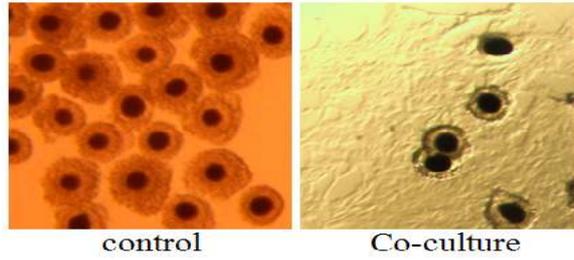
본 그림은 개 난자의 체외성숙 최적의 FOCM 기본 배양액에 leptin 호르몬을 각각 0, 1, 10 혹은 100ng/ml를 첨가하여 72시간 배양 후 난자의 성숙율을 관찰한 결과: GV1-GV2단계까지 성숙율은 leptin 호르몬 농도의 증가에 따라 감소되고, GV3-GV4단계까지 성숙율은 1ng/ml에서 현저히 증가하였으며 0, 10 혹은 100ng/ml 처리군은 순차적으로 증가하였고, GVBD-MI단계까지 성숙율도 순차적으로 증가하는 추세를 나타냈으며, MII까지 성숙율과 난구세포 확장배수는 leptin 농도의 증가에 따라 현저히 증가되는 것으로 나타났다.

5). 개 난자의 체외성숙 기본 배양액 FOCM 배양체계와 TCM, NCSU 체계에 대한 조사



본 그림은 TCM199, NCSU23 혹은 FOCM 기본 배양액에 발정기 개 난소의 10% DFF을 첨가하여 72시간 배양 후 난자의 성숙율을 관찰한 결과: GV1-GV2단계까지 성숙율은 TCM199, NCSU23 혹은 FOCM 순서로 차례로 감소되고, GV3-GV4/GVBD-MI단계까지 성숙율은 순차적으로 증가되며, MII까지 성숙율과 난구세포 확장배수는 FOCM 처리군에서 현저히 증가되는 것으로 나타났으며, TCM199과 NCSU23군에서는 큰 차이가 없는 것으로 나타났습니다.

6). 개 난자를 수란관 상피세포와 공동 배양하였을 때 성숙율에 미치는 영향에 대한 조사



Culture system	No. oocytes used	No. (%) of degenerated oocytes	Total	No. (%) oocytes that resumed meiosis		
				GV	MI-MII	Unclear
Control	56	12 (21.4)	44	31(55.4)	3 (5.8)	10 (17.8)
Co-culture	45	9 (20.0)	36	24 (53.4)	4 (8.9)	8 (17.7)

본 그림은 개 난자를 수란관상피세포와 72시간 공동 배양하였을 때 성숙율에 큰 영향을 미치지 못하였다.

2. 고양이의 초기 발생 기전 규명 및 체외성숙방법 개발

1). 미성숙 난자의 체외배양 시 핵의 성숙에 따른 미세소관과 microfilament 의 변화의 조사

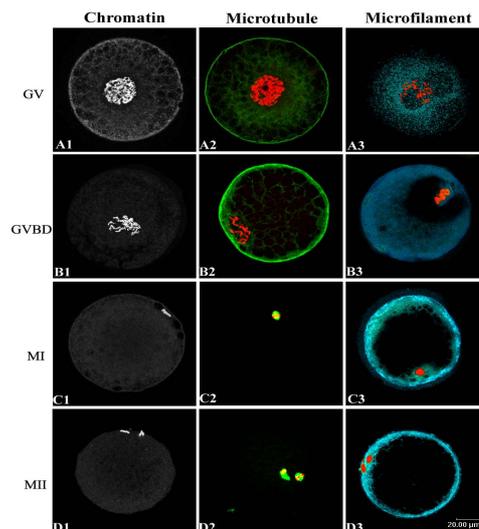
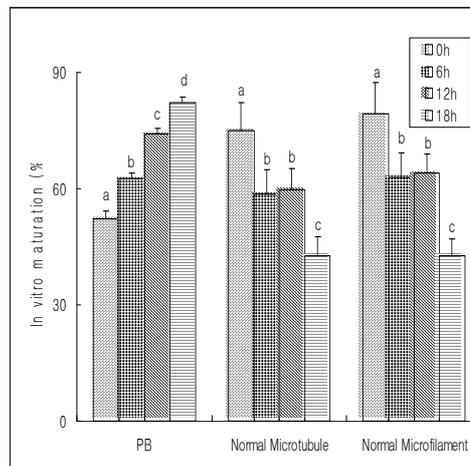


그림 A는 GV 단계의 고양이 난자를 표시한다. A1는 핵에는 핵막이 존재; A2는 세포질 내에 넓은 분포로 미세소관의 분포; A3은 핵 주변에 구멍 난 듯

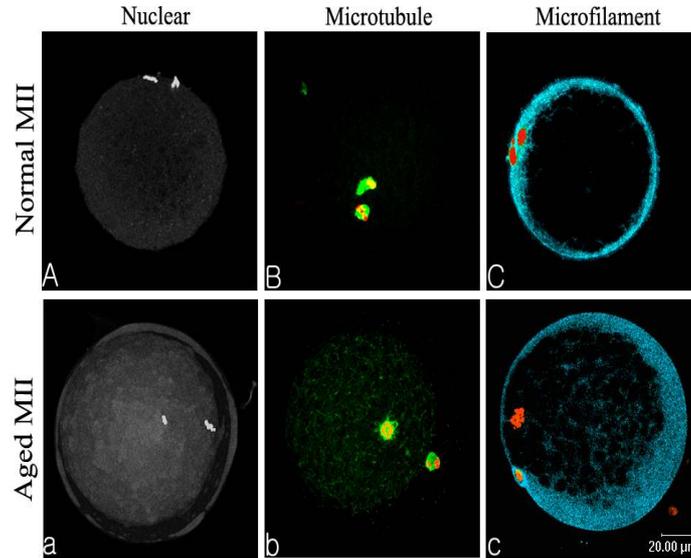
microfilament 분포. B는 GVBD 단계의 고양이 난자를 표시한다. B1는 핵막막이 붕괴 되었다; B2는 핵막 붕괴된 주면에 밀집된 미세소관의 분포; B3는 핵을 중심으로 더 커진 구멍 같은 microfilament의 분포. C는 MI 단계의 고양이 난자를 표시한다. C1는 한 평면에 일직선으로 나열된 chromatin; C2는 일직선으로 나열된 chromatin을 중심으로 각각 방추사모양 배열 된 미세소관; C3 chromatin주변에 밀집된 microfilament의 과찰. D는 MII단계의 난자. D1 는 두 개로 나누어진 핵; D2는 MII 단계의 고양이 난자에서 제 1 극체를 방출 후 핵주변의 방추사모양의 미세소관과 제 1 극체 주변 미세소관의 분포; D3는 세포막주변과 핵주변의 microfilament의 분포.

2). 난구세포 확장된 oocytes를 체외성숙 시켰을 때 제1극체 방출율에 대한 조사



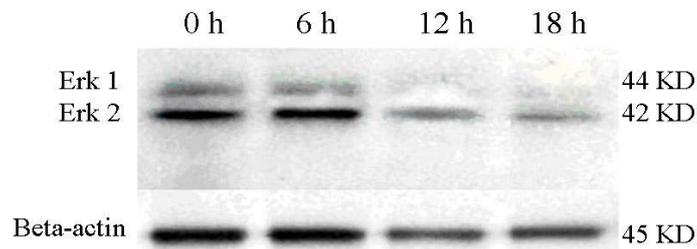
난구세포 확장된 oocytes를 체외성숙 시켰을 때 제1극체 방출율은 시간의 증가에 따라 증가 한다(0 h, 52.2 ± 1.5%, 6 h, 62.5 ± 1.5%; 12 h, 74.1 ± 1.5%; and 18 h, 82.3 ± 1.5%, P < 0.05, Fig. 2). 그러나 체외성숙 시간의 증가에 따라 노화되는 난자 또한 증가한다. 정상적인 미세소관은 시간의 증가에 따라 감소(0h, 75.1±6.0%, 6h, 58.7±6.2%, 12h,59.7±5.5%, 18h, 42.7±5.0%, P<0.05, Fig.2)하며 또한 정상적인 microfilament 형성 또한 체외성숙시간의 증가에 따라 감소된다(0 h , 79.4% ± 8.0%, 6 h, 63.0 ± 6.2%, 12 h, 64.0 ± 5.0%, 18h, 42.7 ± 4.3%, P < 0.05.

3). MII 단계 난자의 chromatin, microtubules과 microfilaments의 조사



6시간째 (maturation)과 18h째 (maturation) MII 단계 난자의 chromatin, microtubules 과 microfilamentsoocytes 형성에 대한 관찰.

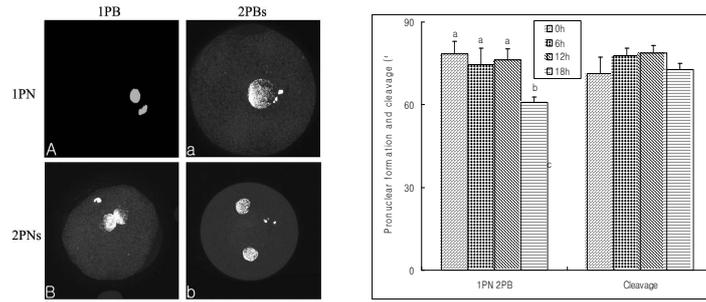
4). Western blotting 방법으로 ERK1/2의 조사



고양이 MII 단계에서의 로화 현상을 더 세밀하게 관찰하기 위하여 MAPK phosphorylation level에서 관찰하였다. 그 결과 0시간 혹은 6시간 체외성숙 그룹의 MII 단계 난자에서의 MAPK 대표물질인 ERK1/2 phosphorylation의 레벨이 12시간 혹은 18시간 체외 성숙한 MII 난자에서보다 높으며 또한 12시간 체외성숙 그룹 또한 18시간 체외 성숙한 그룹보다 더 높다.

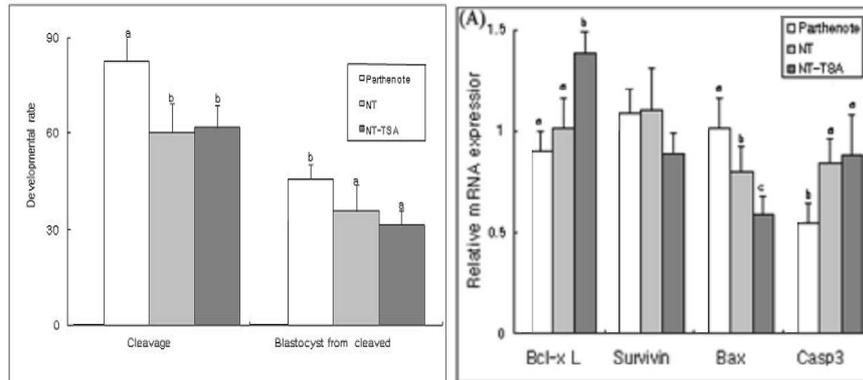
3. 고양이 체외수정/체외 배양방법 개발

1). 체외성숙 고양이 난자를 처녀생식 하였을 때 정상적인 형태인 하나의 전핵과 두 개의 극체 비율에 대한 조사



체외성숙 고양이 난자를 처녀생식 하였을 때 정상적인 형태인 하나의 전핵과 두 개의 극체를 가지고 있는 난자의 형성 율은 0 h, 6 h 와 12 h 체외성숙 그룹 에서는 큰 차이가 나타나지 않았지만 18h 체외성숙 그룹에서 많이 감소(78.5 ± 5.8%, 74.5 ± 5.0%, 75.2 ± 6.1% vs. 60.8 ± 6.8%; 0 h, 6 h, 12 vs. 18 h, respectively, Fig. 5) 되는 것으로 나타났다. 그러나 처녀생식 22~30시간 이후 제2세포기로 발달 율을 체크하였을 때 각 체외성숙 그룹 사이에 큰 차이가 없었다. (71.4 ± 5.8%, 77.8 ± 2.8%, 78.8 ± 2.8% vs. 72.7 ± 2.4%; 0 h, 6 h, 12 vs. 18 h, respectively)

2). 고양이 처녀생식란, 핵이식란, 핵이식후 TSA 처리군에서 세포의 사멸과 세포사멸에 관여하는 유전자와 mRNA 발현에 대한 조사.

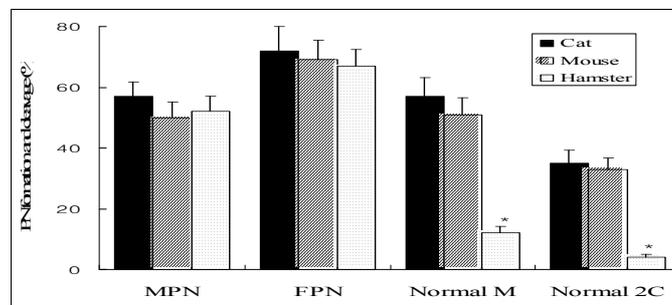


TSA 처리군에서 세포사멸 세포는 처리하지 않은 처리군보다 세포사멸 세포수가 적으며, 세포사멸촉진 유전자 발현은 다운되고 세포사멸억제 유전자 발현은 증가한다. 본 그림은 고양이의 단위발생란, 핵이식란, 핵이식후 TSA처리군에서 2세포기 배분할율과 배반포의 발달율을 조사하였다. 핵이식과정에서 탈핵후 체세포를 세포 융합이 아닌, 피에조의 기술과 체세포핵막을 깨고 체세포핵만 세포질속에 바로 주입하는 방법을 사용하였는데 체세포의 핵막이 다소 파열되지 않은 체세포들이 있는 관계로 핵이식란 및 핵이식후 TSA처리군에서 2세포기 배반할율이 낮았으나, 배반포의 배반달율을 2세포기부터 측정하였을 때 핵이식란 과 핵이식후 TSA 처리군에서 배반포의 발달율에는 차이가 없었다. 하지만 단위발생란은 배반포의 발달율

이 유의적으로 높음을 나타냈다. 3 개 처리군에서 세포 사멸에 관여하는 유전자와 ICM 및 TE 특이적으로 발현하는 유전자의 발현을 조사하였다. 핵이식후 TSA 처리군에서 핵이식군에 비하여 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-xL이 증가하였고, 반면에 pro-apoptotic 유전자인 Bax 의 발현이 감소하였다. TE 특이적으로 발현하는 유전자인 Cdx2는 TSA처리에 의하여 증가하였다.

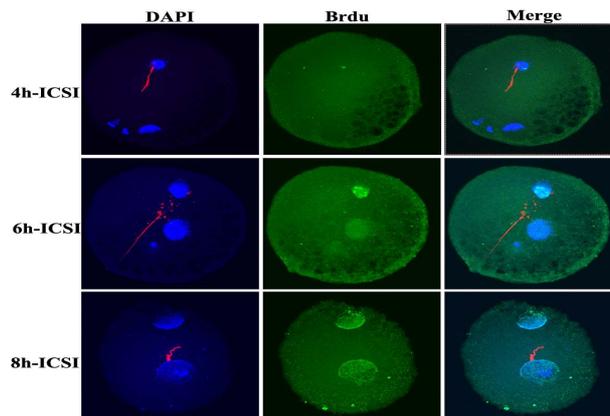
4. 고양이 난자에 이종간 정자를 주입하였을 때 미세소관의 변화 및 epigenetic reprogramming/remodeling에 대한 조사

1). 고양이 난자를 이용하여 이종간 정자를 주입하였을 때 자성, 응성 전핵 형성에 대한 조사



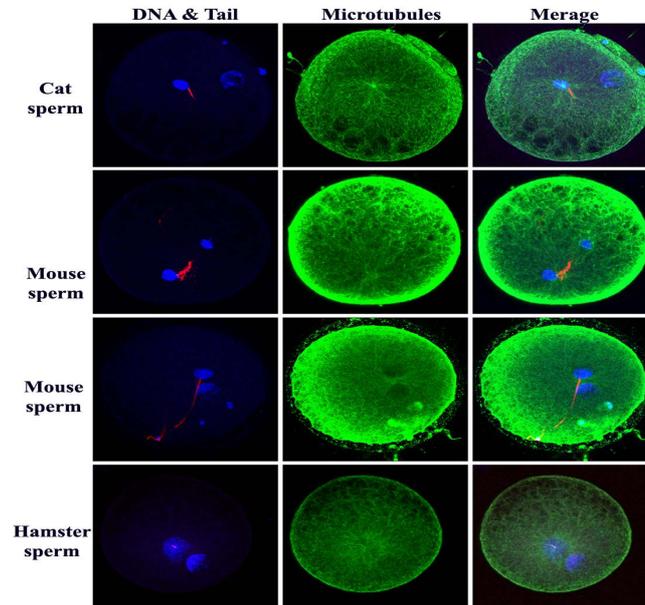
본 그림은 자성, 응성전핵 형성에는 차이가 없다. 하지만 정상적인 M-phase 와 2C의 형성에서는 고양이와 생쥐는 차이가 없지만 햄스터 정자를 주입한 그룹은 형성율이 현저하게 낮았다.

2). 고양이 난자를 이용하여 이종간 정자를 주입하였을 때 DNA 합성에 대한 조사



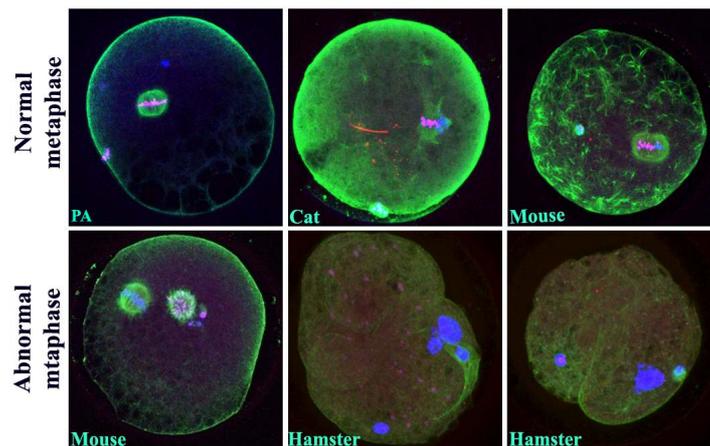
본 그림은 고양이 난자에 고양이, 생쥐, 햄스터 정자를 주입하였을 때 DNA 합성은 모두 4시간째부터 이루어지지 않고 6시간째부터 합성은 시작되고, 8시간째에는 자, 응성전핵에서 모두 일어난다.

3). 고양이 난자를 이용하여 이종간 정자를 주입하였을 때 응성전핵의 부근에서 정상체의 형성에 대한 조사



본 그림은 고양이 난자에 고양이, 생쥐, 햄스터의 정자를 주입하였을 때 모두 응성전핵의 부근에서 aster를 관찰할 수 있었다.

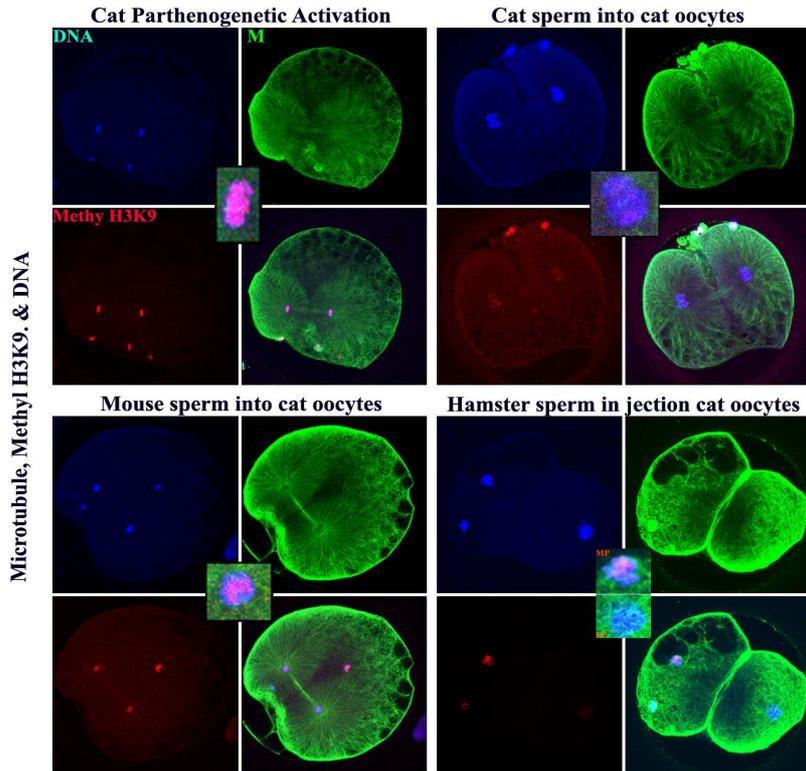
4). 고양이 난자를 이용하여 이종간 정자를 주입하였을 때 Mitotic metaphase 대한 조사



본 그림은 고양이 난자발생난, 고양이, 생쥐, 햄스터 정자를 고양이 난자에 이종간 ICSI을 하였을 때 고양이 정자와 마우스 정자를 주입한 난자에서는 정상적인 Mitotic metaphase를 관찰 할 수 있지만 햄스터 정자를 주입한 난자에서는 비정상적인 Mitotic metaphase가 형성되는 것을 관찰 할 수 있다.(14~16시간 이후

Mitotic metaphase 에 대한 관찰).

5). 고양이 난자를 이용하여 이종간 정자를 주입하였을 때 Two cell division 에 대한 조사



본 그림은 고양이 단위발생 난자와 고양이 난자에 생쥐, 고양이, 햄스터 정자의 미세주입에 의한 two cell division 발생과정은 고양이 생쥐 정자를 주입하였을 때는 정상적인 two cell division 일어 나지만 햄스터 정자를 주입하였을 때는 비정상적인 two cell division 일어나는 것을 확인(16시간 이후 two cell division 에 대한 관찰).

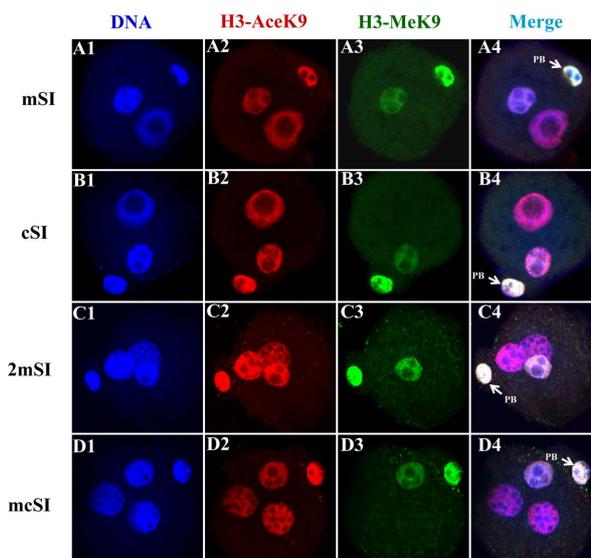
5. 고양이 정자를 이용한 이종간 배아의 epigenetic reprogramming/remodeling에 대한 조사

1). 고양이 정자를 생쥐 난자에 주입하였을 때 배아의 발달율에 대한 조사

Sperm	Total No. oocytes	2-cell (%)	4-cell (%)	Morula(%)	Blastocyst(%)
mSI	120	113 (94.2±2.23)	110 (91.7±2.46) ^a	107 (89.1±3.01) ^a	87 (72.5±4.56) ^a
cSI	240	223 (92.9±2.89)	145 (60.4±3.14) ^b	63 (26.3±3.44) ^c	13 (5.4±4.69) ^c
2mSI	74	65 (87.8±3.02)	51 (68.9±3.11) ^b	45 (60.8±3.59) ^b	20 (27.0±5.47) ^b
mcSI	87	74 (85.1±3.30)	58 (66.7±3.54) ^b	47 (54.0±3.43) ^b	22 (25.4±4.79) ^b

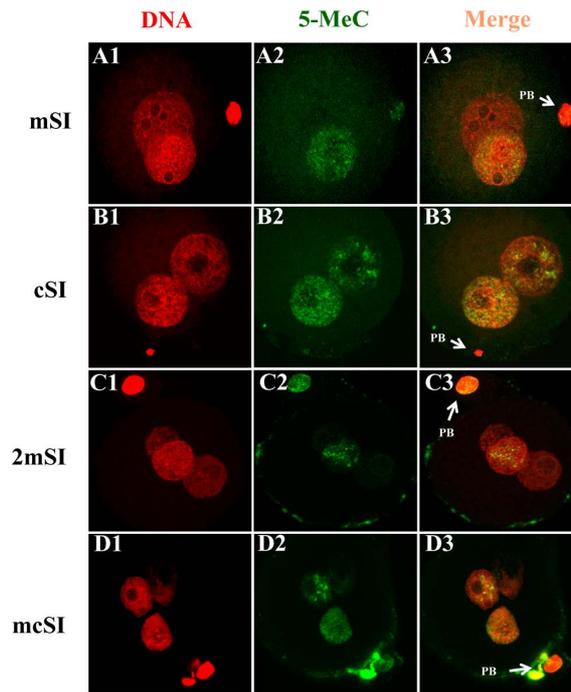
본 테이블은 대조군(mSI: 생쥐정자주입)과 처리군(cSI: 고양이정자주입, 2mSI: 두 개의 생쥐정자를 동시에 주입, mcSI: 생쥐와 고양이 정자를 동시에 주입) 배아의 발달율을 보여주었다. 2-세포기 분열에서는 대조군과 처리군에서 차이가 없었다. 하지만 처리군 배아의 4세포기, 상실배와 배반포의 발달율은 대조군보다 현저하게 낮았으며 특히는 cSI처리군에서 가장 낮은 수준을 보였다.

2). 고양이 정자를 생쥐 난자에 주입하였을 때 히스톤 단백질의 아세틸화 및 메틸화에 대한 조사



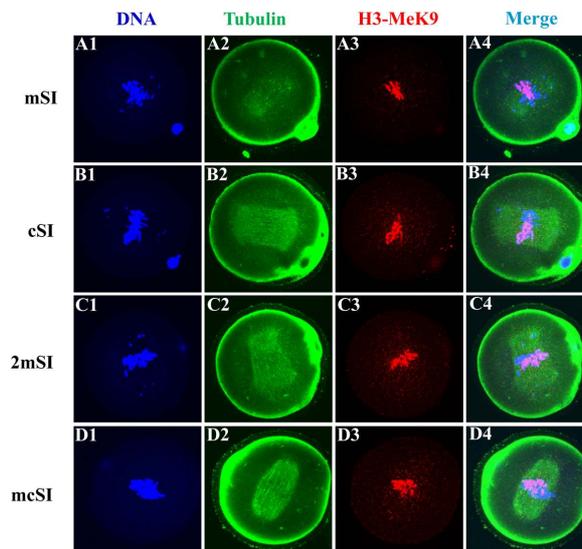
본 그림은 대조군과 처리군 배아에서 히스톤 단백질의 아세틸화와 메틸화를 조사하였는데 비슷한 발현양상을 보여주었다. 즉 정자 주입후 6시간째에 자성전핵 히스톤 단백질은 아세틸화, 메틸화 되어 있었고 응성전핵 히스톤 단백질은 아세틸화 탈 메틸화 되어 있었다.

3). 고양이 정자를 생쥐 난자에 주입하였을 때 DNA 메틸화에 대한 조사



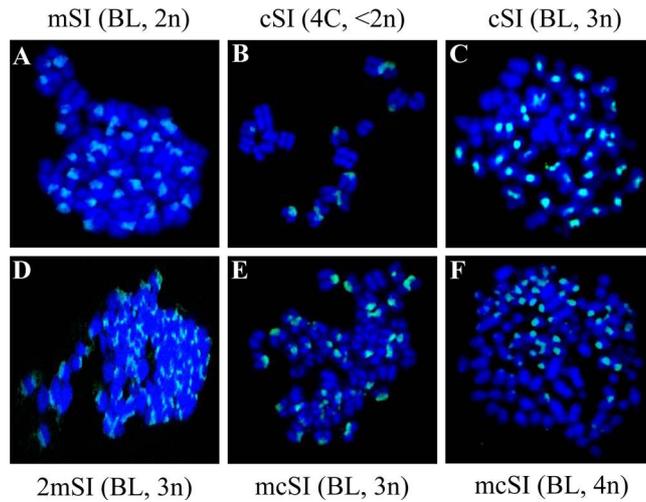
본 그림은 대조군과 처리군 배아에서 DNA 메틸화를 조사하였는데 ICSI후 10시간째에 생쥐 정자의 DNA는 탈메틸화 되어 있지만 고양이 정자의 DNA는 메틸화가 유지되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

4). 고양이 정자를 생쥐 난자에 주입하였을 때 Mitotic metaphase에 대한 조사



본 그림은 대조군과 처리군 배아의 Mitotic metaphase의 형성을 조사하였다. 정자 주입후 15시간째에 모두 정상적인 미세소관과 Mitotic metaphase를 형성하였다.

5). 고양이 정자를 생쥐 난자에 주입하였을 때 염색체 분석

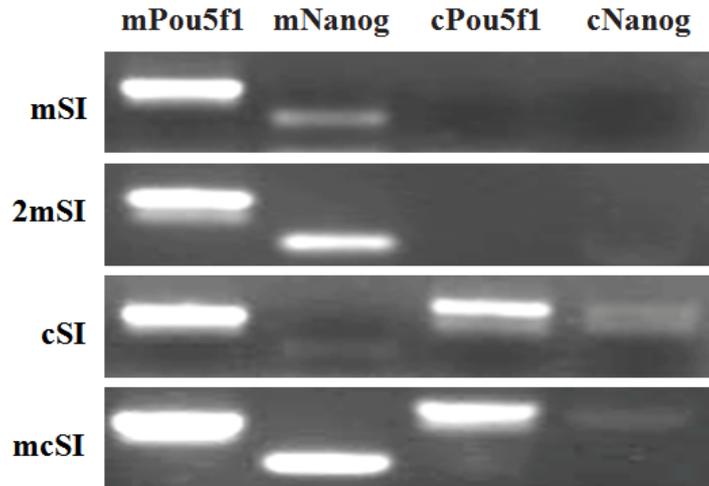


본 그림은 대조군과 처리군 배아를 생쥐 FITC-라벨된 Cot1 DNA로 hybridization 하여 염색체를 분석하였다. 파란색 시그널은 생쥐 염색체에서만 관찰할 수 있다. 그림 A와 D: 생쥐 정자를 주입한 2배체와 3배체 배반포의 염색체, 그림 B와 C: 고양이 정자를 주입한 4세포기와 배반포의 염색체, 그림 E와 F: 생쥐정자와 고양이 정자를 동시에 주입한 배반포의 염색체를 표시한 그림이다.

Embryo type (stage)	No. of metaphase plates analyzed	<2n (%)	2n (%)	3n (%)	4n (%)
mSI(BL)	20	0 (0)	19 (95.0)	1 (5)	0 (0)
cSI(4C)	28	18 (64.3)	5 (17.9)	5 (17.9)	0 (0)
cSI(BL)	10	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0 (0)
2mSI(BL)	10	0 (0)	2 (20)	8 (80)	0 (0)
mcSI(BL)	14	0 (0)	0 (0)	10 (71.4)	4 (28.6)

본 테이블은 대조군과 처리군의 염색체를 분석하였다. 대조군과 2mSI 처리군에서는 대부분(95%와 80%) 정상적인 FITC-라벨된 염색체수를 함유하고 있었다. cSI 처리군 4-세포기에서는 64.3% 2배체보다 적은 비정상적인 염색체수를 함유하고 있었다. 하지만 cSI처리군 배반포에서는 전부 3배체에 근접하는 염색체수를 가지고 있었다. mcSI처리군에서는 71.4%가 3배체 염색체수와 28.6%가 4배체에 근접하는 염색체수를 가지고 있었다.

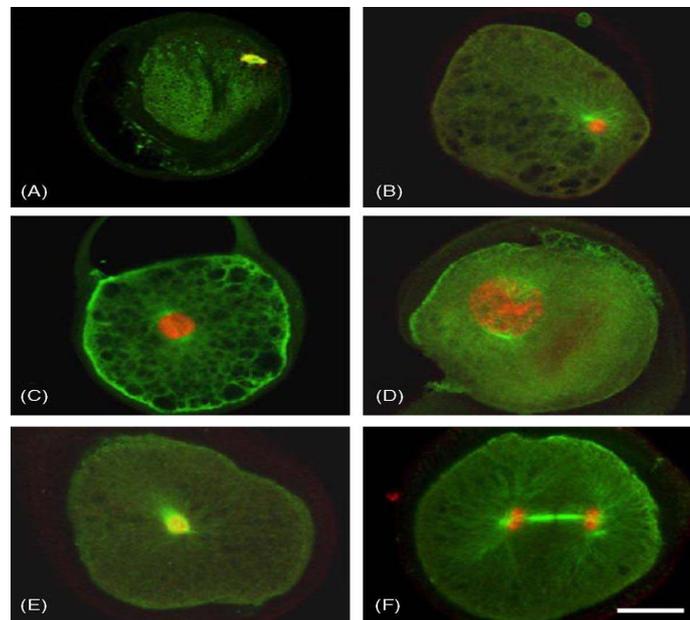
6). 고양이 정자를 생쥐 난자에 주입하여 배양된 배반포에서 유전자 발현 조사



본 그림은 고양이 계놈의 발현여부를 조사하였다. 생쥐와 고양이의 *Pou5f1*과 *Nanog* mRNA를 대조군과 처리군의 배반포 단계에서 조사하였는데 흥미롭게도 고양이의 계놈이 cSI와 mcSI처리군에서 발현하는 것을 관찰할 수 있었다.

6. 고양이 난자에 고양이와 삶의 체세포를 핵이식한후 미세소관의 변화.

1). 핵이식한후 미세소관의 변화



본 그림은 핵이식한 후 미세소관의 변화를 관찰한 그림이다. a, MII 단계의 핵과 미세소관: 핵은 미세소관의 당기는 힘에 의하여 두 개로 나누어진다. b, 핵이식 한 바로 직후의 미세소관: 핵주위에 미세소관의 성장체가 형성되었다. c, 핵이식 후 12시간째의 미세소관: 핵은 부풀어 있고 미세소관은 세포질내 퍼져있다. d, 핵이식 후 18시간째의 미세소관: 핵은 크게 부풀다. e, 고양이 체세포 핵이식 후 18시간:

metaphase 감수분열을 관찰 할 수 있다. f, 핵분열이 일어나기전의 미세소관: 미세소관성상체가 핵을 두 개로 분할시킨다.

2). 고양이와 닭의 체세포를 핵이식하였을 때 재조합된 배아의 발달율에 대한 조사.

공여세포	세포융합율(%)	재조합된 배아수	2-세포기분할율	배반포발달율(%)
고양이	46/76 (60.5)	46	28/46 (60.8)	4/46 (8.6)
닭	52/81 (64.1)	52	31/52 (59.9)	4/52 (7.6)

고양이와 닭의 체세포를 이용하여 핵이식하였을 때 세포융합율(60.5% VS 64.1%), 2세포기분할율(60.8% VS 59.9%), 배반포발달율(8.6% VS 7.6%)에서 유의적 차이를 보이지 않았다.

[제 3세부]

제 1 절. 형질전환체세포 핵이식 기법의 확립 및 형질전환복제개 생산

1. 형질전환복제개 생산 연구

가. RFP 유전자가 도입된 형질전환 세포주 생산

(1) RFP 유전자 도입용 벡터 제작 및 감염

RFP(red fluorescent protein) 유전자 도입에 레트로 바이러스 벡터 서열을 포함하고 있는 플라스미드 pLHCRW를 도입 벡터로 사용하였다 (Fig 1). pLHCRW 플라스미드는, 상업적으로 시판되고 있는 pRevTRE(Clontech Mountain View, CA, USA)의 TRE 서열을 CMV 프로모터, DsRed2 유전자 및 WPRE(Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 서열을 함유하는 fragment로 대체하여 사용할 수 있다. PT 67 세포(Clontech Mountain View, CA, USA)를 일시적으로 pLHCRW로 transfection시킨 뒤, 그로부터 얻은 바이러스를 GP2-293 세포(Clontech Mountain View, CA, USA)에 감염시킨다. LHCRW-감염된 GP2-293 세포를 2주 동안 하이그로마이신 (150 µg/ml)을 이용하여 선별하고, 이러한 HygR(hygromycin-resistant) 세포들을 pVSV-G(Clontech Mountain View, CA, USA)로 transfection하여 VSV-G 단백질을 발현시킨다. 트랜스펙션 48시간 후에 VSV-G 단백질로 포장된 바이러스들을 얻는다. 바이러스를 생산하는 세포를 포함한 모든 세포는 4.5 g/l 글루코오스(GibcoBRL, Grand Island, NY, USA), 소 태아 혈청(10%) 및 스트렙토마이신(100 µ/ml)을 함유하고 있는 DMEM 배지에서 37°C 및 5% CO2 조건에서 배양한다. 감염 및 transfection된 GP2-293 세포로부터 수거한 바이러스-함유 배지는 0.45µm 포어(pore) 크기의 필터를 통해 여과한 후, 개의 섬유아세포들을 감염시키는데 사용한다. 감염과정을 거친 섬유아세포를 하이그로마이신으로 선별한다.

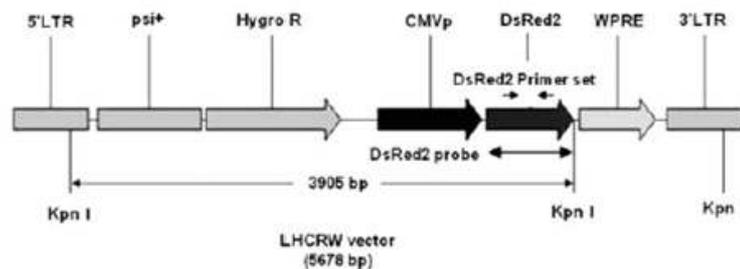


Fig 1. LHCRW provirus의 대략적인 그림. (LTR, long terminal repeat; Hyg R, hygromycin-resistant gene; CMVp, cytomegalovirus promoter; DsRed2, red

fluorescent protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.)

(2) RFP 유전자가 도입된 형질전환 세포주 확립 및 배양

항생제를 통한 선별 과정 후 정상 배양 배지로 전환하여, 세포의 신속한 증식과 배양 시 세포 사멸에 의한 불필요한 손실을 감소시키기 위해 적절한 성장인자와 세포사멸 억제제 등을 첨가하는 방법을 적용한다. 증식 배양한 세포의 효율적 보존을 위해 최적 조건을 확립하여 각 단계마다 동결을 실시한다.

나. 형질전환 세포주를 이용해 만들어진 복제배아의 발달 및 RFP 유전자의 발현

자외선 아래에서 빨강형광 단백질(RFP)을 발현하는 세포만 사용하여 체세포 핵이식을 실시한다. 체외 발달을 관찰하기 위해 형질전환된 SCNT 배아(SCNT-BF3/RFP), 형질전환되지 않은 SCNT 배아(SCNT-BF3), 단위생식시킨 배아를 각각 6-7개씩 그룹화하여 mSOF microdrop에 넣고 39.8°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂의 조건하에서 7일간 배양하였다. 체외에서의 배아 발달율은 Table 1과 같다. SCNT 배아 두 그룹의 발달율은 단위생식된 배아의 발달율보다 유의하게 낮았으나, 형질전환된 SCNT 배아와 형질전환되지 않은 SCNT 배아 간의 발달율은 2세포기(53.4 ± 0.07 vs. 58.7 ± 0.05%), 4세포기(30.2 ± 0.04 vs. 29.9 ± 0.04%), 8세포기(17.9 ± 0.04 vs. 17.4 ± 0.06%), 16-32세포기(6.2 ± 0.02 vs. 6.1 ± 0.07%)에서 유사하였다. 형질전환된 세포에서 유래한 빨강형광은 단위생식시킨 배아에서는 관찰되지 않은 반면, 형질전환된 SCNT 배아에서는 2세포, 4세포, 8세포, 16세포기에서 모자이시즘(mosaicism) 없이 관찰되었다 (Fig 2).

Table 1. 개의 체세포 핵이식 배아의 발달능력과 RFP 발현

	배양	분할(%) ^a	4세포기(%) ^a	8세포기(%) ^a	16-32세포기(%) ^a	상실배 이상(%) ^a	RFP 발현 (%)
단위생식	42	37 (87.0±0.04)*	27 (65.3±0.05)*	22 (56.2±0.05)*	11 (25.5±0.05)*	1(1.8±0.01)	-
SCNT-BF3 ^b	27	16 (58.7±0.05)**	8 (29.9±0.04)**	5 (17.4±0.06)**	2 (6.1±0.07)**	-	-
SCNT-BF3/RFP ^c	54	28 (53.4±0.07)**	15 (30.2±0.04)**	9 (17.9±0.04)**	3 (6.2±0.02)**	-	100

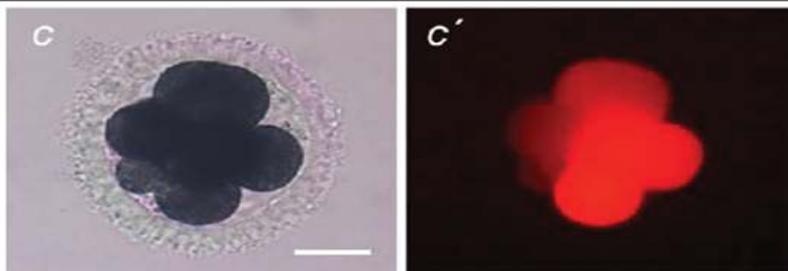


Fig 2. 형질전환 복제배아에서 RFP가 발현되는 사진

다. 빨강형광복제개의 생산

리포터 유전자인 RFP 발현 세포주를 이용하여 형질전환 복제 수정란을 생산한 후 체외 발달 양상을 모니터링하여 산자 생산의 가능성 및 모자이시즘 없이 모든 배아에서 RFP 유전자가 발현되는 것을 확인하였다. 또한 RFP 형질전환 복제 수정란을 대리모에 이식하여 임신 유지 및 관리하였으며, 건강한 RFP 형질전환 복제개 암컷 4두, 수컷 2두의 생산에 성공하였다. 총 344개의 배아(BF3/RFP 287개, BF4/RFP 57개)가 20마리의 대리모 견(BF3/RFP 16마리, BF4/RFP 4마리)의 난관에 이식되었다. 그 중 대리모 7마리(BF3/RFP 5마리, BF4/RFP 2마리)의 임신을 배아이식 25일 후에 초음파를 통해 확인하였다(Table 2). 배아 이식 후 60 ± 1일 쯤에 제왕절개 또는 자연 분만을 통해 암컷 4마리(R1- R3, R5), 수컷 2마리(R6, R7)의 형질전환된 비글을 생산하였다. 이 개체들의 정보는 Table 3에 요약되어 있다. BF3/RFP 태아 1마리(R4)는 임신 59일 쯤에 심박동이 사라져 수술적으로 회수되었다. R6은 생후 11주령에 기관지폐렴으로 폐사하였다. 생산된 모든 복제 형질전환 비글은 각각의 공여세포와 유전적으로 일치하였다. mtDNA는 모두 난자 제공견의 것으로부터 유래하였음을 확인하였다.

Table 2. 복제 개 배아의 체내 발달

핵 공여 세포	BF3/RFP	BF4/RFP	Total
핵 공여 세포의 성	암컷	수컷	-
체내 회수 난자 수	434	64	508
탈핵 난자 수	405	66	471
핵 공여 세포 주입 난자 수	396	66	462
융합 시도한 배아 수	384	66	450
융합된 배아 수 (%)	315 (82)	57 (86.4)	372 (82.7)
대리모에 이식된 배아 수	287	57	344
대리모 수	16	4	20
임신견 수/대리모 수 (%)	5 (31.3)	2 (50.0)	7 (35.0)
산자 수/이식 배아 수 (%)	4 (1.4)	2 (3.5)	6 (1.7)

Table 3. 빨강형광복제개의 생산

대리모	산자	핵공여세포	임신기간(일)	생시체중(kg)	핵형	상태	분만
1	R1	BF3/RFP	61	310	76+XX	생존 (6개월령 이상)	제왕절개
2	R2	BF3/RFP	59	270	76+XX	생존 (5개월령 이상)	제왕절개
3	R3	BF3/RFP	60	240	76+XX	생존 (5개월령 이상)	자연분만
4	R4	BF3/RFP	<30	-	-	퇴화	-
5	R5	BF3/RFP	60	260	76+XX	생존 (5개월령 이상)	자연분만
6	R6	BF4/RFP	61	330	76+XX	사망 (2개월령)	제왕절개
7	R7	BF4/RFP	60	260	76+XX	생존 (2개월령 이상)	자연분만

라. 빨강형광복제개에서 RFP 유전자의 발현

빨강형광 복제개에서의 RFP 유전자의 삽입을 확인하기 위해 Southern blot 분석과 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 실행하였다. 피부조직 및 배양된 섬유아세포에서 RFP 유전자의 삽입과 빨강형광 발현을 확

인하였다. 형질전환되지 않은 개에서는 형광이 보이지 않은 반면, 모든 형질전환 개에서는 형광을 쉽게 관찰할 수 있었다 (Fig 3). 뿐만 아니라 가시광선 하에서도 형질전환 개의 피부와 발톱에서 빨강색이 나타났다. 폐사한 R6의 모든 장기(뇌, 심장, 간, 신장, 폐, 고환, 근육, 장, 흉선, 비장, 부신, 피부, 뼈, 방광)에서도 빨강형광이 관찰되었다. 형질전환된 개의 피부로부터 분리한 섬유아세포를 현미경하에서 관찰하고 flow cytometry도 실시한 결과 역시 빨강형광 단백질의 발현이 확인되었다.

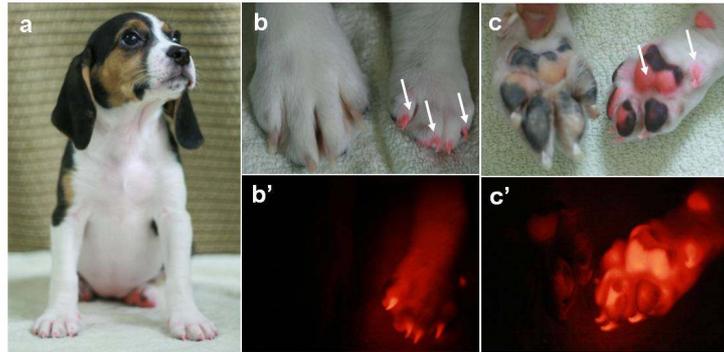


Fig 3. (a) 빨강형광개(R1, 2개월령), (b-c) R1(오른쪽)과 형질전환되지 않은 비글. (a-c) 가시광선 하의 이미지. (b', c') 형광 이미지.

마. 형질 전환 복제개의 번식능력 검증 및 자견에서의 발현 양상 확인

생산된 형질전환 복제 개의 번식 능력을 검증하였으며, 후속세대 검증을 위해 수행한 실험에서 도입된 유전자가 형질 전환 복제비글의 후대에서도 성공적으로 발현함을 확인하였다.

Table 4. 빨강형광복제개의 2세대의 생산

빨강형광복제개	교배/인공수정	임신기간(일)	산자	생시체중(kg)	성
R3-b	신선정액의 질내주입	60	R3-b-1	330	수컷
			R3-b-2	270	암컷
			R3-b-3	-	수컷



Fig 4. 빨강형광복제개의 2세대 (a) 임신진단을 통해 심박 뛰는 것을 확인, (b-d) 빨강형광복제개의 2세대와 일반개의 비교사진

2. 지방 줄기세포를 이용한 형질전환복제개 생산

가. 개 지방줄기 세포의 분리 및 배양

개의 지방줄기세포를 분리하기 위해 RFP 유전자가 삽입된 형질전환 복제 비글의 서혜부에서 지방조직을 회수하여 phosphate buffered saline (PBS)으로 washing하였다. 그 다음 미세가위를 이용하여 페트리 디쉬 내에서 조직을 잘게 자르고 1 mg/ml collagenase I을 처리하여 60분간 37 °C에서 교반시켜 조직을 분해시켰다. 100 μ m cell strainer를 이용하여 분해된 조직을 걸러내고 원심 분리하여 세포 분획을 얻었다. 상층액을 제거하고 세포를 회수하여 지방줄기세포 배양 배지(RKCM)에 넣고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 다음날 배양 접시에 세포가 부착되었는지 현미경으로 관찰하고 PBS로 washing하여 떠있는 세포를 제거하고, 배양배지를 첨가해주었다. 세포를 4-5일간 배양하여 confluence에 도달하면 0계대의 지방줄기세포를 동결 보존하였다.

나. 개 지방줄기 세포의 체외 분화

(1) 골원성 유도(Osteogenic induction)

동결보존되어 있는 0계대의 지방줄기세포를 배양하여 2계대에 도달하였을 때에 50% confluency에서 세포배양 배지를 각각 골아세포 분화유도 배지(NH Osteodiff medium), 로 교환해주었다. 3일마다 배지의 90%를 교환해주면서 14일간 배양하였다. 분화된 세포를 70% 에탄올로 고정, Alizarin red S로 염색한 후 washing하여 현미경하에서 관찰하였다.

(2) 지방원성 유도(Adipogenic induction)

2계대의 지방줄기세포 50% confluency에서 세포배양 배지를 지방세포 분화 유도 배지(NH Adipodiff medium)로 교환해주었다. 3일마다 배지의 90%를 교환해주면서 21일간 배양하였다. 분화된 세포를 10% formalin으로 고정, Oil red O solution으로 염색한 후 washing하여 현미경하에서 관찰하였다.

(3) 근원성 유도(Myogenic induction)

2계대의 지방줄기세포 50% confluency에서 세포배양 배지를 근세포 분화유도 배지(SKGM medium)로 교환해주었다. 3일마다 배지의 90%를 교환해주면서 14일간 배양하였다. 분화된 세포를 4% paraformaldehyde으로 고정, human anti-myosin항체로 면역염색한 후 역상 형광 현미경하에서 관찰하였다.

(4) 신경원성 유도

2계대의 지방줄기세포 50% confluency에서 세포배양 배지를 신경세포 분화유도 배지로 교환해주었다. 8-10일간 배양하여 분화를 유도하였다. 분화된 세포를 4% paraformaldehyde으로 고정, human MAP2 항체와 NSC 항체, TUJ1 항체, GFAP 항체로 면역염색한 후 역상 형광 현미경하에서 관찰하였다.

(5) 연골원성 유도

2계대의 지방줄기세포를 polypropylene tube에서 연골세포 분화유도 배지(NH chondrogenic medium)를 넣어 배양하였다. 3-4일마다 배지의 50%를 교환해주면서 14일간 배양하였다. 분화된 세포를 10% formalin으로 고정, Toluidine blue O로 염색한 후 역상 형광 현미경하에서 관찰하였다.

(6) 분화 유도 결과

개의 지방줄기세포를 각각 지방세포, 골아세포, 근세포, 신경세포, 연골세포로 분화시켜 관찰한 결과는 Fig 5와 같다. 먼저, RFP 유전자의 발현이 형광현미경 하에서 확인되었다(Fig. 5A2, 5B2, 5C2; 6A2) (x100). 골세포로의 분화는 100%에 가깝게 이루어졌고(Fig. 5A3, 5A4), 근세포로의 분화는 길고 다핵을 가진 세포의 모양과 면역염색상을 통해 확인되었다(Fig. 5B1, 5B4). 연골세포로의 분화는 toluidine blue O로 염색한 후 세포 바깥쪽의 proteoglycan으로 형성된 빈 공간(lacunae)으로 확인되었다(Fig. 5C3, 5C4). 지방세포로의 분화는 Oil red O로 염색된 세포질 내에 형성된 공포로 확인되었는데(Fig. 6A4, 6A5), 이것은 대조군에서는 염색되지 않은 것(Fig. 6A3)과 대조를 이룬다. 신경세포로의 분화는 신경세포 marker(MAP-2, NSE, TUJ1 항체 ; 녹색), 정상세포(astrocyte) marker (GFAP; 녹색)로 확인할 수 있었다 (Fig. 6B2, 6B3, 6B4 and 6B5).

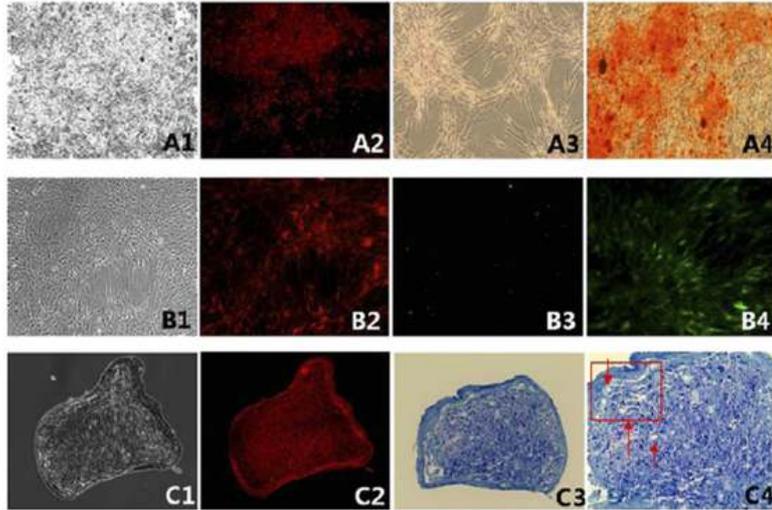


Fig 5. 빨강형광개에서 유래한 지방줄기세포를 체외에서 골원성, 근원성, 연골원성 세포로 분화 유도. (A1) 골원성 분화 모양, (A2) RFP 발현, (A3) 지방줄기세포 배양배지로 배양한 대조군(음성 대조군)의 14일 후 모습으로 Alizarin red S 염색에 반응하지 않았다. (A4) 반면 골원성 분화배지로 배양한 세포의 경우 13일 후에 모양 변화와 Alizarin red S에 반응하는 광물질 침착을 보였다 (이상 x100). (B1) 근원성 분화 모양, (B2) RFP 발현 (B3) myosin 면역염색에 반응하지 않은 음성 대조군, (B4) myosin 면역염색에 반응한 근원성 분화 결과(녹색)이다 (이상 x200). (C1) 연골원성 분화 모양, (C2) RFP 발현, (C3) toluidine blue O로 염색된 세포 바깥쪽의 proteoglycan으로 형성된 빈 공간(lacunae) (이상 x100), (C4) 화살표로 표시한 lacunae (x200).

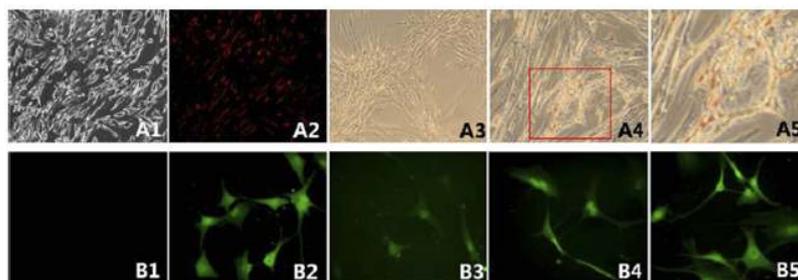


Fig 6. 빨강형광개에서 유래한 지방줄기세포를 체외에서 지방원성, 신경원성 세포로 분화 유도. (A1) 지방원성 분화 모양, (A2) RFP 발현, (A3) Oil red O 염색에 반응하지 않은 음성 대조군, (A4) 세포질 내 지방방울 축적과 세포 모양 변화, Oil red O 염색에 반응한 지방원성 분화 결과 (이상 x100), (A5) A4의 세포질 내 지방방울 축적을 확대한 사진. (B1) 신경원성 분화를 유도하지 않은 음성대조군, (B2) NSE 면역염색, (B3) MAP-2 면역염색, (B4) TUJ1 면역염색, (B5) GFAP 면역염색에 양성 결과를 보였다(이상 x400).

(7) FACS 분석

개의 지방줄기세포를 2×10^5 cells/100 μ l 농도로 5% 우태아혈청(Bovine Serum Albumin, BSA)이 포함된 PBS에 부유시켜 간엽줄기세포 특이적인 CD29 (1:100, BD Biosciences, San Jose, CA), CD73 (1: 100, BD Biosciences), CD44 (1: 100, Serotec, Oxford, UK), Thy1.1 (1:100, Serotec) 항체로 면역염색하였다. 위의 항체는 Fluorescein isothiocyanate(FITC)가 결합된 것이었다. 또한, CD31 (1:100, BD Biosciences), CD105 (1:100, BD Biosciences), CD34 (1:100, Serotec) 항체는 phycoerythrin (PE)이 결합된 것을 사용하였다. CD34, CD44, Thy1.1은 개 특이적인 항체이고, 나머지 다른 항체는 사람의 항체이다. 각 항체를 부착시킨 세포를 FACS Calibur (BD Biosciences)로 분석하였다. 개의 지방줄기세포는 섬유아세포와 비슷한 형태로 배양접시에 부착되었고(Fig 7A), RFP 발현이 현미경 하에서 관찰되었다 (Fig 7B). 간엽줄기세포 특이 marker의 발현을 flow cytometry로 분석한 결과, 실험된 개의 지방줄기세포는 CD29, CD44, Thy1.1에 대해 양성을 보인 반면, CD31, CD34, CD73, CD105는 음성을 보였다 (Fig 8).

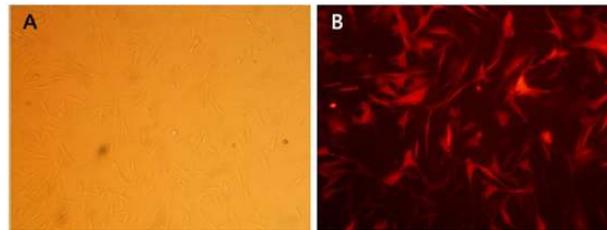


Fig 7. 빨강형광복제개에서 유래한 지방간엽줄기세포의 형태. (A) 가시광선 하의 이미지, (B) 형광 이미지 (x200).

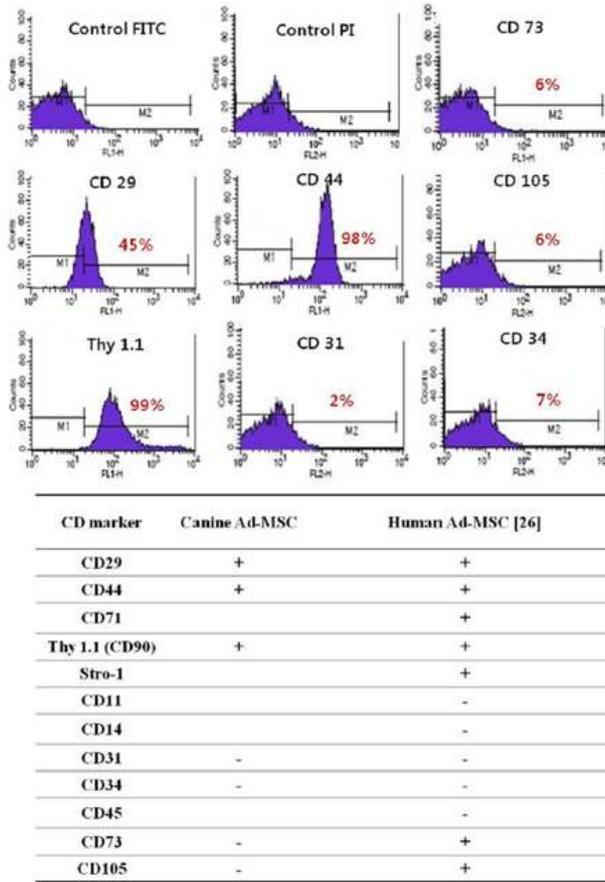


Fig 8. CD29, CD44, Thy1.1, CD31, CD73, CD105, CD34 발현을 알아보기 위한 FACS 분석. 세포의 비율은 비특이적 형광(대조군)과 비교하여 특정 항체 염색시 형광 강도를 나타낸다.

다. 체세포 핵이식

개의 지방줄기세포를 5% FBS가 포함된 RKCM에서 배양하여 2-5계대의 지방줄기세포를 SCNT의 공여세포로 사용하였다. 배양된 세포에 0.25% EDTA-trypsin을 처리하여 세포를 배양접시로부터 떼어내고, 잠종건의 체내에서 배란되어 72시간동안 성숙된 난자 121개를 수술적으로 회수하여 준비하였다. 이 중 109개의 난자의 핵을 미세조작기로 제거하고 역상 현미경의 RFP 특이 filter (510-560nm)로 RFP 형광이 확인된 지방줄기세포를 탈핵된 난자의 위란강에 주입한 다음, 72V의 직류를 15 μ s(microseconds) 동안 흘려 세포와 난자의 세포질을 융합시켰다. 융합된 82개의 난자와 세포는 4분 동안 10 μ M의 calcium ionophore에서 배양하여 활성화시키고 4시간 동안 6-demethylaminopurine에서 배양하여 배아를 재구성되도록 하였다. 재구성 후, 복제 배아 82개를 자연적으로 임신 준비가 된 5마리의 대리모의 난관에 수술적으로 이식하였다(Table 5). 임신은 배아 이식 25-30일 후에 초음파로 진단하고, 태아수는 이식 후 45일 쯤에

X-ray로 확정하였다. 5마리의 대리모 중 1마리가 분만까지 임신을 유지하여 배아 이식 후 60일 쯤에 2마리의 건강한 재복제견을 자연 분만을 통해 생산하였다.

Table 5. 개의 지방줄기세포를 이용한 SCNT

반복수	난자공여견 수	난자 성숙도	회수난자 수	지방줄기세포 도입된 난자 수	융합된 배아 수
1	2	성숙	20	20	15
2	2	노화	19	17	15
3	3	성숙	30	26	19
4	2	성숙	23	23	20
5	3	노화/성숙	29	23	13
계	12	-	121	109	82 (75.2%)

라. 계통분석

복제개의 유전적 정체성을 확인하기 위하여 공여세포와 복제개, 대리모의 microsatellite 분석을 실시하였다. 복제개의 유전자형 분석을 위해 PEZ1, PEZ5, PEZ6, PEZ8, PEZ12, PEZ20, FH2010, FH2054, FH2079의 9가지 marker를 이용하였다. 두 마리의 복제개 모두 체세포 공여견과 유전적으로 동일함이 증명되었다 (Table 6).

Table 6. 재복제된 비글의 microsatellite 분석

마커	첫 번째 복제개	두 번째 복제개	핵공여 세포	난자 공여견1	난자 공여견2	대리모
PEZ1	114	114	114	118/114	122/118	114
PEZ5	105/101	105/101	105/101	109/101	113/109	101
PEZ6	192/184	192/184	192/184	187	187/185	180
PEZ8	231	231	231	235/227	231	235/219
PEZ12	271/261	271/261	271/261	295/277	269	284
PEZ20	175	175	175	179/175	179	179/175
FH2010	231/227	231/227	231/227	239/231	235/227	235/231
FH2054	153/144	153/144	153/144	170/162	166/149	166/149
FH2079	273	273	273	277/273	290/269	273

마. 복제 산자에서 RFP 유전자의 발현

Leica 역상 현미경과 Texas red filter set을 이용하여 복제개 2마리의 전신에서 강한 빨강형광을 관찰하였다. 빨강형광은 $540\pm 20\text{nm}$ 의 빛을 쬐었을 때에 생성되었고, $600\pm 25\text{nm}$ 의 파장으로 emission filter에 의해 검출되었다 (Fig 9D). 가시광선 하에서도 피부와 발톱에서 붉은색을 확인하였고, 이를 통해 형질전환되지 않은 개와 쉽게 구별되었다 (Fig 9B). 2마리 중 1마리의 복제개는 대리모의 무관심으로 인해 폐사하여 부검하였으나 어떠한 병리적, 해부학적 이상도 발견되지 않았다. 빨강 형광은 뇌, 심장, 간, 신장, 폐, 고환, 근육, 장, 흉선, 비장, 부신, 피부, 뼈, 방광 등 다양한 장기에서 모두 관찰되었다.



Fig 9. (A) RFP 형질전환 복제개의 지방줄기세포를 이용하여 복제한 생후 2일령의 재복제개. 각각 Magic, Stem이라 명명하였다. (B) Magic은 RFP 유전자를 가지고 있어 가시광선 하에서도 발톱과 발바닥에서 빨강색이 확인되며 (왼쪽), 이는 형질전환되지 않은 동령의 비글(오른쪽)에서는 관찰되지 않는다. (C) 가시광선 하의 이미지, (D) 형광 이미지.

3. 외래유전자 발현 조절 가능한 형질전환 복제개 생산연구

가. Inducible transgene의 도입을 위한 벡터 제작

CMV (cytomegalovirus promoter)에 의해 조절되는 rTA (Tetracycline-controlled transactivator)나 rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator)를 발현하는 전사요소 융합 유전자 (fusion gene), 그리고 pCMV와 tetO (Tet operator DNA sequence)와 결합한 정보제공 유전자 (reporter gene)의 두 개로 이루어진 Tetracycline 및 그 유도체에 의해 유전자 발현이 조절되는 체계를 작성하였다. 본 연구에서 사용된 Tet-on 체계에서는 tetracycline 및 그 유도체가 있으면 tTA는 tetO에 결합하여 전사를 활성화시키지만 tetracycline 및 그 유도체가 없으면 tTA가 tetO에 결합할 수 없기 때문에 전사가 중단되도록 작성하였다. Tetracycline 및 그 유도체에 의해 유전자 발현이 조절되는 체계는 retrovirus를 사용하여 만들었다. 본 연구에서는 retrovirus가 가지고 있는 문제점을 극복하기 위해서 VSV-G 당단백질을 피막으로 가지는 pseudotyped retrovirus vector system을 이용하였는데, 이 retrovirus는 물리적인 충격에 매우 안정하여 농축 시에도 감염성 손실이 거의 없다. 또한 WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 서열을 도입하여 mRNA 합성의 효율성을 증가시키고 이에 따라 단백질의 합성도 향상시켰다. 따라서 제작된 plasmid는 eGFP 정보 제공 유전자, PGK (phosphoglycerate kinase) 촉진자, 그리고 rtTA2S-M2 trans-activator sequence를 pRevTRE

plasmid에 결합시킨 것이다. PT67 세포를 순간적으로 pTet2-GFPW에 형질전환시킨 후에 그 결과물을 GP2-293 세포에 적용하였다. pTet2-GPTW에 감염된 GP2-293 세포는 hygromycin B로 2주 동안 선별하였고, 그 결과 얻은 세포를 pVSV-G에 형질전환 시켰다. 형질전환 48시간 후에 virus 생산 세포는 glucose (Invitrogen, Carlsbad, CA), fetal calf serum, penicillin, 그리고 streptomycin이 들어간 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 배양하였다.



Fig 10. Doxycycline에 의해 eGFP의 발현이 조절되는 벡터 시스템. (HygR, hygromycin B-resistance gene; TRE-tight, modified version of the tetracycline-response element (TRE); mCMV, minimal cytomegalovirus promoter; eGFP, enhanced green fluorescent protein; PGK, phosphoglycerate kinase promoter; rtTA2s-M2, reverse tetracycline transactivator; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element sequence.)

나. 유전자의 체세포 내 도입 및 도입된 체세포의 선별, 계대 배양 및 동결보존

감염 및 트랜스팩션된 세포로부터 수거한 바이러스-함유 배지는 0.45 μ m 포어 (pore) 크기의 필터를 통해 여과한 후, 개의 섬유아세포들을 감염시키는데 사용하였다. 외부 유전자를 도입하기 위해 개의 태아유래 섬유아세포를 최적조건에서 성장시킨 후 trypsin-EDTA를 처리하여 단일세포로 만들어 계대배양하면서 최소한 실험 하루 전에 신선한 배양액으로 교체하고, 최적의 세포밀도가 될 때까지 세포를 배양하였다. 바이러스 벡터의 감염을 통하여 외부 유전자가 도입된 세포는 하이그로마이신 (150 μ g/ml)이 함유된 배지에 6일간 배양하여 외부 유전자가 발현하는 세포만을 선별 및 증식시킨 후, 트립신 효소처리에 의해 단세포로 만들었다. 도입된 유전자 벡터에 이용된 양성 마커(positive marker)인 하이그로마이신(hyglomycin) 저항유전자는 외부 유전자와 함께 세포내로 도입되어 발현되면 하이그로마이신 저항성단백질을 생산한다. 따라서 적중된 세포를 항생제가 포함된 세포배양액에 배양하면 외부유전자 벡터가 도입된 세포는 생존하게 되고, 그 외의 세포들은 항생제의 독성에 의해 사멸되어 일정 시간 후에는 유전자가 적중된 세포만 증식한다. 항생제를 통한 선별 과정이 이루어진 후 정상 배양액으로 전환하고, 세포의 신속한 증식과 배양 시 세포 사멸에 의한 불필요한 손실을 감소시키기 위해 적절한 성장인자와 세포사멸 억제제 등을 첨가하는 방법을 적용하였다. 증식 배양한 세포의 효율적 보존을 위해 최적 조건을 확립하여 각 단계마다 동결을 실시하였다.

다. 확립된 형질전환 체세포주에서 외부 도입 유전자의 발현 조절 여부 검증

형질전환 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배양하였다. TRE 부위가 tetracycline 및 그 유도체에 제대로 반응하는지 살펴보기 위해서 doxycycline을 사용하였다. 1 µg/ml의 doxycycline을 배지에 첨가하여 일주일 동안 eGFP 유전자의 발현을 관찰하였으며 (Fig 11b), 24시간 동안 eGFP 유전자를 발현시킨 뒤 배지에서 doxycycline을 제거하여 eGFP 유전자의 발현이 감소하는지의 여부를 관찰하였고, FACS 분석을 실시하였다 (Fig 11d).

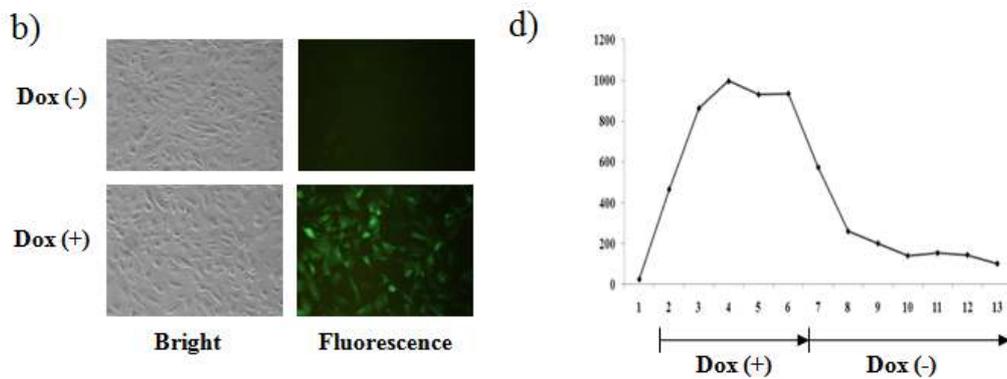


Fig 11. 형질전환 세포주에서 doxycycline 처리에 따라 조절되는 eGFP 발현. (b) doxycycline을 24시간 동안 처리하기 전, 후의 사진 (d) doxycycline을 5일 동안 처리하는 동안 eGFP 발현 양상의 변화를 FACS로 분석

마. 형질전환 복제란에서의 외래 유전자 발현 조절 연구

개의 형질전환 세포주와 소 난자를 사용하여 이용한 이종간 체세포 핵이식 후 발달률을 관찰하여 형질전환 개 생산의 가능성을 타진하고, 생산한 이종간 형질전환 체세포 핵이식란에서 도입된 외래 유전자의 유도에 의한 조절 여부 검증하였다.

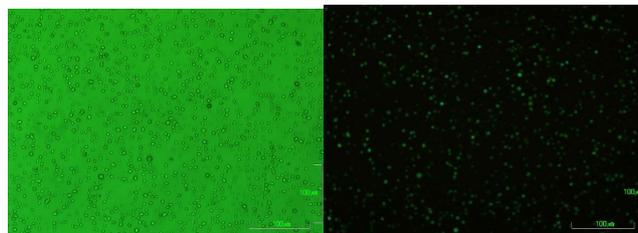


Fig 12. 체세포 핵이식 과정을 위해 준비한 단세포 부유액에서 eGFP 유전자가 발현되는 사진. 가시광선 하의 이미지 (왼쪽)와 형광 이미지(오른쪽).

바. 형질전환 복제개의 생산

총 203개의 체내 성숙 난자를 회수하였고, 182개의 난자에서 핵을 제거한 뒤, 135개의 복제 배아를 생산하여 9마리의 대리모에 이식하였다. 이식 후 최소 26일 이후에 초음파를 사용하여 임신진단을 실시하였고, 3마리가 임신이 된 것을 확인하였다. 임신된 3마리의 대리모는 각각 형질전환 복제개(Tet-on eGFP개)를 1마리씩 생산하여 본 연구에서 대리모 대비 임신률은 33%를 기록하였다.

Table 7. Tet-on eGFP 개의 생산

대리모	회수된 체내성숙 난자 수	탈핵 난자수	융합된 배아수 (%)	대리모에 이식된 배아수	임신 진단 태아수
1	15	15	100	15	0
2	33	33	48.5	16	0
3	14	14	64.3	9	0
4	19	19	68.4	12	0
5	17	11	90.9	10	0
6	16	16	87.5	14	0
7	45	33	75.8	22	1
8	18	18	88.9	16	1
9	26	23	91.3	21	1
Total	203	182	76.4	135	3

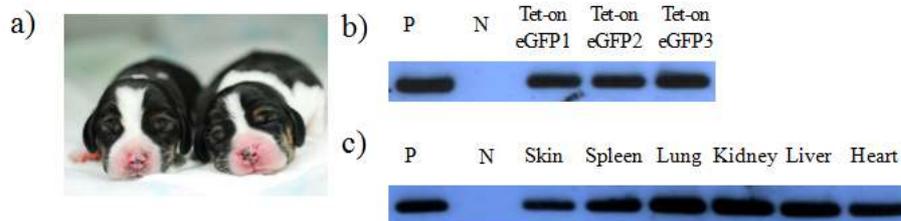


Fig 13. Tet-on eGFP 개에서 외래유전자의 검출

제 2 절. 유용견 복제 및 노령견 복제 생산 연구

1. 노령의 소형품종 개 복제 생산 연구

가. 토이푸들의 공여세포 확보 및 체세포 핵이식

(1) 암컷 개 복제란 이식에 의한 산자의 생산

14세의 고령의 토이푸들에서 피부 생검을 통해 성체 섬유모세포를 분리, 계대 후 동결하였다. 3-8 계대에 있는 세포가 체세포 핵이식에 사용되었다. 체세포 핵이식 실험이 있기 3-4일 전에 동결된 세포를 풀어서 배양접시에 가득 칠 때까지 배양하고 트립신(trypsin)을 1분간 처리하여 회수하였다. 생체 내에서 성숙된 개 난자는 배란 후 72 시간이 되는 시점에 회수하였다. 이렇게 회수된 난자의 핵을 염색하여 탈핵을 실시하였고, 미세 피펫을 사용하여 공여 체세포를 난자의 난황주위공간(perivitelline space)에 주입하였다. 미세주입 후에 전기 융합을 실시하고 현미경 하에서 융합이 되었는지 확인하였다. 융합된 난자를 화학적인 방법으로 4분 간 활성화한 뒤 배양배지 속에서 배양하였다. 배양 4시간 후에 수술적인 방법으로 대리모의 난관에 재구성된 난자를 이식하였다. 이식 후 23일 쯤에 초음파로 임신을 진단하였고, 제왕절개를 통해 산자를 생산하였다.

(2) 생산된 산자의 마이크로새털라이트 및 미토콘드리아 DNA 분석

유전적인 동일성을 확실히 하기 위해서 핵 공여 섬유모세포, 난자 공여견, 복제견, 대리모 사이의 혈통학적 분석을 실시하였다. 배양된 섬유모세포, 체세포 공여견과 복제견 및 대리모의 피, 그리고 전혀 연관이 없는 세 마리의 푸들로부터 DNA를 추출하였다. 개에서 유래된 다음 14 개의 표지가 마이크로새털라이트 분석을 위해 사용되었다: PEZ1, PEZ2, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ10, PEZ11, PEZ12, PEZ13, PEZ16, PEZ17, FH2010, FH2054, FH2079. 개 미토콘드리아 DNA 염기서열을 기본으로 프라이머를 제작하였다. PCR을 수행하여 염기서열을 증폭한 뒤 Kit를 통해 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 이용하여 미토콘드리아 DNA 분석을 실시하였고, 평균 텔로미어 길이는 복제견, 핵 공여견, 같은 나이의 다른 개에서 비교하였다.

나. 난자의 성숙도와 체세포 핵이식의 효율분석

미성숙에서 심하게 노화된 정도까지 다양한 성숙정도를 나타낸 502 개의 난자를 46 마리의 개로부터 얻었다. 이 중 484 개가 체세포 핵이식에 사용되었다. 369 개의 난자 (76.2%) 가 융합되었다. 358 개의 난자가 활성화되어 20 마리의

개의 난관에 이식하였다. 이는 평균적으로 17.9개의 난자가 한 마리의 대리모에 이식되었음을 의미 한다 (Table 8).

Table 8. 체세포 핵이식 후의 임신률

대리모	난자 공여건 수	난자 상태 ^a	재구성된 배아 수	임신	복제산자
A	2	성숙, 초기 노화	17	-	-
B	2	둘다 성숙	18	+	1
C	2	둘다 초기 노화	17	-	-
D	2	초기 노화, 미성숙	18	-	-
E	3	두 개 미성숙, 성숙, 심한 노화	20	-	-
F	2	둘다 성숙	17	-	-
G	2	노화, 성숙	16	-	-
H	5	두 개 미성숙, 두 개 초기 노화, 중등도 노화	52	-	-
I	2	성숙, 중등도 노화	5	-	-
J	2	둘다 초기 노화	15	-	-
K	2	둘다 미성숙	7	-	-
L	2	둘다 초기 노화	12	-	-
M	2	미성숙, 성숙	12	-	-
N	2	둘다 중등도 노화	15	-	-
O	3	미성숙, 초기 노화, 중등도 노화	25	-	-
P	2	미성숙, 성숙	12	-	-
Q	1	미성숙	4	-	-
R	2	둘다 미성숙	26	-	-
S ^b	2	성숙, 중등도 노화	20	+	-
T	3	성숙, 두 개 중등도 노화	30	-	-
계(n=20)	46		368	2(10.0%) ^c	1(0.3%) ^d

^a 배란 후 약 72시간에 난관으로부터 회수한 성숙 난자의 상태

^b 임신한 대리모가 끝까지 임신을 유지하지 못함

^c 총 대리모 수를 기준으로 한 퍼센트

^d 총 이식된 SCNT 난자의 수를 기준으로 한 퍼센트

다. 유전학적 분석

두 마리의 대리모에서 이식 23 일 후 임신을 확인하였다. 그러나 이들 중 한 마리의 대리모에서 태아의 심장박동이 이식 37 일째에 관찰되지 않아, 이 태아는 이식 37 일 만에 수술적으로 회수하였다 (Fig 14). 반면 다른 대리모에서 임신은 잘 유지되어 건강한 암컷 푸들 (몸무게 190 g)이 이식한지 60 일 후 제왕절개를 통해서 태어났다. 또한 제왕절개 수술을 통해 중에 2개의 착상 흔적을 확인할 수 있었다. 이것은 비정상적인 발생으로 인해 발달이 멈춘 것으로 추측되며, 남아있는 태아/태반 조직은 점차적으로 흡수되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 14C, D). 이러한 유산은 이전 연구에서는 관찰할 수 없었던 것이었는데 이는 동물 복제 기술의 불완전성 때문으로 생각된다. 이러한 원인으로 미토콘드리아 DNA의 불일치(체세포를 제공한 소형견과 난자 공여견/대리모가 된 대형견 사이의 차이)가 태아발생에 영향을 미친 것으로 예상 가능하다. 태어난 복제 푸들은 체세포 공여 개와 비슷한 표현형을 나타내었다 (Fig 14).

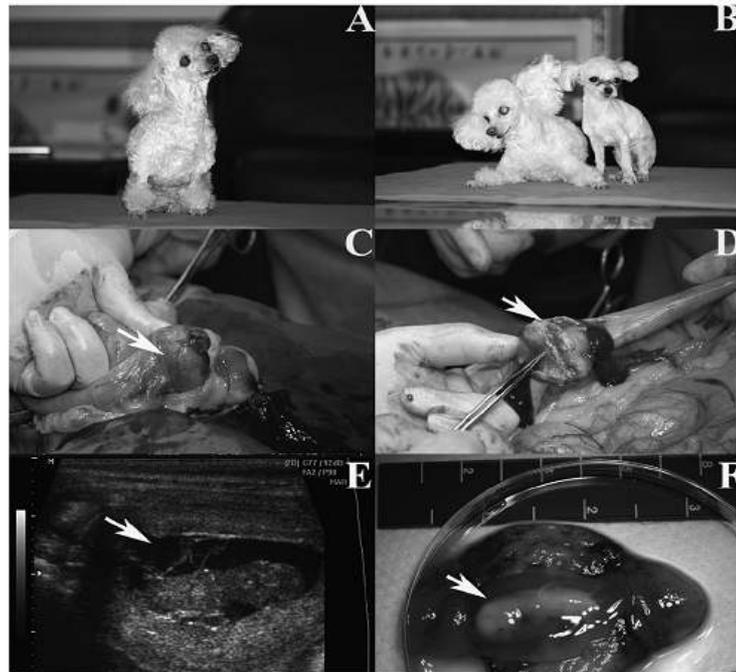


Fig 14. (A) 체세포를 공여한 노령 푸들 (B) 공여 체세포와 체세포 핵이식 기술을 통해 생산한 복제개 (C, D) 제왕절개시 복제견을 생산한 대리모의 자궁에서 두 개의 퇴화된 태반(화살표)을 발견하였다. (E) 임신 37일 짜에 다른 대리모에서 임신은 확인되었으나 태아의 심박동이 확인되지 않은 초음파 사진. (F) (E)에서 심박동이 없음을 관찰한 직후 복제 태아 (화살표)를 수술적으로 회수하였다.

라. 미토콘드리아 DNA 분석

혈통 분석을 통해 체세포 공여견과 복제 푸들은 유전학적으로 완전히 동일한 개체인 것을 알 수 있었다 (Table 9). 그러나 복제된 푸들의 미토콘드리아 DNA는 난자를 제공한 대형견에서 유래한 것으로 나타났다 (Table 10). 이번 연구에서도 이전 연구의 결과와 마찬가지로 난자를 제공한 개의 미토콘드리아 DNA가 복제 개에 전달되었음을 확인했다.

Table 9. 복제 푸들의 위성분석

마커	핵공여 세포		복제푸들1		대리모		일반푸들1		일반푸들2		일반푸들3	
	피크1	피크2	피크1	피크2	피크1	피크2	피크1	피크2	피크1	피크2	피크1	피크2
PEZ01	111	115	111	115	11	127	115	123	115	115	119	123
PEZ02	126	130	126	130	126	130	122	126	114	130	122	130
PEZ03	121	124	121	124	214	140	124	127	131	134	121	124
PEZ05	109	109	109	109	101	101	109	109	106	106	101	106
PEZ06	171	171	171	171	171	187	179	191	171	195	179	187
PEZ10	287	299	287	299	291	291	283	295	295	295	287	291
PEZ11	138	142	138	142	130	134	134	138	134	138	134	148
PEZ12	264	264	264	264	283	268	268	297	272	272	264	268
PEZ13	221	222	221	233	221	217	217	221	225	225	173	221

PEZ16	304	304	304	304	296	284	284	300	304	304	288	292
PEZ17	207	211	207	211	199	207	207	215	211	215	203	207
FH2010	228	228	228	228	232	228	228	232	228	236	228	228
FH2054	164	164	164	164	150	155	155	167	147	167	147	167
FH2079	269	269	269	269	269	269	269	273	269	269	277	277

Table 10. 복제 푸들의 미토콘드리아 DNA 염기 서열 분석

	뉴클레오타이드 위치									
	15508	15526	15612	15639	15650	15710	15800	15912	15955	
참고문헌	C	C	T	T	T	C	T	C	C	
난자 공여견1	C	C	T	T	T	C	T	C	C	
난자 공여견2	T	T	C	G	C	T	C	T	T	
복제개	T	T	C	G	C	T	C	T	T	
핵공여 세포	C	T	T	G	T	C	C	T	T	
대리모	C	C	T	A	T	C	T	C	C	

마. 텔로미어 길이 분석

이번 연구에서 태어난 나이든 개의 체세포를 이용해 복제된 복제 푸들이 정상인지 알아보기 위해 텔로미어 길이를 측정 한 후 비교하였다. 평균 텔로미어 길이 (Fig 15)는 복제 푸들 (20.8 ± 0.4)과 체세포 공여개 (20.8 ± 0.6)와, 동일한 연령대의 정상 푸들(20.6 ± 0.4)과 큰 차이가 없었다. 복제 토이푸들이 나이든 개의 체세포를 통해서 복제되었지만, 어린 복제 토이푸들의 텔로미어 길이는 나이든 체세포 제공견 또는 같은 나이의 다른 대조군들과 큰 차이가 없었다. 이것은 텔로미어 길이의 나이에 따른 변화가 개에서 종 특이성과 관련이 있기 때문인 것으로 생각된다. 즉, 개는 전체 품종이 400 종이 넘고 이에 따라서 텔로미어 길이 변화도 품종에 따라서 다양할 것으로 생각된다.

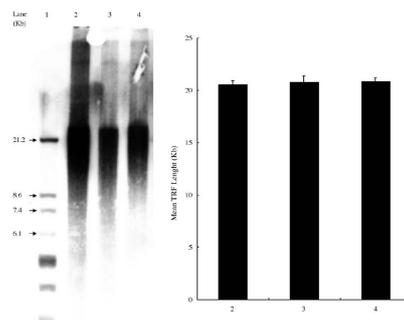


Fig 15. 텔로미어 길이 분석. Hinf I-Rsa를 처리하여 조각난 DNA를 0.8% agarose gel상에서 분리하고 terminal restriction fragment (TRF)의 평균 길이를 얻었다. Lane 1: marker; Lane 2: 동령의 토이푸들 (대조군), Lane 3: 체세포 공여견, Lane 4: 복제견

2. 유용견 복제 생산 및 실용화 가능성 연구

가. 서비스견 유래의 체세포의 핵이식을 통한 복제수정란의 생산 및 이식

마약 탐지견 유래의 체세포를 공여 체세포로 이용하여 핵을 제거한 체내 성숙된 난자의 위란강 공간에 주입하였다. 상기 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM HEPES 및 0.05% (w/v) BSA를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 전극을 사용하여 융합시킨다. 재구성된 개 수정란의 화학적 활성화는 39°C의 10 μM 칼슘 아이노포어 (calcium ionophore)를 포함하는 난관 액합성배지 (mSOF; 삼투압 및 pH는 각각 270 내지 280 mOsm 및 7.2 내지 7.3. 임)에서 배양함으로써 복제수정란의 활성화를 유도한다. 그 후, 복제된 수정란을 세척한 후 1.9 mM 6-디메틸아미노푸린 (dimethylaminopurine)이 보충된 mSOF 내에서 4시간 동안 추가로 배양한다. 재구성 후 4시간 이내에, 체세포 복제란을 대리모의 난관으로 수술적 방법을 이용해 이식한다. 체세포 복제란을 이식받는 대리모는 자연발정으로 동기화시킨다. 수술적 이식을 위하여, 케타민(ketamine)/자일라진(xylazine)을 혈관내 주입을 통해 마취를 유도하고, 2% 이소플루란 (isoflurane)으로 유지한다. 양아위 (dorsal recumbency)를 취하면서 대리모는 수술을 위해 무균적으로 준비하고, 배쪽 뒷부분을 절개하여 생식관을 노출시킨다. 복제수정란을 3.5F Tom cat catheter (Sherwood, St. Louis, MO)를 사용하여 난관 팽대부에 이식한다. 이식 후 22일에 7.0 MHz 막대형 프로브가 부착된 SONOACE 9900 (Medison Co. LTD, Seoul, Korea) 초음파 스캐너를 사용하여 임신여부를 진단한다.

나. 복제 마약탐지견의 생산

총 544개의 체내 성숙된 개 난자를 회수하여 체세포 핵이식 한 후, 400개의 배아를 18마리의 대리모에 이식하였다. 이 중 4마리의 대리모가 임신하였으나 1마리의 대리모는 각각 1마리씩의 산자와 사산태아를 분만하였다. 1마리의 산자는 생후 5일째에 폐사하였다. 다른 3마리의 대리모는 총 8마리의 산자와 1마리의 사산태아를 분만하였고, 8마리의 산자 중 1마리는 생후 6일 째에 폐사하였다. 위성 분석 결과 모든 복제견은 세포 공여견과 유전적으로 일치했다 (Table 11). 7마리의 복제견은 건강하게 자랐고 (Fig 16) 정상적인 핵형(78, XY)을 보였다. 이로써 유용견의 생산 가능성을 타진할 수 있었다.



Fig 16. 7마리의 복제 수컷 리트리버. (a) 1개월령, (b) 4개월령의 모습

Table 11. 9가지의 개 특이적인 위성마커를 이용하여 체세포 공여견, 복제견, 대리모의 위성을 분석한 결과

마커	PEZ 01	PEZ 03	PEZ 02	PEZ 06	PEZ 13	PEZ 17	FH 2079	FH 2054	FH 2010
핵공여 세포	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자1	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자2	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자3	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자5	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자6	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자7	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자8	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자9	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자10	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자11	106/122	118/140	127/131	179/179	221/233	207/215	150/154	269/277	228/232
복제산자1,2-대리모	114/114	114/124	123/127	183/191	173/225	199/207	142/150	273/277	232/236
복제산자3,5-대리모	118/118	124/130	127/127	167/187	173/173	207/211	160/160	269/273	232/232
복제산자6,7,8-대리모	114/126	120/140	123/123	171/191	229/229	211/211	150/150	273/273	224/236
복제산자 9,10,11-대리모	118/118	118/120	123/127	175/183	225/225	207/211	150/168	269/277	228/236

다. 복제 마약탐지견의 훈련 능력 및 탐지견 테스트

생산된 복제 견의 훈련 능력 및 탐지력 테스트를 통해 마약 탐지견으로 활용 가능성을 확인 및 선발하였고, 실제 현장에 배치되어 활용되고 있으며, 이를 통해 개복제 연구의 활용 범위를 더욱 넓혔다.

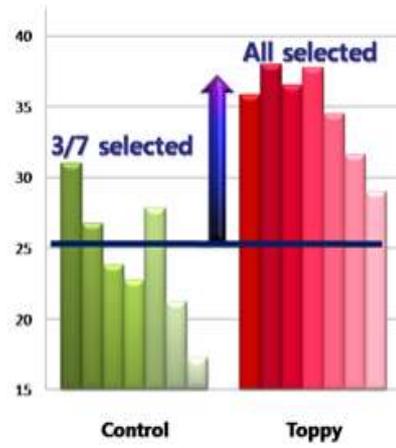


Fig 17. 마약 탐지견 훈련 테스트에서 복제견과 일반 대조군간의 합격률 비교
 * Control: 부모가 마약탐지견인 그룹, Topy: 우수 마약탐지견의 복제견 그룹

제 3 절. 체세포 복제개 생산 효율 향상을 통한 표준 프로토콜 제시

1. 개 복제를 위한 체세포 핵이식 표준 프로토콜 제시

가. 개의 체세포 핵이식 과정에 적합한 융합 조건 확립

(1) 페키니즈의 공여세포 확보 및 체세포 복제방법

공여 체세포로는 페키니즈의 피부조직을 분리한 다음 수득한 성체 섬유아세포를 사용하였다. 적절한 세포 배양용 배지에서 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기로 가습된 조건으로 3-4일간 배양하였다. 세포가 컨플루언시(confluency)가 될 때까지 배양한 후, 부착된 체세포는 트립신 처리하여 추가 계대를 위해 새로운 배양접시로 옮겨 4내지 6일 간격으로 계대 배양하였다. 체세포 핵 이식을 위하여 3 내지 8 계대의 세포들을 사용하였다. 난자 공여자로는 1-5년 령의 잡종 암캐를 사용하였다. 자연적으로 발정기가 시작된 개를 대상으로 질세포 도말검사(vaginal smear)와 혈청 프로그스테론의 농도를 매일 측정하여 질 상피세포의 각화도가 80% 이상이면서 프로그스테론 농도가 4.0-7.5 ng/ml이 되면 배란일로 간주하고, 배란일로부터 72시간 후에 수술을 실시하여 난자를 회수하였다. 난자 회수를 위해 6mg/ml 케타민과 1mg/kg 자일라진의 혼합체를 정맥 주사하여 전마취를 유도하고, 2% isoflurane으로 호흡 마취 유지된 개에서 개복 수술을 실시하였다. 개복 후 난소를 노출시키고, 난소의 생식열구(bursal slit)를 통하여 난관의 술 모양의 말단에 접근한 후 앞부분이 둥글게 처리된 니들을 삽관하였고, 자궁-난관접합부의 정맥 내 카테터를 삽입한 다음 장착한 카테터를 통해 조직배양 배지를 관류시켜 난자가 흘러나오게 하였다. 수득 난자는 난구세포를 제거한 후, 형광 도립 현미경을 사용하여 제 1 극체가 확인된 난자만을 선별하여 미세 조작 장치를 이용하여 탈핵을 수행하였다. 이후 탈핵된 개 난자에 페키니즈로부터 수득한 공여 핵 세포를 미세주입하였다. 공여 핵 세포-난자 결합체를 융합배지에 넣고 전기-세포 융합장치 (Nepagene, Japan)의 전기적 자극을 이용 융합 시킨 다음, 화학적인 방법으로 핵 이식란의 활성화를 유도하였다. 이후 핵 이식란을 배란 후 약 72시간된 자연적으로 발정된 잡종 암컷 개의 난관에 외과적 수술방법을 사용하여 이식하였다. 이식은 외과적으로 난소를 노출시킨 다음, 난관의 개구부를 통해 1 ml 주사기가 장착된 카테터를 난관 내로 넣어 핵 이식란을 주입하였다.

(2) 융합조건

융합 기계가 융합 효율과 배아의 체내 발달에 미치는 영향을 평가하기 위하여 주사침 융합 방법과 융합접시 방법을 비교하였다 (Fig 18). 주사침 융합 방

법에서는 하나의 세포-난자 복합체가 직선으로 배열된 두 개의 철판 사이에서 샌드위치 된다. 세포질과 핵 공여 세포간의 접촉하는 표면을 두 개의 주사침 같은 전극으로 미세조정할 수 있고, Electro-Cell Fusion apparatus (Nepagene, Chiba, Japan)로 전기 자극을 준다. 전극 사이의 간격은 약 180 μm 이다. 융합 접시 방법에서는 세포-난자 복합체가 두 개의 스테인리스 강철 철판 전극(3.2 mm 간격) 사이에 위치하고, BTX Electro-Cell Manipulator 2001 (BTX instruments, San Diego, CA, USA)로 전기 자극을 준다. 마찬가지로, 전기 자극 강도가 융합 효율에 미치는 영향을 살펴보기 위해 고전압(3.8-4.0 kV/cm)과 저전압(3.3 kV/cm)이 사용되었다. 즉, 융합기계와 전압의 효과를 알아보기 위하여 실험군을 1) N-H; 주사침 방법을 사용하여 전압 3.8-4.0 kV/cm, 전류 2 DC pulse, 15초간 융합, 2) N-L; 주사침 방법을 사용하여 전압 1.7-1.9 kV/cm, 전류 2 DC pulse, 15초간 융합, 3) C-H; 융합접시 방법을 사용하여 전압 3.3 kV/cm, 전류 2 DC pulse, 15초간 융합 (3.8-4.0 kV/cm를 사용하였을 때, 세포질이 퇴화되어 3.3 kV/cm를 사용하였음) 4) C-L; 융합접시 방법을 사용하여 전압 1.75 kV/cm, 전류 2 DC pulse, 15초간 융합 으로 나누어 실시하였다.

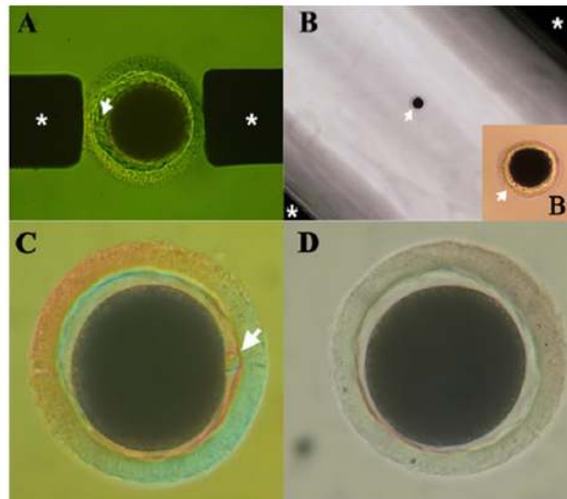


Fig 18. 탈핵한 난자와 주입한 개 섬유아세포의 전기융합. (흰색화살표; 주입한 개 섬유아세포) (A) 주사침 융합 방법 (x200). 세포-난자 복합체가 직선으로 배열된 두 개의 철판모양 전극(별표) 사이에서 위치된다. (B) 융합접시 방법 (x40) (C) 난황주위강에 넣어준 하나의 섬유아세포 (x200) (D) 핵공여 세포와 세포질의 성공적인 융합 모습 (x200)

(4) 개 체세포 핵이식 기법에서 최적의 융합조건 확립

서로 다른 융합조건에서의 융합결과는 Table 12에 제시되어 있다. N-H 그룹에서 79개의 재구성된 배아 중 66개가 성공적으로 융합되었고 (83.5%), N-L 그룹에서는 59개의 재구성된 배아 중 39개가 융합되었다 (66.1%). C-H 그룹에

서는 132개의 재구성된 배아 중 89개가 융합되었고 (67.4%), C-L 그룹에서는 132개의 재구성된 배아 중 50개가 융합되었다 (37.9%). C-L 그룹에서의 융합 비율은 다른 세 그룹에서보다 유의적으로 낮았다. 다른 융합 조건이 개 체세포 핵이식에서 임신률에 미치는 영향은 Table 2에 제시되어 있다. 이식 후에, N-H, N-L, C-H 그룹에서는 각각 한 마리씩 임신이 되었고 (33.3, 33.3, 20%), C-L 그룹에서는 임신이 되지 않았다. 그러나, N-L, C-H 그룹에서는 산자까지 생산되지 않았다. N-H 그룹에서만 임신이 끝까지 유지되었고 건강한 산자가 생산되었다.

Table 12. 다른 융합 조건과 장치를 사용하였을 때의 배아 융합 효율

그룹	난자공여견 수	난자 수			융합률(%) [*]
		회수	주입	융합	
N-H	9	81	79	66	83.5 ^a
N-L	8	63	59	39	66.1 ^b
C-H	13	134	132	89	67.4 ^c
C-L	12	136	132	50	37.9 ^d

N-H; 주사침 방법을 사용하여 전압 3.8-4.0 kV/cm, 전류 2 DC pulse, 15초간 융합

N-L; 주사침 방법을 사용하여 전압 1.7-1.9 kV/cm, 전류 2 DC pulse, 15초간 융합

C-H; 융합접시 방법을 사용하여 전압 3.3 kV/cm, 전류 2 DC pulse, 15초간 융합

C-L; 융합접시 방법을 사용하여 전압 1.75 kV/cm, 전류 2 DC pulse, 15초간 융합

* 백분율은 섬유아세포를 주입한 난자수로부터 계산되었다.

^{a-c} 서로 다른 문자는 p값이 0.05 이하로 서로 다르다는 것을 의미한다.

(3) 복제란 이식에 의한 복제 페키니즈의 생산

대리모에 핵 이식란을 이식한 후 23일째에 초음파 검사 장비를 이용하여 임신 여부를 검사하였다. 초기에 임신을 확인한 후 2주마다 초음파로 임신 상태를 모니터링 하였고 분만 예정일 일주일 전에 X-ray를 촬영하여 정확한 임신 두수를 확인하였다. 페키니즈 체세포 유래 복제란은 3마리의 대리모에게 이식 실험을 진행하여 1마리의 대리모에서 임신 성공 결과를 얻었으며, 대리모 A에게서 1마리의 건강한 복제 산자를 제왕절개를 통해 생산하였다 (Fig 19). 복제 산자는 체세포 공여견과 유사한 표현형을 나타내었고 (Fig 19), 계통분석을 통해 복제산자와 체세포 공여견이 유전적으로 동일함을 입증하였다.



Fig 19. 페키니즈 제왕절개 사진(A-D)과 생후 2일령의 페키니즈(E-F)

나. 공여 세포에서의 세포 주기 동기화 방법 확립 I

- 접촉 억제, 혈청 기아, DMSO, cycloheximide, roscovitine 처리 비교

(1) 성견 유래 섬유아세포주의 확립

개의 귀 부위 털을 제거한 후 일반적 외과수술에 준해 알콜스폰지와 베타딘으로 소독한 후 멸균 punch로 귀조직을 떼어내어 실험실로 가져온다. 잘게 조각낸 조직을 100 mm 플라스틱 배양 접시 (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ)에 침지한다. 침지된 세포들은 계속하여 10% (v/v) FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 mM 글루타민 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 25 mM NaHCO₃ 및 1% (v/v) minimal essential medium (MEM) nonessential amino acid solution (Invitrogen, Carlsbad, CA)가 보충된 DMEM에서, 39°C 온도, 5% CO₂ 및 95% 공기로 가습된 조건으로 6 내지 10일 간 배양한다. 부착되지 아니한 세포 또는 외식편 덩어리를 제거한 후, 부착된 세포들을 컨플루언시 (confluency)까지 계속하여 배양한다. 이들 세포들을 3 내지 5일 간격으로 0.1% 트립신/ 0.02% EDTA을 사용하여 3분 간 트립신 처리하고 추가 계대를 위해 2개의 새로운 배양접시로 적정농도로 배분하여 계대 배양하고, 나머지 세포는 동결 배지를 사용하여 196°C의 액체 질소 내에서 동결 저장한다. 상기 동결 배지는 10% (v/v) DMSO 및 90% (v/v) FBS로 이루어진다.

(2) 개 유래 성체 지방유래 줄기 세포주의 확립 및 특성 분석

3세령 로트와일러에서 지방 조직의 일부를 채취하였다. 지방 조직의 채취를 위하여 6 mg/kg 프로포폴 (propofol)으로 마취를 유도하고, 2% 이소플루란

(isoflurane)으로 유지 하였으며 양아위 (dorsal recumbency)를 취하면서 수술을 위해 무균적으로 준비 하여 서혜부위에서 피하 지방 조직을 분리하였다. 분리해낸 지방조직으로부터 배양된 지방 유래줄기세포는 섬유아세포와 유사한 형태로 배양접시에 부착되어 자랐으며 배양 배지로는 5% FBS를 포함한 RKCM(RNL Bio Ltd, Seoul, Korea) 배지를 사용하였다. 실험을 위해서는 2계대에서 5계대의 지방유래 줄기세포를 각 실험에 사용하였다. 분리해낸 지방유래 줄기세포를 확인하기 위해 세포 표면의 마커를 확인하였다. 트립신을 처리한 지방유래 줄기세포를 인산 완충 식염수(5% FBS)를 이용하여 세포를 부유시켰다. 세포를 100ul당 20만개의 농도로 처리한 다음 CD29 (BD Biosciences, San Jose, CA), CD44 (Serotec, Oxford, UK), Thy1.1 항체 (Serotec), CD31 (BD Biosciences), CD105 (BD Biosciences), CD34 (Serotec)의 특이 항체로 염색 후 Cell Quest software를 이용하여 FACS를 이용하여 세포 표지 인자의 발현 여부를 확인 하였다.

(3) 세포 주기 동기화를 위한 처리 방법

동결 보관되어 있는 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 녹인 뒤 70% confluency가 될 때까지 배양하였다. 이후 1) 접촉 억제(contact inhibition)가 개의 섬유모세포(fibroblast)의 세포 주기에 미치는 영향을 분석하기 위해서 100% confluency로 키운 세포, 2) 혈청 기아가 개의 섬유모세포의 세포 주기에 미치는 영향을 분석하기 위해서 0.5% FBS가 첨가된 DMEM 배지로 24 시간, 48 시간, 72 시간 배양한 세포, 3) DMSO가 개의 섬유모세포의 세포 주기에 미치는 영향을 분석하기 위해서 0.5% DMSO가 첨가된 DMEM 배지로 24 시간, 48 시간, 72 시간 배양한 세포, 4) Cycloheximide (CHX)가 개의 섬유모세포의 세포 주기에 미치는 영향을 분석하기 위해서 10 μ g/ml의 CHX가 첨가된 DMEM 배지로 24 시간, 48 시간, 72 시간 배양한 세포, 5) Roscovitine이 개의 섬유모세포의 세포 주기에 미치는 영향을 분석하기 위해서 15 μ M의 roscovitine가 첨가된 DMEM 배지로 24 시간, 48 시간, 72 시간 배양한 세포를 이용하여 세포 주기 분석을 실시하였다.

(4) 세포 주기 분석 방법

배양 후 트립신을 처리하여 회수된 세포들은 PBS에서 재 부유시킨 뒤, 4 $^{\circ}$ C, 1200rpm에서 5분 동안 원심분리 시켰다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 부드럽게 세포를 재부유시키고 70% ethanol에 고정시키고 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 분석을 위해서 차가운 PBS를 넣고 원심분리 시킨 뒤, 10 mg/ml RNase를 5 μ l 함유한 0.25 ml PBS를 넣어서 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 한 시간 동안 정치시키고, 세포를 염색하기 위해서 1 mg/ml propidium iodide을 10 μ l 첨가하였다. 세포주기 분석에는 flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson)를 사용하였다. 각각의

샘플에 대해서 10000 events가 사용되었고, red fluorescence와 counts의 histogram으로 각각의 세포주기에 있는 세포의 비율을 평가하였다. 세포의 비율을 알기 위해 WinMDI software (Version 2.5, Joseph Trotter)를 이용하였다. 죽은 세포는 histogram에서 sub-G0/G1 peak로 결정되었고, G0/G1, S 단계와 G2/M 단계를 Excel software (2007 version, Microsoft)을 사용하여 분석하였다. 모든 실험은 세 번씩 반복하였고, 대조군은 모든 실험에서 같은 데이터를 사용하였다.

(5) 세포주기 분석 결과

(가) 접촉억제가 세포주기 동기화에 미치는 영향

접촉 억제(contact inhibition)가 개의 섬유모세포(fibroblast)의 세포 주기에 미치는 영향을 분석하기 위해서 100% confluency로 키운 세포에서 G0/G1, S 단계와 G2/M 단계는 70.1, 8.1, 21.8%로 나타났다. G0/G1의 단계에 있는 세포는 주기성의 세포에 비해 0시간에서 48시간동안 접촉억제가 된 개의 섬유아세포에서 유의하게 증가하였다. 하지만 배양 시간의 증가가 세포 주기의 동기화를 더 높은 비율로 향상시키지는 않았다. 죽은 세포는 대조군과 비교하였을 때 접촉 억제 그룹에서 유의하게 높게 나타났다.

Table 13. 개의 귀 섬유아세포의 세포주기에 접촉억제의 영향

Duration (h)	Dead cells (sub-G, %)	Cell cycle phase (gated, %)		
		G0/G1	S	G2/M
Cycling cells	3.1±0.4 ^a	70.1±0.8 ^a	8.1±0.4	21.8±1.1 ^a
0	6.0±0.5 ^b	77.1±0.0 ^b	6.9±0.4	16.0±0.4 ^b
24	6.8±0.1 ^b	81.9±0.3 ^b	5.9±0.0	12.2±0.3 ^c
48	5.3±0.5 ^b	76.4±2.5 ^b	9.1±0.6	14.5±0.9 ^b

^{a-c} 같은 열 내에서 다른 위첨자는 유의한 차이가 있음을 의미함 (P<0.05)

(나) 혈청기아가 세포주기 동기화에 미치는 영향

24시간 혈청 기아를 유지한 후에 G0/G1 단계의 세포가 유의하게 대조군에 비해 증가하였다(24시간 처리군; 77.1%, 대조군; 70.1%). 24시간 이후 배양 시간을 증가할수록 세포주기 동기화의 비율이 점차적으로 상승하였고 72시간에는 유의한 차이를 보였다. 하지만 죽은 세포의 비율 또한 24시간의 혈청 기아 이후로 유의하게 증가하였다.

Table 14. 개의 귀 섬유아세포의 세포주기에 대한 혈청 기아의 영향

Duration (h)	Dead cells (sub-G, %)	Cell cycle phase (gated, %)		
		G0/G1	S	G2/M
Cycling cells	3.1±0.4 ^a	70.1±0.8 ^a	8.1±0.4 ^a	21.8±1.1 ^a
24	7.7±0.0 ^b	77.1±0.3 ^b	4.5±0.0 ^b	18.3±0.3 ^b
48	9.5±0.5 ^b	77.9±0.4 ^b	6.1±0.1 ^c	16.0±0.3 ^{a,b}
72	18.3±0.9 ^c	76.4±2.5 ^c	3.4±0.1 ^d	13.8±1.3 ^{b,c}

^{a-d} 같은 열 내에서 다른 위첨자는 유의한 차이가 있음을 의미함 (P<0.05)

(다) DMSO가 세포주기 동기화에 미치는 영향

24시간의 DMSO의 처리 그룹(67.6%)에서 G0/G1 단계의 세포는 대조군(70.1%)에 비해 유의하게 감소하였다. 하지만 48시간 DMSO를 처리한 그룹에서의 G0/G1 단계의 세포 비율이 대조군과 비슷하였고 72시간 처리한 그룹(76.1%)에서는 대조군에 비해 유의하게 높았다. 죽은 세포의 비율은 대조군에 비해 각 시간대별로 DMSO를 처리한 모든 그룹에서 대조군(3.1%)에 비해 높았다.

Table 15. 개의 귀 섬유아세포의 세포주기에 DMSO 의 영향

Duration (h)	Dead cells (sub-G, %)	Cell cycle phase (gated, %)		
		G0/G1	S	G2/M
Cycling cells	3.1±0.4 ^a	70.1±0.8 ^a	8.1±0.4 ^{a,b}	21.8±1.1 ^{a,b}
24	7.2±0.4 ^b	67.6±0.1 ^b	8.0±0.3 ^{a,b}	24.4±0.4 ^a
48	3.9±0.0 ^{a,c}	70.5±0.1 ^{a,d}	9.4±0.3 ^a	20.1±0.2 ^b
72	4.6±0.2 ^c	76.1±0.4 ^d	7.7±0.2 ^b	16.2±0.6 ^b

^{a-d} 같은 열 내에서 다른 위첨자는 유의한 차이가 있음을 의미함 (P<0.05)

(라) Cycloheximide가 세포주기 동기화에 미치는 영향

CHX를 24시간 처리한 그룹과 대조군에서는 세포주기 동기화에 있어서 유의한 차이가 없었다. 하지만 48시간 처리하였을 때 G0/G1단계로 유의하게 세포주기 동기화를 유도하였다. 72시간 CHX를 처리한 그룹에서는 G0/G1단계로 높은 비율로 유도하지는 않았다. 하지만 죽은 세포의 비율이 유의하게 증가하였다.

Table 16. 개의 귀 섬유아세포의 세포주기에 Cycloheximide 의 영향

Duration (h)	Dead cells (sub-G, %)	Cell cycle phase (gated, %)		
		G0/G1	S	G2/M
Cycling cells	3.1±0.4 ^a	70.1±0.8 ^a	8.1±0.4 ^{a,b}	21.8±1.1
24	3.1±0.1 ^a	68.7±0.6 ^a	8.2±0.1 ^a	23.1±0.2
48	6.3±0.8 ^a	73.0±0.1 ^b	4.6±0.2 ^b	22.3±0.3
72	13.8±2.7 ^b	74.2±0.0 ^b	4.2±0.3 ^b	21.7±0.3

^{a-b} 같은 열 내에서 다른 위첨자는 유의한 차이가 있음을 의미함 (P<0.05)

(마) Roscovitine이 세포주기 동기화에 미치는 영향

24시간 배양 후, G0/G1 단계와 G2/M 단계의 세포는 대조군에 비해 유의하게 낮았으나 S phase의 세포 비율은 유의하게 증가하였다. 하지만 48시간동안 roscovitine을 처리한 그룹에서 G0/G1 단계로의 세포주기의 동기화가 나타났고 72시간으로 증가하였을 경우에 세포주기의 동기화가 더 높은 비율로 나타났다. 죽은 세포의 비율은 대조군 그룹의 값이 24시간 Roscovitine을 처리한 그룹과 다르지 않았으나 48시간 처리한 그룹과는 차이가 있었다.

Table 17. 개의 귀 섬유아세포의 세포주기에 roscovitine 의 영향

Duration (h)	Dead cells (sub-G, %)	Cell cycle phase (gated, %)		
		G0/G1	S	G2/M
Cycling cells	3.1±0.4 ^a	70.1±0.8 ^a	8.1±0.4 ^a	21.8±1.1 ^a
24	2.4±0.2 ^{a,b}	64.0±0.3 ^b	21.6±1.3 ^b	14.1±1.4 ^b
48	1.5±0.1 ^b	72.5±0.6 ^c	18.2±0.5 ^c	9.3±1.1 ^c
72	2.5±0.3 ^{a,b}	78.2±0.2 ^d	14.7±0.4 ^d	7.2±0.2 ^c

^{a-d} 같은 열 내에서 다른 위첨자는 유의한 차이가 있음을 의미함 (P<0.05)

다. 공여 세포에서의 세포 주기 동기화 방법 확립 II

- Roscovitine 처리

(1) 공여 세포주 확립

7년령의 래브라도 리트리버의 귀 피부조직으로부터 섬유아세포를 분리하였다. 피부조직을 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS)으로 세 번 washing하고 잘게 잘라 10% 우태아혈청 (Fetal Bovine Serum, FBS)과 1 mM glutamine, 25 mM NaHCO₃, 1% minimal essential medium(MEM) nonessential amino acid solution 이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양하였다. 배양 환경으로 39.8°C, 5% CO₂ and 95% air의 습윤 인큐베이터를 사용하였다. 7-10일 간 배양한 후, 조직으로부터 뺀어 나온 섬유아세포를 분리하였다. 이 세포들을 계대배양하고 10% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣어 액체질소에 동결 보존하였다. 2-6계대의 세포가 SCNT의 핵공여세포로 사용되었다.

(2) Roscovitine 처리군 설정

하루동안 배양된 섬유아세포를 1) 하루 배양한 섬유아세포 회수(cycling), 2) 3일 더 배양하여 100% confluency에 도달(confluent), 3) 배양배지를 15 mg/mL roscovitine이 함유된 DMEM으로 바꾸어 24시간 처리(roscovitine)의 세 그룹으로 나누었다. 각 그룹의 세포주기 단계와 세포사멸 비율은 flow cytometry를 통해 평가되었다.

(3) 세포주기 분석

0.25% trypsin ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)를 배양된 세포에 처리하여 세포를 배양접시로부터 회수하고 PBS로 washing하였다. 원심분리를 통해 세포피를 얻어 상층액을 제거한 후, PBS로 부유시켜 0.2ml를 추출, 여기에 0.7ml의 차가운 70% 에탄올을 첨가하였다. 이것을 부드럽게 섞어주고 4°C에서 하룻밤 동안 배양한 다음 PBS로 washing하고 차가운 PBS를 넣어 원심분리하였다. 가라앉은 세포를 10mg/ml RNase 5μl를 첨가한 0.25ml PBS에 재부유시켜 37.8°C에서 1시간 배양 후 1mg/ml propidium iodide (PI) 10μl를 첨가하여

염색하였다. 그리고 나서 flow cytometer를 이용하여 세포를 분석하였다. 세포 주기의 다양한 단계를 G0/G1, S, G2+M 으로 나누어 측정하였다. confluent, roscovitine 그룹에서 G0/G1 단계에 머물러 있는 세포의 비율이 control 그룹에 비해 유의하게 증가하였다(82.74%, 79.32% vs. 68.56%) (Table 18). 그러나 confluent와 roscovitine 그룹 간에는 차이가 없었다. control 그룹에서 S 단계에 머물러 있는 세포 비율은 confluent, roscovitine 그룹보다 유의하게 높았다(15.19% vs. 2.84% , 3.01%) (Table 18). 이 역시 confluent와 roscovitine 그룹 간에는 차이가 없었다($P > 0.05$). G2/M 단계의 세포 비율은 세 그룹간에 유의한 차이가 없었다(Table 18).

Table 18. confluent와 roscovitine 처리 그룹의 세포주기 동기화

처리	세포 주기 백분율, % (평균 ± 표준오차)		
	G0/G1	S	G2/M
대조군 (cycling)	68.56 ± 1.71 ^a	15.19 ± 1.56 ^a	16.23 ± 1.43 ^a
Confluent	82.74 ± 1.05 ^b	2.84 ± 0.96 ^b	14.41 ± 0.87 ^a
Roscovitine	79.32 ± 1.71 ^c	3.01 ± 1.57 ^b	17.67±1.42 ^a

^{a-c} 같은 열 내에서 다른 위첨자는 유의한 차이가 있음을 의미함 ($P < 0.05$)

(4) 세포사멸 분석

Vybrant Apoptosis Assay Kit를 이용해 세포 사멸과 괴사 빈도를 평가하였다. 각 그룹의 세포를 PBS로 washing 한 후 원심분리하여 상층액을 버리고 회수된 세포괴를 100 μ l의 1X annexin-binding buffer에 1x10⁶ cells/ml 농도로 희석하고 5 μ l FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated annexin V와 5 μ l PI를 첨가하여 20 $^{\circ}$ C, 어두운 곳에서 15분간 배양하였다. 그 다음 400 μ l의 1X annexin-binding buffer를 tube에 넣고 annexin V로 염색된 세포를 flow cytometry로 분석하였다. 세포들은 형광이 거의 발현되지 않는 살아있는 세포, 녹색 형광이 나타나는 사멸된 세포, 붉은색, 녹색 형광이 모두 나타나는 괴사된 세포의 세 그룹으로 구분되었다. confluent와 roscovitine 그룹 간에 세포사멸과 생존 비율을 측정하여 Table 19와 같이 정리하였다. confluent와 roscovitine 그룹에서는 생존율(96.65% vs. 96.84%, $P > 0.05$)과 세포 사멸 비율(0.82% vs. 0.90%, $P > 0.05$)에 차이가 없었다. 결론적으로 개의 섬유아세포의 세포주기 동기화 프로토콜에 상관없이 세포사멸 비율은 유사하였다.

Table 19. confluent와 roscovitine 그룹의 섬유아세포의 사멸과 생존 비율

처리	세포 백분율, % (평균 ± 표준오차)		
	생존	괴사	사멸
Confluent	96.65 ± 0.81	2.51 ± 0.75	0.82 ± 0.16
Roscovitine	96.84 ± 0.80	2.25 ± 0.75	0.90 ± 0.13

(5) 난자에 주입된 공여세포의 핵 리모델링 평가

체세포 핵이식 과정을 거친 후에, 체세포 핵이식 배아는 체외 배양 배지 (mSOF) 에서 배양되었다. 난자내로 주입된 공여세포의 핵 리모델링을 관찰하기 위해 confluent 또는 roscovitine 그룹의 세포를 주입한 난자를 각각 회수하여 두 가지 시점(융합 후 1시간 쯤(1 hpf), 활성화 직전)에 intact nucleus(IN)와 premature chromosome condensation (PCC)을 평가하였다. 리모델링의 진행을 관찰하기 위하여 활성화 후 4시간 쯤(4 hpa)에도 SCNT 배아를 평가하였다. 각각의 배아를 2% paraformaldehyde에 고정하고 glass slide에 올려 a glycerol-based Hoechst 33342(5 μ g/ml)로 염색하였다. 염색된 핵은 형광현미경 하에서 평가되었다. 각 그룹의 세포를 탈핵 난자와 융합시킨 결과, 1 hpf와 4 hpa에서 핵의 리모델링 과정동안의 모양변화를 볼 수 있었다(Table 20, Fig 20). 1 hpf에서는 대부분의 confluent 세포의 핵이 크기변화도 없었고, 핵막도 영향을 받지 않은 채로 남아있었던 반면 (88.8%; Fig 1c), roscovitine 그룹의 세포는 32.3%만이 intact nucleus로 남아있었다. premature chromosome condensation (PCC)을 나타낸 핵의 비율은 roscovitine 그룹에서 confluent 그룹보다 더 높았다(67.6% vs. 11.1%, $P < 0.05$). 핵의 팽창(enlargement)(Fig 20e)과 팽윤(swelling)(Fig 20f)은 4 hpa에서 관찰되었고, 특히 roscovitine 그룹의 세포를 이용한 배아에서 confluent 그룹의 세포에 비해 팽윤이 더 많이 일어나는 것을 확인할 수 있었다 (73.6% vs. 36.6%).

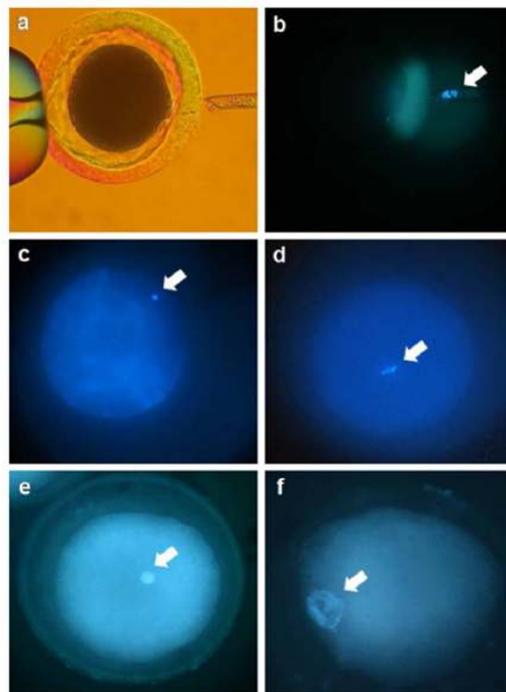


Fig 20. 탈핵난자에 주입된 개의 섬유아세포에서의 핵 리모델링. Hoechst 33342로 염색한 후 형광현미경 하에서 관찰하였다. 화살표는 다음을 가리킨다. (a) 탈핵된

개의 난자, (b) 핵 염색을 통해 탈핵 확인, (c) 주입된 섬유아세포의 intact nucleus, (d) 1hpf에서의 premature chromosome condensation (PCC), (e) 핵의 팽창, (f) 4hpa에서의 핵의 팽윤

Table 20. 탈핵된 난자에 주입된 confluent 또는 roscovitine 그룹의 섬유아세포의 핵 리모델링

시간 (hpf/hpa)	처리	체내 난자 수	재구성된 난자 수	아래처럼 재구성된 난자 수			
				IN (%)	PCC (%)	NE (%)	NS (%)
1 hpf	Confluent	32	27	24(88.8±7.9) ^a	3(11.1±7.9) ^a	0	0
	Roscovitine	39	34	11(32.3±7.0) ^b	23(67.6±7.0) ^b	0	0
4 hpa	Confluent	36	30	0	2(6.6±3.7)	17(56.6±8.4) ^a	11(36.6±8.5) ^b
	Roscovitine	45	38	0	1(2.6±3.3)	9(23.6±7.5) ^b	28(73.6±7.5) ^b

(6) Roscovitine 처리에 따른 임신효율 분석

공여 체세포를 confluent, roscovitine 처리의 두 그룹으로 나누어 G0/G1 단계로 세포 주기를 동기화시킨 뒤 체세포 핵이식을 실시하고 복제배아를 대리모에 이식하였다. 총 51마리의 개로부터 544개의 난자를 회수하여 이 중 400개의 난자를 이용하여 배아를 생산하였다. 이것을 18마리의 대리모의 난관에 이식하여 roscovitine 그룹의 세포를 이용한 배아는 9마리의 대리모 중 3마리 (33.3%)가 임신된 반면, confluent 그룹의 세포를 이용하여 생산한 배아는 9마리의 대리모 중 오직 1마리 (11.1%)만 임신되었음을 확인하였다 (Table 21).

Table 21. confluent와 roscovitine 처리 그룹의 섬유아세포를 이용한 체세포 핵이식 후 개 복제 배아의 생체 내 발달

처리	회수 난자 수	이식 배아 수	대리모 수	임신 대리모 수 (임신대리모수/총대리모수)	산자 수 (산자 수/이식 배아 수)
Confluent	244	181	9	1 (11.1%) ^a	2 (1.1%) ^a
Roscovitine	300	219	9	3 (33.3%) ^b	9 (4.1%) ^b

라. 개 복제의 현 상황과 적용에 대한 고찰

그동안 SCNT에 의한 개의 복제는 많은 기술적 어려움이 있어 느린 속도로 발전해왔다. 이러한 기술적 어려움을 극복하기 위해 다양한 요소에 대한 연구가 진행되었다. 첫 번째로, 개의 난자는 체외에서의 성숙율이 극도로 낮아 배란 후에 난관에서 성숙된 난자를 수술적으로 회수하는 방법을 개발하였고, 이렇게 얻은 성숙 난자를 체세포 복제 기술에 이용하였다. 두 번째로, 체세포 핵이식에 적합한 핵공여세포의 종류로는 미분화세포가 선호되는데, 이것을 이용한 체세포 복제 효율을 높이기 위해서 공여세포의 세포 주기 동기화 등의 조건에 대해서 연구하였다. 또한 형질전환된 공여세포를 이용하여 형질전환 개를 생산함으로써 형질전환 체세포 제작 조건을 확립할 수 있었다. 또한 탈핵난자와 난자 내로 주입된 체세포의 융합, 융합 후의 활성화 조건을 최적화하기 위한 연구를 진행하여 표준 프로토콜을 확립하였다.

(1) 개 복제의 현황

(가) 난자 성숙

체세포 핵이식이 성공하기 위해서는 난자 성숙부터 탈핵, 공여 체세포 주입, 융합, 활성화, 그리고 복제배아 이식과 복제 산자의 분만까지 모든 단계가 성공적으로 조화를 이루어야 한다. 체내 혹은 체외 성숙난자는 체세포 핵이식을 위한 필수 조건이다. 소 돼지등의 가축과 달리, 개에서 체외 성숙의 효율은 0-25%로 여전히 매우 낮다 (Hewitt et al, Theriogenology, 1998; Hewitt et al, Vet Rec, 1999, Hewitt et al, Anim Reprod Sci, 1999; Otoi et al, Reprod Fertil Dev, 1999; Saint-Dizeer et al, J Reprod Fertil Suppl, 2001; Songsasen et al, Mol Reprod Dev, 2002; Kim et al, Theriogenology, 2005; Oh et al, Zygote, 2005). 본 실험실에서도 체외 성숙의 효율을 20%까지 달성하여 보고한 적이 있는데, 발정주기에 따라 다양한 성숙 효율을 나타내었다 (Kim et al. Theriogenology, 2005; Oh et al., Zygote 2005). 이렇게 개에서는 체외 성숙 난자를 얻는 데는 한계가 있기 때문에 대안으로써 체내 성숙 난자를 회수하여 실험에 사용하고 있다. 다른 복제개들은 물론 세계 최초 복제개인 스니피 역시 체내 성숙 난자를 이용하여 생산되었다. 체내에서 회수하는 난자의 경우도, 아직 성숙단계에 있는 난자들만이 체세포 핵이식 기법을 통해 산자로 생산되었다 (Jang et al., Theriogenology 2007). 따라서 양질의 체내 성숙난자의 회수를 위해 배란 시점을 좀 더 정확하게 측정할 수 있다면 체세포 핵이식 기법을 통한 개 복제의 효율이 높일 수 있을 것이다.

(나) 핵공여 체세포

최초로 복제된 개와 고양이의 경우 각각 성체 섬유아세포와 난구세포를 핵공여 체세포로 사용하였다. 그러나 체세포 핵이식에 적합한 핵공여 체세포의 종류에 대해서는 아직까지 논란이 많다. 일반적으로는 분화가 이루어지지 않은 상태의 세포를 사용하는 것이 선호된다. 복제 효율을 높이기 위해서 혈청기아, 접촉억제, 화학적 억제제 등을 사용하여 핵공여 체세포 간의 세포주기 동기화 방법을 사용하기도 하며, 특히 화학적 억제제를 사용하여 개 복제에 성공한 보고가 있다 (Jang et al., Theriogenology 2007; 2008; Hong et al., Reprod Sci 2009). 최근에는 핵공여 체세포에 외래유전자를 도입하여 형질전환을 시킨 뒤, 형질전환된 세포주를 이용하여 형질전환 복제개 생산을 보고하였다.

(3) 융합 및 활성화 조건

탈핵된 난자와 주입된 체세포 간의 융합 시, 개는 다른 동물과 달리 높은 전압(3.3 kV/cm, BTX453 with a 3.2 mm gap electrode; BTX, San Diego, CA, USA)을 필요로 한다 (Jang, et al., Theriogenology, 2007). 그러나 이 조건은 기

계마다 다를 수 있다. 활성화는 전기자극이나 화학자극에 의해 이루어지는데, 본 실험실에서는 화학자극에 의한 활성화 방법을 이용하여 복제개를 생산하는 방법을 정립하였다.

(4) 체외 배양과 복제배아 이식

재구성된 난자의 활성화 후에, 복제배아는 착상전단계까지 며칠간 체외에서 배양되거나 대리모에 이식된다. 개의 경우에는 배아의 체외 배양 시스템이 구축되지 않았기 때문에 1세포기의 복제배아를 바로 대리모의 난관에 이식한다 (Lee et al, Nature, 2005; Jang et al., Theriogenology, 2007; Kim et al., Cloning Stem Cells 2007).

(5) 복제산자

애완견 복제 산자의 수는 아직까지는 매우 적다.

Table 22. 복제개 생산의 요약

복제개 (종)	핵공여 세포(나이)	분만	유산 혹은 신생견 사망
두 마리 수컷개 (아프간하운드)	성체 귀 섬유아세포 (3년령)	제왕절개	한 마리 신생견 사망
세 마리 암컷 개 (아프간하운드)	성체 귀 섬유아세포 (2개월령)	제왕절개	-
두 마리 암컷 늑대 (회색 늑대)	성체 귀 섬유아세포 (1년령)	제왕절개	-
소형견 (토이 푸들)	성체 귀 섬유아세포 (14년령)	제왕절개	한 마리 유산
세 마리 암컷 늑대 (회색 늑대)	사체유래의 성체 귀 섬유아세포 (3년령)	제왕절개	두 마리 사산, 한 마리 신생견 사망
두 마리 암컷 개 (비글)	태아 섬유아세포 (임신 후 28일령)	자연분만	-
네 마리 수컷 개 (비글)	성체 귀 섬유아세포 (1년령)	자연분만/제왕절개	한 마리 죽음
세 마리 수컷, 한 마리 암컷개 (골든 리트리버)	성체 귀 섬유아세포 (수컷:2년령, 암컷:6년령)	기록없음	한 마리 죽음
일곱 마리 수컷 개 (라브라도 리트리버)	성체 귀 섬유아세포 (7년령)	자연분만/제왕절개	세 마리 죽음, 한 마리 사산

(2) 개 복제의 적용

(가) 우수한 특수견 수 확보

우수한 유전정보를 가진 개들은 맹인안내견, 마약탐지견, 사냥견, 양치기견 등으로 활약한다. 본 실험실에서는 관세청 마약탐지견 중 뛰어난 능력을 가진 수컷 라보라도 리트리버를 복제하는데 성공하였다. 이 연구결과를 바탕으로 하여 체세포 핵이식 연구는 우수한 유전형질을 확보하고 넓히는데 기여할 수 있음을 확인하였다.

(나) 멸종위기동물의 보존

매년 국제 야생동물 보호기구 (International Union for Conservation of Nature, IUCN)에 의해 멸종위기에 처한 종들의 'Red List'가 업데이트 되는데, 그 중에 Red Wolf (*Canis rufus*)와 Ethiopian Wolf (*Canis simensis*)가 포함되어 있다. 본 실험실에서는 개 난자와 늑대에서 분리한 체세포를 이용하여 이종간 체세포 핵이식을 실시하여 암컷과 수컷 회색늑대 (*Canis lupus*)를 성공적으로 생산해내었다. 이로써 멸종위기에 처한 종 보존에 있어서 체세포 핵이식 기술이 사용될 수 있음을 보여주었다. 본 연구에서는 사체에서 분리, 확립한 체세포로 수컷 회색 늑대를 생산해내어 (Oh et al. *Theriogenology* 2008), 자연계에서 죽은 채 발견 되어도 그 사체를 종 보존에 사용할 수 있음이 증명되었다.

(다) 질환 모델 동물 연구

수의학 분야에서, 개는 가장 유용한 동물 모델중의 하나이며, 순종견의 경우 가족력과 병력 등이 자세히 기록되어 있어 다양한 질환 연구에 응용이 가능하다 (Patterson, *J Vet Intern Med* 2000). 또한, 개과 동물에서는 350가지가 넘

은 유전질환이 있고, 그 중 다수가 사람의 유전 질환과 유사함이 알려져 있어 사람의 질환 연구에도 유용하게 응용 가능성이 제시되어 왔다 (Ellegren, Nature, 2005; Patterson et al, J Vet Intern Med, 2000; Sargan, Mamm Genome, 2004). 이와 관련하여 본 연구실에서 세계 최초로 빨강형광복제개를 생산하여 질환관련 유전자가 도입된 개 모델 생산의 가능성을 확인 하였다.

2. 개 복제를 위한 난자공여견과 대리모의 선정 기준 제시

가. 난자공여견 및 대리모의 결정

총 304마리의 잡종견(1-7년령, 20-25kg)을 실험에 사용되었고, 모든 개들은 실내에서, 분리된 케이지 안에서 사육하였다. 실험견은 혈청 프로게스테론 농도에 따라 임의로 난자공여견이나 대리모로 선발되었다.

(1) 난자공여견의 결정

배란 시기는 매일 혹은 격일로 채혈하여 혈청 프로게스테론 농도를 측정하여 결정되었다. 약 2ml의 혈액을 채혈한 뒤, 1660g으로 10분간 원심을 돌려서 혈청을 얻었고, 혈청은 분석이 이루어질 때까지 -30도에서 보관하였다. 혈청 프로게스테론 농도는 DSL-3900 ACTIVE® Progesterone Coated-Tube Radioimmunoassay Kit (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX)를 사용하여 측정하였다. 배란은 혈청 프로게스테론 농도가 4-9 ng/ml에 도달하는 날로 결정하였다. 배란 후 약 70-76 시간 후에, 실험견은 난자 회수를 위한 실험에 사용하였다.

(2) 대리모의 결정

난자공여견과 동일한 방법으로 배란을 측정하였다. 난자공여견과 대리모 간의 배란 동기화는 이른 동기화(AA: 난자공여견이 대리모보다 하루 일찍 배란한 경우), 동기화 (SY: 난자공여견과 대리모가 같은 날 배란한 경우), 그리고 늦은 동기화 (RA: 난자공여견이 대리모보다 하루 늦게 배란한 경우)로 분류하였다.

나. 난자회수 및 체세포 핵이식 방법

(1) 난자회수 방법

체내 성숙난자는 난관에 관류액을 흘려 회수하였으며, 케타민과 자일라진으로 전마취를 하고, 아이소플루란으로 호흡마취를 유지하여 수술적인 방법을 통해 회수하였다. 개복 후 자궁을 견인하고 난관을 노출시킨 뒤, 관류용 주사침

으로 나팔관 쪽에서 난관을 확보하고 자궁 쪽에서 IV 카테터를 난관에 삽입하여 관류액을 흘려보낸 뒤 회수하였다.

(2) 체세포 핵이식 방법

관류액 속의 회수된 난자에서 난구세포를 제거한 뒤, 난자에서 핵과 극체를 제거하였다. 이어 체세포를 주입시키고 전기 자극으로 융합을 유도한 뒤에 체세포가 주입된 난자를 4시간 동안 활성화시킨 뒤에 대리모에 이식하였다.

다. 수술경력과 경산경력이 복제효율에 미치는 영향 연구

(1) 수술과 경산경력이 난자 회수율에 미치는 영향

수술경력은 피부에 남아 있는 개복흔적과 개복시 조직의 융합 정도로 판단하였고, 경산경력은 실험견 공급자에 의해 기록되었다. 수술하지 않은 그룹에는 한 번도 수술 경력이 없는 실험견이, 수술한 그룹에는 난자회수실험이나 대리모로써 한 번 사용된 경력이 있는 실험견이 분류되었다. 경산경력은 미경산과 경산으로 나누었다. 난자 회수율은 회수된 난자의 수를 황체의 수로 나누어 계산하였고, 수술경력이 없는 그룹에서 수술경력이 있는 그룹에 비해 유의적으로 더 높았다 (93.8 vs. 89.6%). 경산경력에서는 유의차가 없었다.

Table 23. 난자공여견에서 수술경력에 따른 난자 회수율

수술경력	난자 공여견 수	황체 수 (평균±표준오차)	회수 난자 수 (평균±표준오차)	회수율 (평균±표준오차)
수술한 그룹	127	1560 (11.9±0.3)	1394 (10.7±0.3)	89.6±1.4 ^a
수술하지 않은 그룹	118	1426 (12.5±0.3)	1341 (11.6±0.3)	93.8±1.4 ^b

^{a-b} 같은 열 내에서 다른 위첨자는 유의한 차이가 있음을 의미함 (P<0.05)

Table 24. 난자공여견에서 경산경력에 따른 난자 회수율

경산경력	난자 공여견 수	황체 수 (평균±표준오차)	회수 난자 수 (평균±표준오차)	회수율 (평균±표준오차)
미경산	77	891 (11.6±10.8)	830 (10.8±0.4)	93.2±1.9
경산	168	2092 (12.5±0.2)	1914 (11.4±0.3)	91.6±1.2

(2) 수술과 경산경력이 대리모에서 배아발달에 미치는 영향

임신률(임신한 실험견 수 대비 대리모 수)은 수술경력에 따른 차이가 없었으나, 출산률(산자 수 대비 이식한 복제배아 수)은 수술하지 않은 그룹에서 수술한 그룹에서보다 높았다(15.0 vs. 17.9%). 이와 유사하게, 경산경력에 따른 임신률은 차이가 없었으나 출산률은 경산 그룹에서보다 미경산 그룹에서 유의하게 더 높았다 (3.0 vs. 1.7%).

Table 25. 대리모에서 수술경력에 따른 임신률과 출산률

수술경력	대리모 수	이식한 복제배아 수 (평균±표준오차)	임신률 (평균±표준오차)	출산률 (평균±표준오차)
수술한 그룹	13	306 (23.5±3.1)	15.0±10.4	1.0±0.5 ^a
수술하지 않은 그룹	39	787 (19.9±1.3)	17.9±6.2	2.8±1.2 ^b

^{a-b} 같은 열 내에서 다른 위첨자는 유의한 차이가 있음을 의미함 (P<0.05)

Table 26. 대리모에서 경산경력에 따른 임신률과 출산률

경산경력	대리모 수	이식한 복제배아 수 (평균±표준오차)	임신률 (평균±표준오차)	출산률 (평균±표준오차)
미경산	16	299 (19.0±1.4)	25.0±11.2	3.0±1.5 ^a
경산	37	784 (21.2±1.6)	13.0±5.7	1.7±1.1 ^b

^{a-b} 같은 열 내에서 다른 위첨자는 유의한 차이가 있음을 의미함 (P<0.05)

라. 남자공여견과 대리모 간 배란 동기화가 복제효율에 미치는 영향 연구

남자공여견과 대리모 간의 배란 동기화가 임신률과 출산률에 미치는 영향에 대한 연구 결과가 아래 표에 제시되어 있다. 동기화 그룹(20.0%)이 이른 동기화(15.0%)나 늦은 동기화(0.0%) 그룹에 비해 높은 임신률을 보이지만 유의차는 나지 않았다. 출산률에 있어서도 마찬가지로의 결과를 얻었다 (SY, 3.0%; AA, 2.0%; RA, 0.0%).

Table 27. 남자공여견과 대리모 간의 배란 동기화가 임신률과 출산률에 미치는 영향

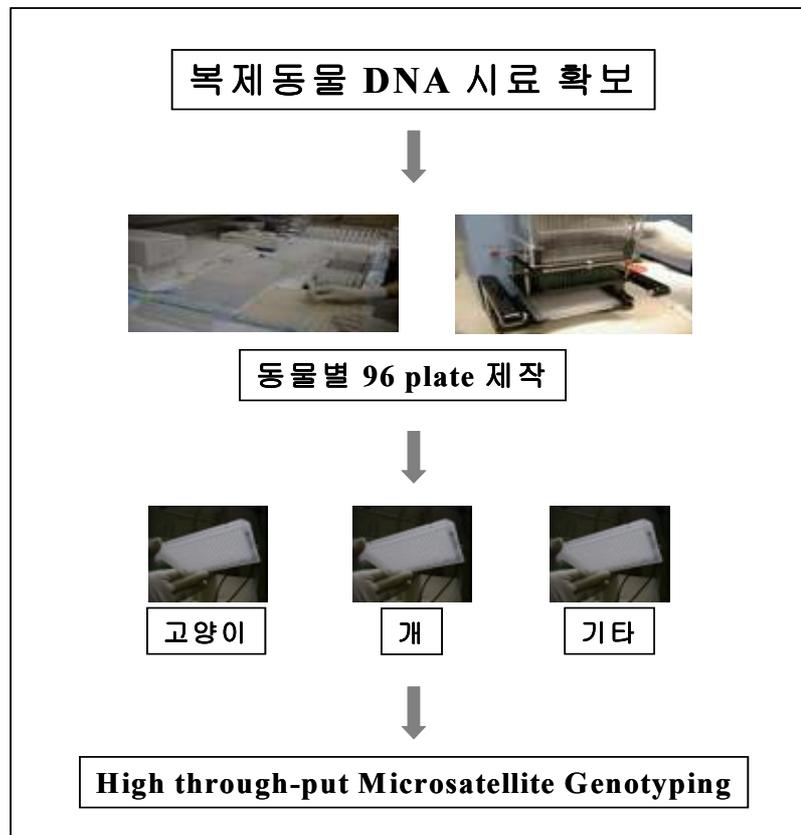
동기화*	대리모 수	이식 배아 수 (평균±표준오차)	임신률 (평균±표준오차)	분만률 (평균±표준오차)
AA	13	261 (20.0±3.3)	15.0±10.4	2.0±1.3
SY	35	707 (20.0±1.3)	20.0±6.6	3.0±1.2
RA	5	87 (17.0±4.3)	0.0±0.0	0.0±0.0

* AA(이른 동기화, advanced asynchrony); SY(동기화, synchrony); RA(늦은 동기화, retarded asynchrony.)

[제 4세부]

가. 이론적, 실험적 접근방법

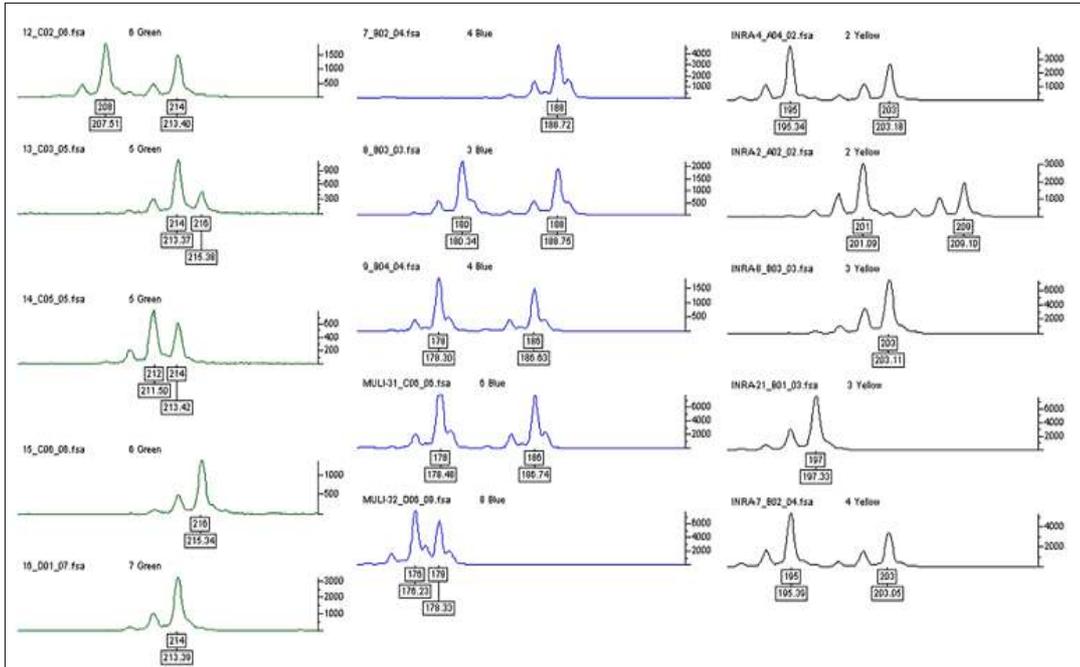
- (1) 기 발굴된 고양이 등의 유전적 표지자와 미토콘드리아 유전체 정보를 이용하여 복제 동물의 복제 확인 및 유전적 이상에 대한 연구
- (2) 선별된 유전적 표지자들을 screening하여 고양이 등의 복제여부 확인의 정확성과 신속성을 평가한 후 향후 연구과제에 직접 적용
- (가) 체세포 공여동물, 복제동물, 대리모의 DNA 시료를 확보하여 plate 제작 (그림1 참조)



<그림1> 복제 동물 DNA 시료 확보

- (나) 확보된 또는 추후 확보될 DNA 시료에 대한 장, 단기적인 그리고 지속적인 follow-up을 통하여 복제동물의 분석 자료를 체계적으로 정리·관리하여 유전적 이상 가능성 분석에 최적의 조건을 구축함
- (다) 96 well microplate를 이용한 High throughput genotyping system 이용으로 대량의 genotype를 분석하며, 실험 자동화를 위해 ABI Prism 3100 Genetics analyzer, GeneAmp PCR System 9700, Hydra robot 등의 장비

를 이용. 선발된 유전적 표지자를 microsatellite genotyping 기법을 이용하여 분석함. 즉 표지자 (microsatellite)를 포함한 부위를 표지자별로 각각 제작된 프라이머를 이용하여 증폭 후 Auto-sequencer로 분석하고 GeneScan, Genotyper Software를 이용하여 genotype결정 (그림2)



<그림2> Microsatellite typing

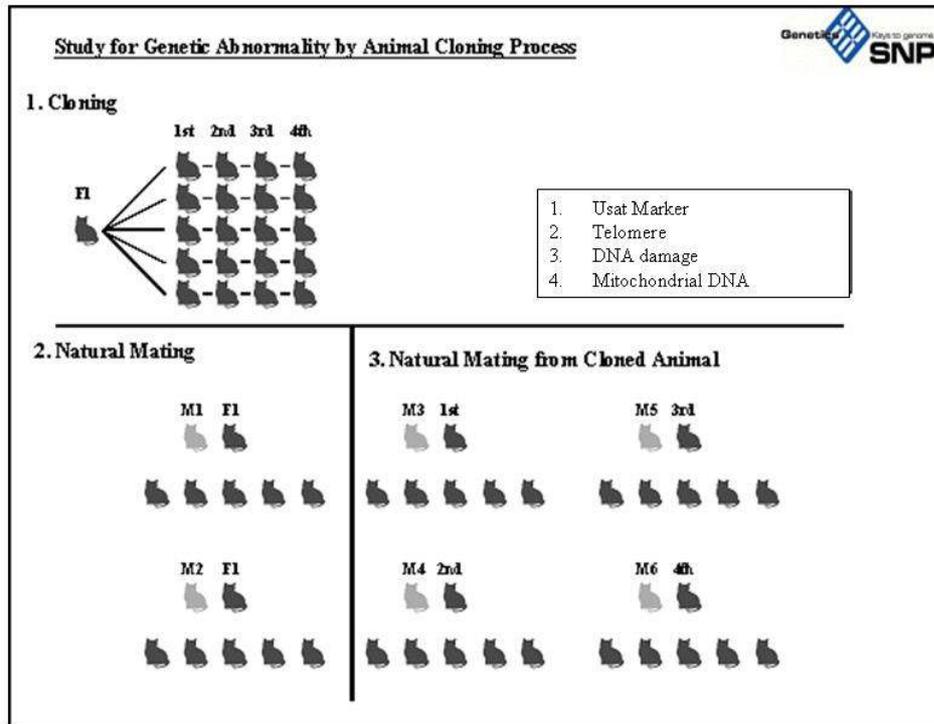
(3) 특수유용 동물의 복제를 담당하는 기관과의 전략적인 협조 하에 복제동물의 사양 및 관찰에 의한 질병발생 양상, 행동학적 이상 유무 관찰로 이상 유전자, 유전체, 미토콘드리아 등의 주요 부위를 선정하여 microsatellite typing, direct DNA sequencing 등의 방법으로 복제동물의 유전적 이상 분석 (그림3 참조)

(가) 복제동물과 정상 교배 생산 동물간의 유전적 mutation rate를 분석, Kaplan-Meier survival analysis 등의 다양한 통계기법을 이용하여 복제와 관련된 임상자료 marker 분석

(나) 현재 유전체 정보 DB의 고양이, 개 등의 미토콘드리아 genome sequence를 기반으로 복제동물의 미토콘드리아의 염기서열을 분석하여 동물 복제시 복제할 수 없는 미토콘드리아 유전적 변이에 의한 이상 분석

(다) (주) SNP Genetics 가 자체적으로 구축한 web-based gene information

system을 통해 유전자, 유전체, 미토콘드리아 등의 sequencing 및 변이 분석을 위한 PCR primer를 construction 함



<그림3> 복제동물의 유전적 이상 확인 개체 선별

- (라) 384 well format으로 구성된 sequencing plate를 이용하여 plate 당 25 fragment의 sequencing reaction 및 purification을 수행한 후, high-throughput system인 3730/3100 analyzer를 이용한 염기서열분석을 수행함
- (마) DNASTAR-SeqManII를 이용하여 복제동물의 시료에서 확인된 sequencing data를 분석
- (4) 복제동물 관련 유전적 표지자 (microsatellite), mitochondria sequence 이상 분석 등의 기술과 통계분석에 필요한 핵심적인 개념과 기술 등의 꾸준한 개발을 통한 참여 연구자들의 해당분야에 전문화를 꾀함으로써 향후 전개될 다양한 연구 사업에 이를 활용

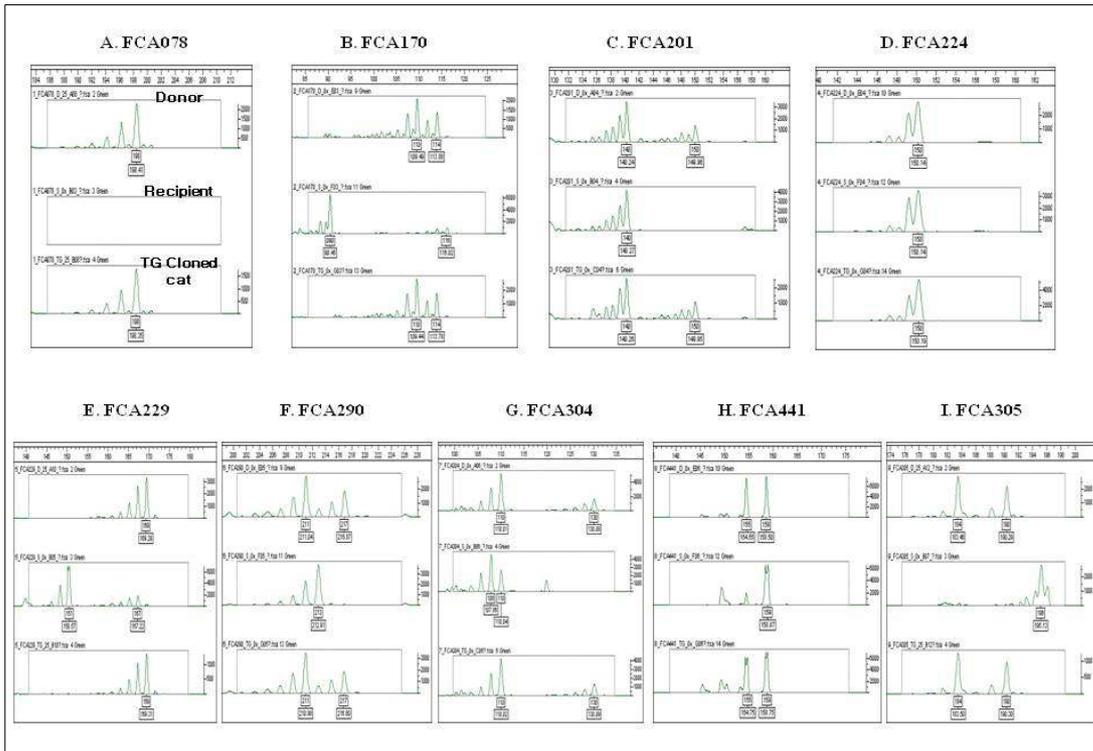


그림1. TG 복제 고양이와 재복제 고양이 복제여부확인

나. 연구내용 및 결과

(1) 특수 유용 복제 동물의 복제 여부의 확인

(가) 고양이 조직 및 세포에서 DNA 추출

- ① Recipient(대리모 domestic cat 귀 조직), Donor cell(cloned TG cat skin Fibroblast cell), TG clone(생산된 Recloned TG cat 귀조직)에서 manual 방법으로 DNA 추출
- ② 조직이 작고, 세포수가 적어서 DNA 추출에 어려움이 있었지만, 실험에 필요한 양을 확보하기 위해 최대한의 loss를 줄여서 추출하고 amplify를 하여 확보함

(나) 재복제고양이의 복제 여부 확인 및 유전적 이상 확인

- ① 고양이 복제 확인 유전자 표지자 (FCA229, FCA290, FCA305, FCA441, FCA078, FCA201, FCA224, FCA170, FCA304)를 이용하여 복제확인
- ② Genotyping 결과, 재복제 고양이는 Donor cell(cloned TG cat)의 유전자 표지자와 일치하여 재복제가 제대로 이루어 졌음을 확인 (그림1, 표1)
- ③ 9개 유전자 표지자에서는 유전적 이상이 없었음

표1. TG 복제 고양이와 재복제 고양이의 유전자 표지자 결과

STR Marker	FCA078	FCA170	FCA201	FCA224	FCA229	FCA290	FCA304	FCA441	FCA305
(range)	188-200	90-122	135-169	154-162	160-170	213-227	109-117	153-183	185-201
Donor cell	198/198	110/114	140/150	150/150	169/169	211/217	110/130	155/159	184/190
Recipient	.	90/116	140/140	150/150	151/167	213/213	108/110	159/159	196/196
TG Cloned cat	198/198	110/114	140/150	150/150	169/169	211/217	110/130	155/159	184/190
시료 설명 : Donor cell (cloned TG cat skin Fibroblast cell) Recipient (대리모 domestic cat 귀 조직) TG clone(생산된 Recloned TG cat 귀 조직)									

(다) 복제 산자 확인

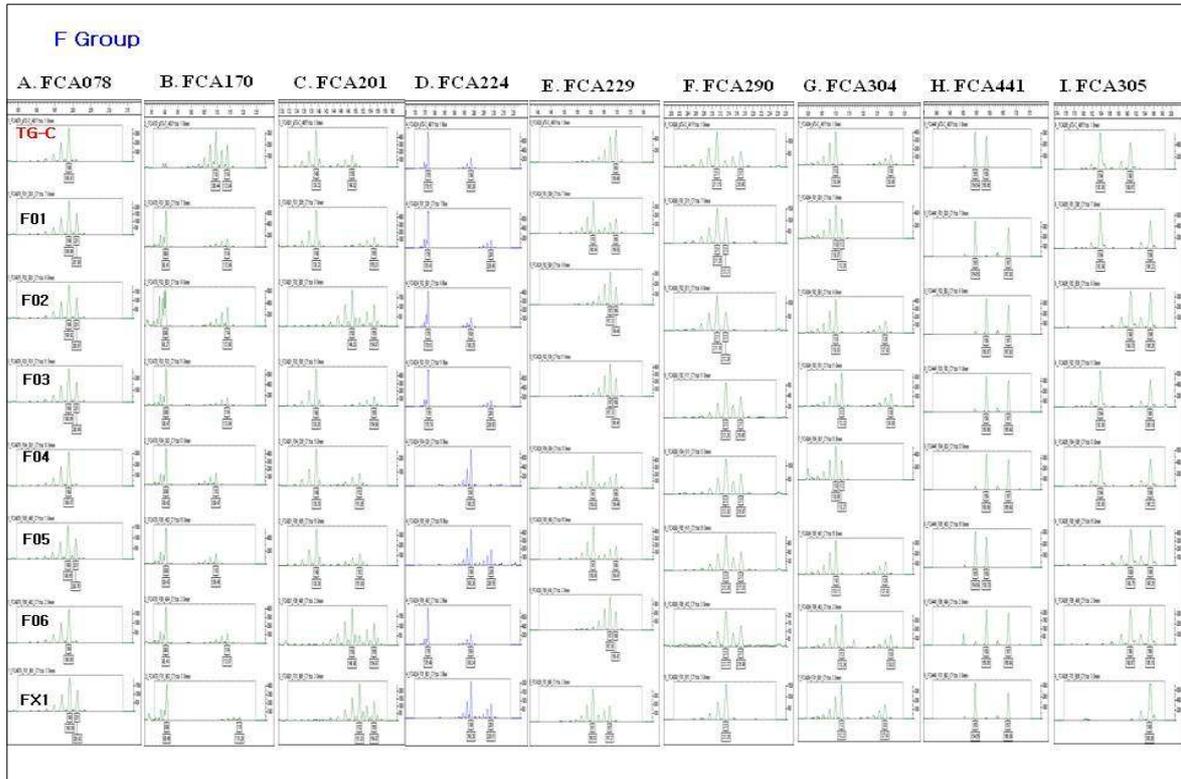
- ① 복제개체에서 태어난 복제 산자들에서 9개 유전자 표지자들의 결과에서는 유전적 이상이 없음. TG-C(복제 개체), 암컷 시료 및 복제 산자에서 추출된 DNA를 이용하여 기 확립된 고양이 유전자 표지자를 이용하여 복제산자들의 유전자 마커들을 확인한 결과가, 복제 산자 고양이들은 복제 고양이 수컷 및 암컷 어미 고양이의 유전자 표지자를 한 개씩 나누어 가짐을 확인함(표2, 그림3)
- ② 복제개체에서 태어난 복제 산자들에서 9개 유전자 표지자들의 결과에서는 유전적 이상이 없음

표2. 복제 고양이 Donor와 복제산자의 유전자 표지자 확인

STR Marker (range)			FCA078	FCA170	FCA201	FCA224	FCA229	FCA290	FCA304	FCA441	FCA305
Sample Details	Sex	ID	188-200	90-122	135-169	130-162	160-170	213-227	109-117	153-183	185-201
Donor	M	TG-C	199 199	110 114	140 150	150 172	169 169	211 217	110 130	155 159	184 190
Offspring of X1	F	F01	199 201	90 114	140 156	150 182	161 169	211 213	110 112	155 167	184 196
Offspring of X1	M	F02	199 201	90 114	150 156	150 172	167 169	211 213	110 128	159 167	190 196
Offspring of X1	M	F03	199 201	90 114	140 156	150 182	167 169	213 217	112 130	159 167	184 196
Offspring of X1	F	F04	199 199	90 110	140 152	172 172	161 169	213 217	110 112	159 167	184 196
Offspring of X1	M	F05	199 201	90 110	140 152	172 182	161 169	213 217	110 128	155 159	190 196
Offspring of X1	F	F06	199 199	90 114	150 156	150 172	167 169	213 217	112 130	159 167	190 196
Mother of F group	F	X1	199 201	90 118	152 156	172 182	161 167	213 213	112 128	155 167	196 196
Offspring of X2	F	T05	193 199	90 110	140 150	150 172	167 169	213 217	110 110	151 159	190 194
Offspring of X2	M	T06	199 201	104 114	140 150	172 172	167 169	211 213	108 110	159 159	190 194
Offspring of X2	F	T07	199 201	90 114	140 150	150 172	167 169	211 213	108 110	159 159	184 194
Offspring of X2	F	T08	199 201	104 114	150 152	172 172	165 169	211 213	108 110	151 159	184 194

Offspring of X2	F	T09	193	199	90	114	140	140	172	172	167	169	211	213	108	110	159	159	190	194
Offspring of X2	M	T10	193	199	104	110	140	152	150	172	165	169	211	213	110	130	159	159	184	194
Mother of T group	F	X2	193	201	90	104	140	152	172	172	165	167	213	213	108	110	151	159	184	194

그림2. 복제개체, 복제산자 및 어미고양이들(F, G group)의 친자확인



(2) FCA224 유전자 표지자 재확립

① 전단계에서 확립된 고양이 유전자 표지자들의 분석 과정에서 9개 유전자 표지자 중 FCA224에서 문제가 발생함. 비특이적 homo peak이 생성. 새로운 probe를 제작하여 여러 조건으로 test 하여 보았지만 같은 결과를 얻음 (그림3)

② Ncbi에서 FCA224의 위치의 sequence를 download 받아 다른 sequence의 primer를 제작.(그림3 참조)

FCA224_R: GATATCAGCTATTAATGCCAGAGTTGTATG
 FCA224_2R: CTATTAATGCCAGAGTTGTATGAAAGGGACTTC
 FCA224_3R: AAAGCATTATTGATATCAGCTATTAATGCC

③ FCA224_3R에서만 peak이 예전결과와 같은 양산으로 나옴. forward primer는 재주문한 형광 primer를 그대로 사용.(그림4)

- ④ 기존 조건과 비교 하였을 때, HEX dye가 6-FAM으로 바뀌었고, PCR peak의 크기가 150-170영역이 180-200 영역으로 변경되었음

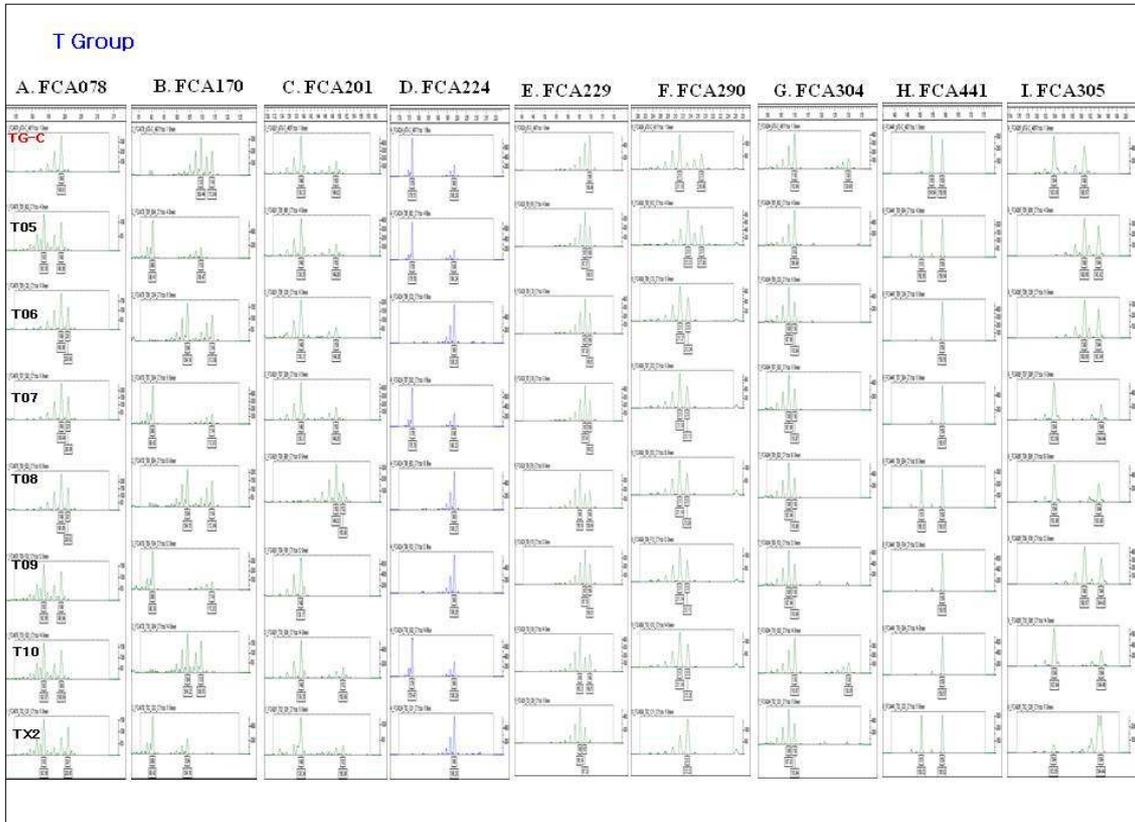


그림3. FCA224 Sequence와 재합성 primer 위치

>gi|4754683|gb|AF130574.1|AF130574 Felis catus clone Fca224 microsatellite sequence

GATCTNACAGTNTAGTNCATGAAATCCAGCNCCACTTTGGG**CTGGGTGC**
TGACAGCATAGAGCCTNCTTGGNATTCCAGCTCCCTATCTCTCTGCCCC
 TCCCCTGCTTACACATGCACTCTCTNGCAAATAAACTTAAACACACA
 CACACACACACACACACACGCACGCAAGAAGT**CCCTTTCATACAACT**
CTGGCATTAATAGCTGATATCAA TAATGCTTTA TACT

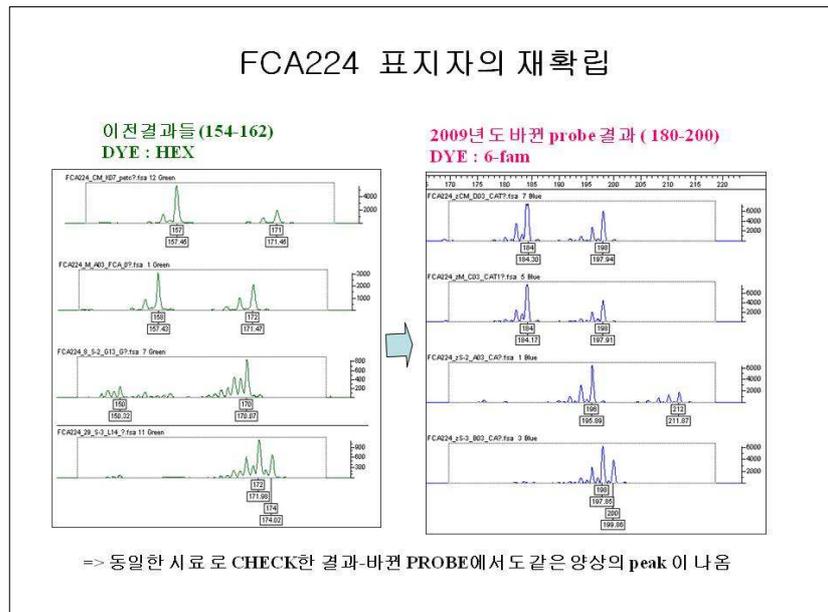


그림4. FCA224의 기존 결과와 재확립된 결과비교

(3) 미토콘드리아 유전체 분석

(가) 체세포 제공 시료(donor)의 미토콘드리아 유전자 추적

- ① 체세포 핵이식으로 복제 개체를 만들 때, recipient인 난자에 존재하는 미토콘드리아가 복제 개체에도 존재 할것으로 추정되지만, 체세포의 세포질에 있던 소량의 미토콘드리아가 복제 개체로 이동하였는지 유무를 확인 하고자 함
- ② 복제 개체에 donor의 미토콘드리아 유전자가 존재하는지 확인하기 위해 donor 특이적인 sequence로 primer를 제작하여 확인
- ③ primer 선별은 전단계 과제에서 연구된 미토콘드리아 유전체 full sequencing한 자료를 토대로 recipient와 donor에서 각기 다른 polymorphism을 가지는 부분을 선택함. polymorphism이 많지가 않아 2 sequence가 차이나는 부분에서 primer를 design함 (표3)

표3. Donor 특이 미토콘드리아 primer sequence

Num	primer name	sequence(5'-3')
1	catmt_10921_F	AtCATCTCACACTAGCCAGCATAgC
2	catmt_10921_R	AAAGGTGCGGAGAGTGAGTC
3	R_catmt_10921_F	CTTCCCTGAGCCTCACAAAC
4	R_catmt_10921_R	GcTATGCTGGCTAGTGTGAGATGaT
5	catmt_15098_F	ATCGAcCTACcTGGCCCATCTAA
6	catmt_15098_R	TGGAATTGCTGACAGGAGGT
7	R_catmt_15098_F	CCATGGCCTCCTCACTAAAG
8	R_catmt_15098_R	TTAGATGGGGCaGGTAGgTCGAT

- ④ 체세포 제공 시료(donor), 복제 개체들 및 난자 제공 시료로 확인된 것을 포함하여 모두 25개 시료에서 pcr하여 전기영동으로 pcr유무를 확인함 (표4)
- ⑤ 실험을 design할 때, 난자 제공 시료에서는 pcr이 되지 않고, 체세포 제공 시료에서는 pcr이 잘되고, 복제 개체에서는 pcr이 안되거나, 소량될 것을 예상함

표4. Donor 미토콘드리아 추적에 사용한 시료

NO.	Name	sample
1	Clone-B	체세포 제공고양이 체세포(Clone-B)
2	S-2	대리모 2 (S-2)
3	RC2-1	대리모 2에서 출생한 고양이1 (RC2-1)
4	S-3	대리모 3
5	RC3-1	대리모 3에서 출생한 고양이1 (RC3-1)
6	S-4	대리모 4
7	RC4-1	대리모 4에서 출생한 고양이1 (RC4-1)
8	RC4-2	대리모 4에서 출생한 고양이2 (RC4-2)
9	RF-1	대리모 5에서 회수한 태아조직 (RF-1)
10	RF-2	대리모 5에서 회수한 태아조직 (RF-2)
11	OD2-2	대리모 2에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직 (난소)
12	OD2-3	대리모 2에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직 (난소)
13	OD2-4	대리모 2에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직 (난소)
14	OD2-7	대리모 2에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직 (난소)
15	OD2-8	대리모 2에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직 (난소)
16	OD2-9	대리모 2에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직 (난소)
17	OD2-13	대리모 2에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직 (난소)
18	OD2-19	대리모 2에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직 (난소)
19	OD3-1	대리모 3에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직
20	OD4-1	대리모 4에서 출생한 고양이1과2 에 난자제공 고양이 조직
21	OD4-4	대리모 4에서 출생한 고양이1과2 에 난자제공 고양이 조직
22	OD5-2	대리모 5에서 회수한 태아 조직 1과2 에 난자제공 고양이 조직
23	OD5-3	대리모 5에서 회수한 태아 조직 1과2 에 난자제공 고양이 조직
24	OD5-4	대리모 5에서 회수한 태아 조직 1과2 에 난자제공 고양이 조직

⑥ 결과는 4개 primer sets 모두 다 전체 시료에서 pcr이 됨. 결론은 2개 sequence가 차이 나는 primer로는 변별력이 없어 전체 시료가 pcr된 것으로 사료됨 (그림 5)

⑦ R_catmt_10921, R_catmt_15098, catmt_15098 PCR direct sequencing결과 모든 복제 개체가 각각 복제 시 난자 제공한 개체와 미토콘드리아 sequence가 일치하였으며, 체세포 donor와 일치하지 않았음. RF-1 복제 개체의 경우는 난자 제공 개체와 체세포 공여 개체와 미토콘드리아 sequence가 동일함. (그림 6)

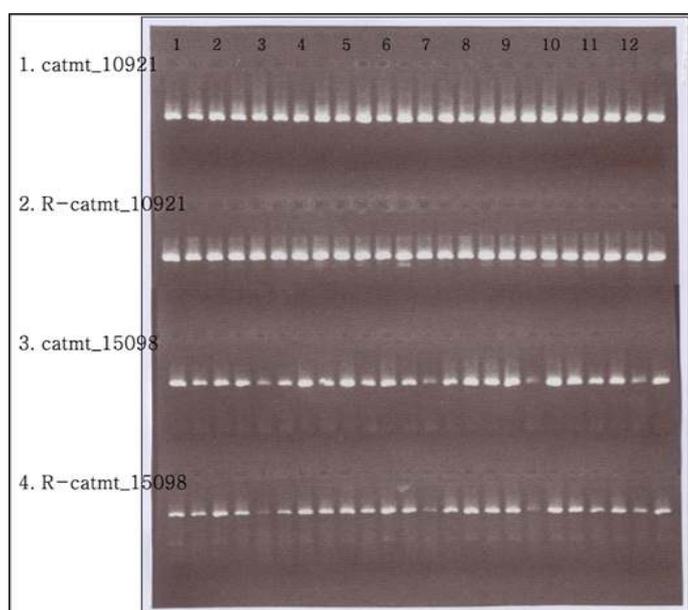


그림5. Donor 미토콘드리아 확인 pcr 실험 결과

primer name	R10921	R10921	R15098	R15098	15098	15098	15098			
Name	sample informatin									
/polymorphism	10803C>T	10852T>C	14752G>A	14760T>C	15217T>C	15332A>G	15344A>G			
Clone-B	체세포	제공고양이	체세포(Clone-B)	C	T	G	C	C	A	A
S-2	대리모 2 (S-2)			C	T	A	T	T	G	A
RC2-1	대리모 2에서 출생한 고양이1 (RC2-1)			C	C	G	T	T	A	G
OD2-2	RC2-1에 난자제공 고양이 조직 (난소)			C	C	G	T	T	A	G
S-3	대리모 3			C	T	G	C	C	A	A
RC3-1	대리모 3에서 출생한 고양이1 (RC3-1)			C	T	A	T	T	G	A
OD3-1	RC3- 에 난자제공 고양이 조직			C	T	A	T	T	G	A
S-4	대리모 4			C	T	A	T	T	G	A
RC4-1	대리모 4에서 출생한 고양이1 (RC4-1)			T	C	G	T	T	A	G
OD4-4	RC4-11에 난자제공 고양이 조직			T	C	G	T	T	A	G
S-4	대리모 4			C	T	A	T	T	G	A
RC4-2	대리모 4에서 출생한 고양이2 (RC4-2)			C	T	G	T	T	G	A
OD4-1	RC4-2에 난자제공 고양이 조직			C	T	G	T	T	G	A
S-5	대리모 5		
RF-1	대리모 5에서 회수한 태아조직 (RF-1)			C	T	G	C	C	A	A
OD5-3	RF-1 1 에 난자제공 고양이 조직			C	T	G	C	C	A	A

S-5	대리모 5
RF-2	대리모 5에서 회수한 태아조직 (RF-2)	C	T	G	T	T	G A
OD5-2	RF-2 에 난자제공 고양이 조직	C	T	G	T	T	G A

그림6. Doner 미토콘드리아 확인 sequencing 결과

(나) 고양이 미토콘드리아 genome 추가 분석

- ① 전 단계에서 총 34개의 primer sets을 design하였는데 그중 29개가 완료되었고, 5개 primer sets이 primer optimization 및 sequencing 결과이상으로 완료되지 않아 추가실험 진행 (표5)
- ② 분석한 시료는 1단계 실험에서 사용된 시료에서 한 개가 빠진 체세포 복제 고양이 시료 1마리와 복제고양이의 체세포를 이용하여 재 복제된 고양이 시료 6마리와 대리모 4마리 및 난자 제공 후보 14시료 (1개 시료가 부족으로 1단계에서 사용했던 것이 이번에는 빠짐)로 총 24개 사용
- ③ 5개 primer sets을 재합성하고, 기존에 실험하였던 시료에서 추가적으로 sequencing 진행 (표6)
- ④ Primer 1이 있는 부분은 hyper variable영역이면서 repeat이 많아서 sequencing에 어려움이 있음. 세 번의 재합성 실험을 진행하였으나, GC가 많은 repeat부분에서 sequence가 지지분하게 나옴 (그림7)
- ⑤ RC2-1복제고양이(num 3)와 대리모 시료들은 (num 12,15,17,19)같은 sequence를 가짐을 확인하였음 (그림8)
- ⑥ Primer 3에서 1240 A6-8(A repeat), 1277G>A, 1408C>T 3개의 polymorphism 이 추가로 확인됨
- ⑦ Primer 4는 forward, reverse 모두 200 bp 부근에서 sequence가 겹쳐서 나옴
- ⑧ Primer 15는 7199T>C, 7223T>C, 7230T>C, 7302C>T, 7424T>C 5개의 Polymorphism이 확인 되었고, heteroplasmy의 양상을 나타냄 (그림9)
heteroplasmy 는 일반적으로 정상적인 미토콘드리아 genome에서 나타나는 현상이 아니라, 체세포 내에 정상과 비정상인 미토콘드리아 유전자가 섞여 있는 현상으로 유전적 질환과 관련이 있다고 보고되어 있음⁽¹²⁻¹⁴⁾
- ⑨ Primer 16은 다수의 heteroplasmy 양상이 나타나서 반복 실험을 진행하였으나, 같은 결과가 나옴. 전체가 hetero 양상이 많아서 결과 정리가 어려움 (그림10)

- ⑩ 5개 재 실험한 primer 중 2개가 완료되어 8개의 추가 snp가 확인되었고, 나머지 3개는 sequencing은 되었으나, primer1에서는 repeat영역이 존재하고(그림7), primer16은 heteroplasmy가 다수 존재하고, primer 4는 peak이 겹쳐져서 나오는 양상이 1차년도 실험과 같음. 이 부분의 template sequence가 sequencing 하기에 까다로움
- ⑪ 추가된 결과에서 난자 제공 개체와 복제 개체를 비교한 결과, sequence가 일치함을 확인
- ⑫ 고양이 미토콘드리아 유전체를 full sequencing하여 발굴된 138개 polymorphism의 map 위치 및 freq.와 amino acid change 등을 분석 완료 (그림11)
- ⑬ 전체 미토콘드리아 sequencing을 수행한 25개 시료 중 polymorphism이 겹치는 난자 제공 난소 시료를 제외하고, 복제 고양이들 간에 99% polymorphism이 일치하는 시료들을 제외한 후, 서로 다른 polymorphism을 가지는 시료 10개를 선별하여 allele frequency를 구함
- ⑭ 138개 polymorphism을 발굴하였고, 8136A>G 위치 등 6 곳에서 heteroplasmy가 확인됨 (표7)
- ⑮ 기 발굴된 고양이 미토콘드리아 polymorphism은 향후 진행될 복제 고양이의 유전적 이상 확인 및 고양이과 동물의 미토콘드리아 유전체 연구에 기반이 될 것으로 사료됨

표5. 미토콘드리아 유전체 분석 primer 및 재분석 primer

Num	Exp.	원인	region	primer name	forward sequence(5'-3')	reverse sequence(5'-3')
1	fail	opt	Dloop	catmito-1	AATCAGCCCATGATCACACA	GGGGTTTGGCAAGACATAAA
2	success		Dloop	catmito-2	ACACGCGAACGCTTTAATTT	CGCCGTGGGTCTATTAGTTT
3	fail	seq		catmito-3	TAACACCTTGCTCAGCCACA	CTTCATGGCCCGATCAA
4	fail	seq		catmito-4	AACCCCGATATACCTCACCA	GGGGCCTAGCTGAAGTTCTC
5	success			catmito-5	GCCCAAACATCTACAAACACAA	ATCAGTGGTTATCCGTTCTGA
6	success			catmito-6	TGCAACCAACTCCTAACCTAAAA	TCCTAGGGTAACTTGTGCCG
7	success			catmito-7	CCGACAGGAACAACAAACCT	CAGCATCTGCGATAGGTTGA
8	success			catmito-8	CGAGAGCTCGGGTTTGTAG	CTTCTGTCAGGTCGAATGGG

	s					
9	success			catmito-9	TCACACTAGCCATCATTCTCCT	ATGGGCCCGATAGCTTATTT
10	success			catmito-10	ACCCACGATTCCGATATGAC	TCAGAAGTGGAAATGGGGCTA
11	success			catmito-11	CCTTAATCCCATAGCATCAATCA	TTTTGTGCATTCAAATCGTCA
12	success			catmito-12	CACTCTCCGGATTTATCCCA	TCACCGGTTTATGAACATAGG
13	success			catmito-13	TCCTCACTAGATTGGTGGGC	TTAGGTCTACGGATGCTCCTG
14	success			catmito-14	GCAGGAAGTGGGTGAACAGT	CGTTAGGCCTCTACGGTAA
15	fail	hetero		catmito-15	GCCATGATATCAATCGGCTT	AATGTGTGGTACGGAGGAGG
16	fail	hetero		catmito-16	CAGCACTTCCTAGGCCTGTC	TTACTGTGAGGGAGGGGTTG
17	success			catmito-17	CGTTGATGCTAACAACCAAGC	AGTGATGGATCAGGTGGATG
18	success			catmito-18	TGCTCAGAAATCTGTGGCTC	TTAGTCTTGTGGCGAAACCC
19	success			catmito-19	GGCCTATTACCCCACTCATT	CGTATCGAAGGCCTTTTTGA
20	success			catmito-20	GCCCTTTCAGCCCTCTTAAT	AAGTGTCAATATCAGGCGGC
21	success			catmito-21	GGGAAATCGAAAACACATGC	AGGCTGCGGCTAGTAATGA
22	success			catmito-22	CTTCCCTGAGCCTCACAAAC	AAAGGTGCGGAGAGTGAGTC
23	success			catmito-23	ATCCCCACTGCCATACTCAT	GGGAGCTTCAACATGTGCTT
24	success			catmito-24	TCACTACCCCTTTTAGTCGCA	TTGATCATGAGAAGGAGGCT
25	success			catmito-25	CGAACAATAATCCTAGCCCG	TGAAGGCGTAAGAGATTGTGG
26	success			catmito-26	TGAATCTAATAATGGAAGTGCAA	ATCTGCTCGGCATATCATC
27	success			catmito-27	CATCGCTGAGAGGGAGTAG	AGGGAGGTAGTGGTGAAGGG
28	success			catmito-28	AACCATTGGGATTAACCAACC	AGGCTCATTTTTGATGGGAG
29	success			catmito-29	CCCCAACAACTATCCCACAA	GGCGTGGACGTCTAATAAGG
30	success			catmito-30	CCATGGCCTCCTCACTAAAG	GGTAACTGATGAAAAGGCGG
31	success			catmito-31	TCGAAAATCACACCCCTTA	AGACCTAGGATGTCTTTGATTG
32	success			catmito-32	ACCTCTGTGTCAGCAATTCCA	TTCAATAATGCCTGAGATGGG

33	success		Dloop	catmito-33	ACCCTAACATGAATCGGTGG	CATGCTTAATATTCATGGGGA
34	success		Dloop	catmito-34	TATCAGCACCCAAAGCTGAA	TCAAGGATTTATGGCCCTG

표6. 미토콘드리아 유전체 추가실험 primer sequence

Num	fail 원인	결과	region	primer name	forward sequence(5'-3')
1	opt_fail	fail	hyper variable	catmito-1_F	ATTCTCTATGCGGGGTCTCC
				catmito-1_R	TGTTGTTTCGATAGGGACGAA
2	seq_fail	success		catmito-3_F	TGCCCTCTAAGTCACCCAGT
				catmito-3_R	TTCGTAAGGATCTTCGTGGG
3	seq_fail	일부 fail		catmito-4_F	GACTTGGCGGTGCTTTACAT
				catmito-4_R	TCTTTCATCTTTCCTTGCG
4	hetero	success		catmito-15_F	TTCTGATTCTTTGGCCATCC
				catmito-15_R	GAAGTGCTGAGGGAAGAACG
5	hetero	fail		catmito-16_F	GAATTCGTAAGGAGGGTAGGGCG
				catmito-16_R	TGCGTGAGCTTGTTGTTAG

```

>gi|5835205|ref|NC_001700.1|Felis catus mitochondrion, complete genome+
GGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAAAGTGTGGTGTACGATTTGGTATTTTATTTTATGGGGTTCGAACCTGCTATGACTCAGC
TATGACCTAAAAGGTCCTGACTCAGTCAAATATATGTTGCTGGGCTATTCTCTATGCGGGGTCTCCACACGCACAGACAGTCAAGGTGCTATTCA
GTCAATGGTACAGGACATAACTTAAATTCCTATTGTTCCACAGGACACGGGATGCGCGCACCCACGTTTGGGTGACACAGTGTACACGTACACAC
CGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACAC
ACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACAC
ACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACACACGTACAC
GCTTAAATTAAGTAAATACTAGCTAATCAAAACCCCTTACCCCGTAAACCTTATTTAATAATACGTGCTATTATGCTTGCCTTGCCTTGCCTTGC

```

그림7. Primer1 hyper variable region sequence

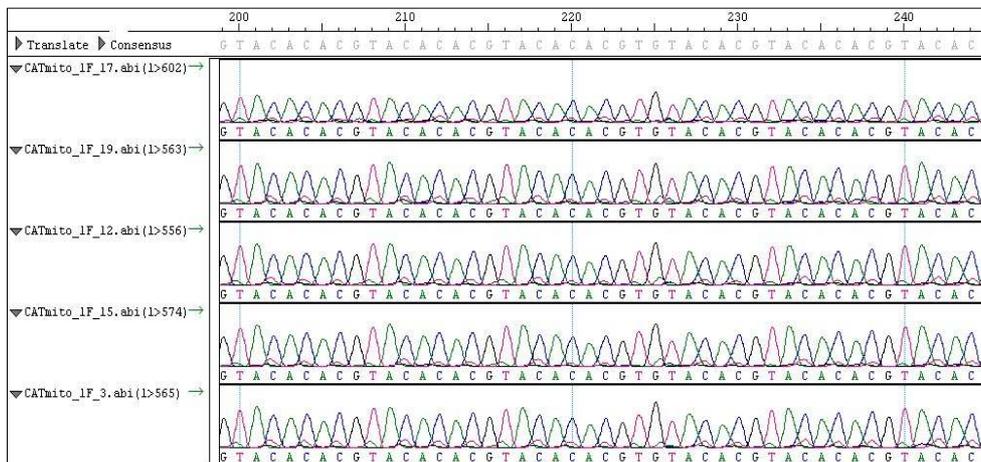


그림8. RC2-1 복제 고양이와 대리모들의 primer1 hyper variable region 결과

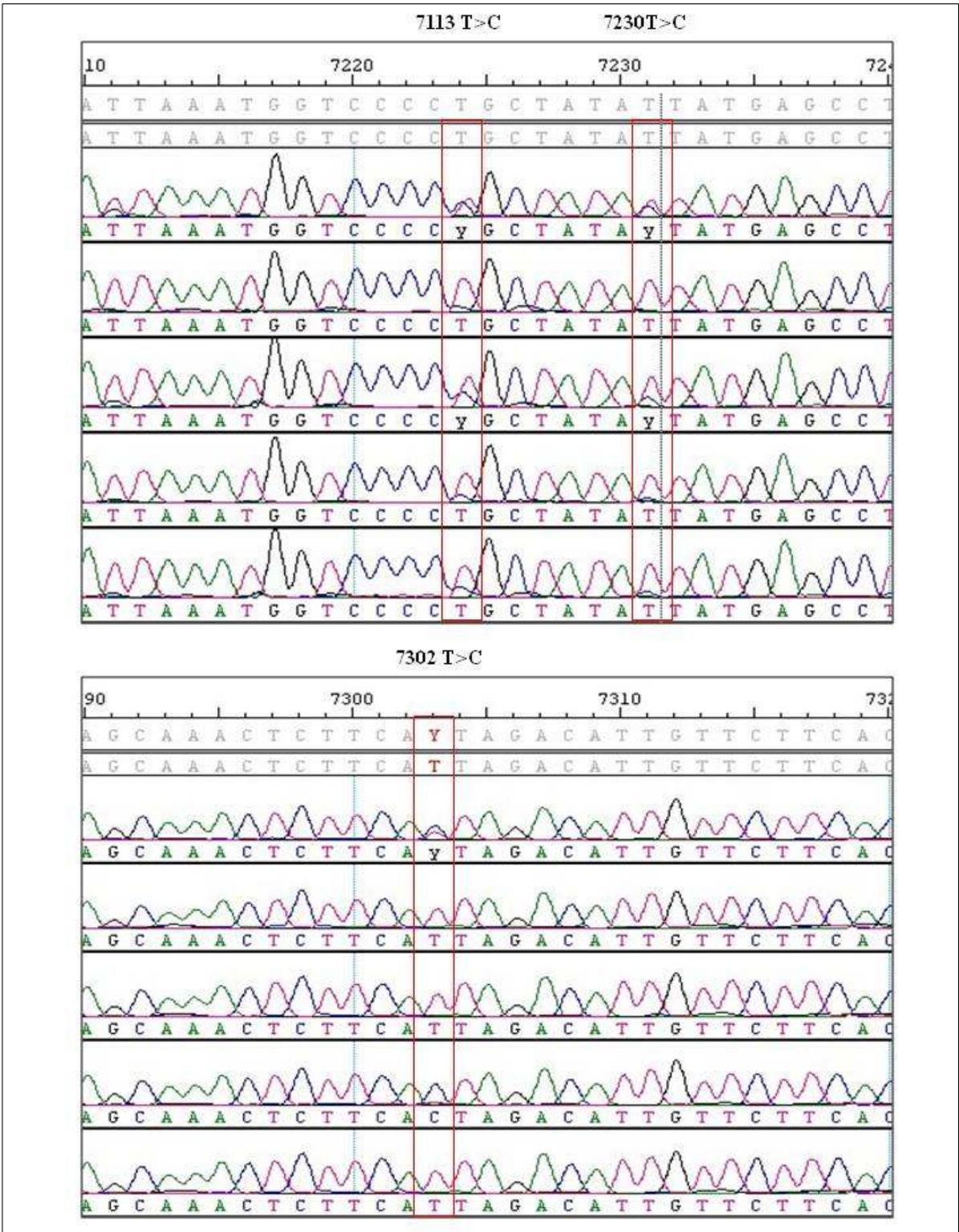


그림9. Heteroplasmy chromatogram (primer 15 결과)

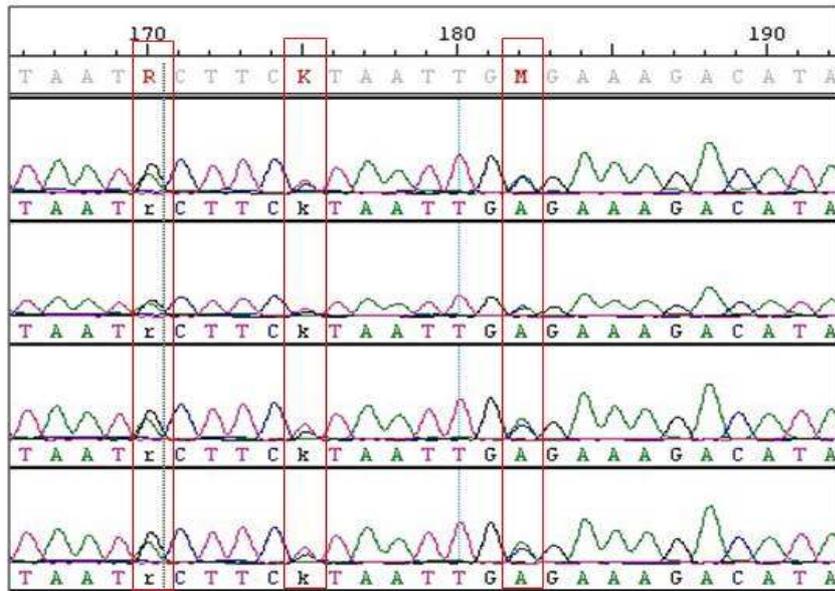
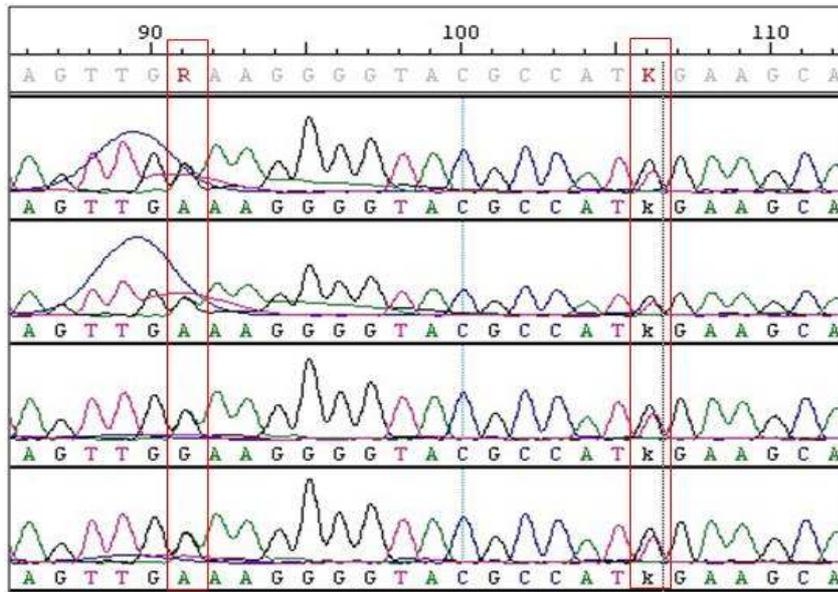


그림10. Heteroplasmy chromatogram2 (primer 16 결과)

**Map of Felis catus Mitochondrial Genome (NC 001700) (17,009 bp)
- 138 polymorphisms**

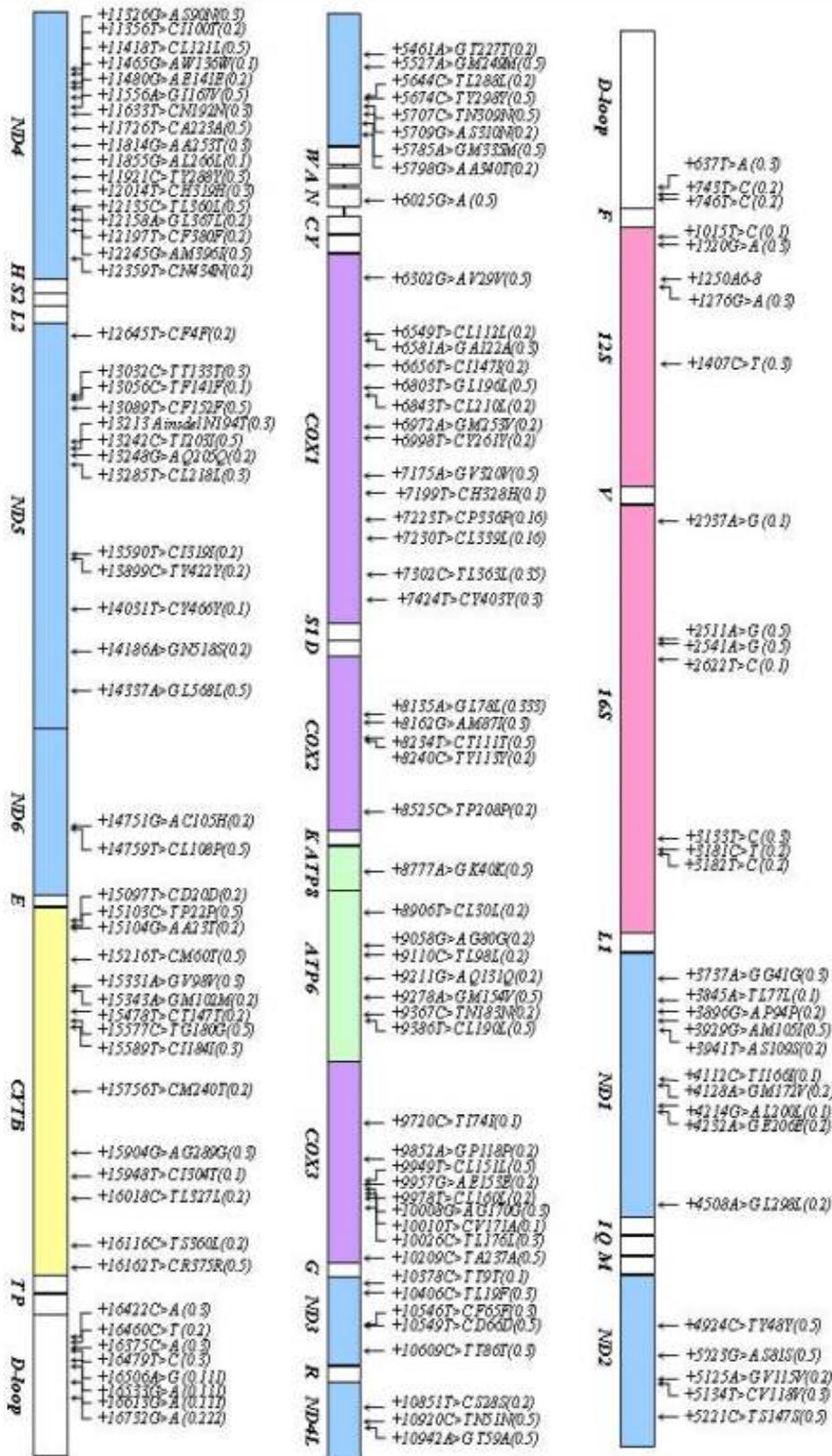


그림11. 고양이 미토콘드리아에서 발굴된 138 polymorphism 표시한 map

표7. 미토콘드리아 유전체 genotyping 정보

Num	polymorphism	Sample name										Frequency	Gene	Amino acid change
		Clone-B	S-2	RC2-1	OD2-2	S-3	RC3-1	RC4-2	S-5	OD5-3	OD5-4			
1	637T>A	T	A	T	T	T	A	A	T	T	T	0.3		
2	743T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2		
3	746T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2		
4	1015T>C	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	0.1		
5	1020G>A	G	A	G	G	G	A	A	G	G	G	0.3		
6	1250A6-8	A7	A7	A6	A6	A7	A7	A78	.	A7	A7			
7	1276G>A	A	G	G	G	A	G	G	.	A	A	0.3		
8	1407C>T	C	T	C	C	C	T	T	.	C	C	0.3		
9	2037A>G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	0.1		
10	2511A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5		
11	2541A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5		
12	2622T>C	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	0.1		
13	3133T>C	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	0.3		
14	3181C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2		
15	3182T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2		
16	3737A>G	A	G	A	A	A	G	G	A	A	A	0.3	ND1	G41G
17	3845A>T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	0.1	ND1	L77L
18	3896G>A	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	0.2	ND1	P94P
19	3929G>A	A	G	G	G	A	G	G	A	A	A	0.5	ND1	M105I
20	3941T>A	T	T	A	A	T	T	T	T	T	T	0.2	ND1	S109S
21	4112C>T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0.1	ND1	I166I
22	4128A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	ND1	M172V
23	4214G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	0.1	ND1	L200L
24	4232A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	ND1	E206E
Num	polymorphism	Sample name										Frequency	Gene	Amino acid change
		Clone-B	S-2	RC2-1	OD2-2	S-3	RC3-1	RC4-2	S-5	OD5-3	OD5-4			
25	4508A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	ND1	L298L
26	4924C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	ND2	Y48Y
27	5023G>A	A	G	G	G	A	G	G	A	A	A	0.5	ND2	S81S
28	5125A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	ND2	V115V
29	5134T>C	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	0.3	ND2	V118V
30	5221C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	ND2	S147S
31	5461A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	ND2	T227T
32	5527A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5	ND2	M249M
33	5644C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2	ND2	L288L
34	5674C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	ND2	Y298Y
35	5707C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	ND2	N309N
36	5709G>A	G	A	G	G	G	A	G	G	G	G	0.2	ND2	S310N

37	5785A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5	ND2	M335M
38	5798G>A	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	0.2	ND2	A340T
39	6025G>A	A	G	G	G	A	G	G	A	A	A	0.5		
40	6302G>A	A	G	G	G	A	G	G	A	A	A	0.5	COX1	V29V
41	6549T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	COX1	L112L
42	6581A>G	A	G	A	A	A	G	G	A	A	A	0.3	COX1	A122A
43	6656T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	COX1	I147I
44	6803T>G	G	T	T	T	G	T	T	G	G	G	0.5	COX1	L196L
45	6843T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	COX1	L210L
46	6972A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	COX1	M253V
47	6998T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	COX1	Y261Y
48	7175A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5	COX1	V320V
49	7199T>C	T	Y	T	T	Y	T	.	T	T	T	0.1	COX1	H328H
50	7223T>C	T	Y	T	T	Y	Y	.	T	T	T	0.16	COX1	P336P
Num	polymorphism	Sample name										Frequency	Gene	Amino acid change
		Clone-B	S-2	RC2-1	OD2-2	S-3	RC3-1	RC4-2	S-5	OD5-3	OD5-4			
51	7230T>C	T	Y	T	T	Y	Y	.	T	T	T	0.16	COX1	L339L
52	7302C>T	C	Y	T	T	Y	Y	C	C	C	C	0.35	COX1	L363L
53	7424T>C	T	Y	C	C	Y	T	T	T	T	T	0.3	COX1	Y403Y
54	8136A>G	G	R	A	R	.	R	R	G	G	G	0.333	COX2	L78L
55	8163G>A	G	A	G	G	G	A	A	G	G	G	0.3	COX2	M87I
56	8235T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	COX2	T111T
57	8241C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2	COX2	Y113Y
58	8526C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2	COX2	P208P
59	8778A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5	ATP8	K40K
60	8907T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	ATP6	L30L
61	9059G>A	A	G	G	G	A	G	G	G	G	G	0.2	ATP6	G80G
62	9111C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2	ATP6	L98L
63	9212G>A	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	0.2	ATP6	Q131Q
64	9279A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5	ATP6	M154V
65	9368C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2	ATP6	N183N
66	9387T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	ATP6	L190L
67	9721C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	0.1	COX3	I74I
68	9853A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	COX3	P118P
69	9950T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	COX3	L151L
70	9958G>A	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	0.2	COX3	E153E
71	9979T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	COX3	L160L
72	10009G>A	G	A	G	G	G	A	A	G	G	G	0.3	COX3	G170G
73	10011T>C	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	0.1	COX3	V171A
74	10027C>T	C	T	C	C	C	T	T	C	C	C	0.3	COX3	L176L
75	10210C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	COX3	A237A
76	10379C>T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0.1	ND3	T9T
Num	polymorphism	Sample name										Frequency	Gene	Amino

		Clone-B	S-2	RC2-1	OD2-2	S-3	RC3-1	RC4-2	S-5	OD5-3	OD5-4			acid change
77	10407C>T	C	T	C	C	C	T	T	C	C	C	0.3	ND3	L19F
78	10547T>C	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	0.3	ND3	F65F
79	10550T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	ND3	D66D
80	10610C>T	C	T	C	C	C	T	T	C	C	C	0.3	ND3	T86T
81	10852T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	ND4L	S28S
82	10921C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	ND4L	N51N
83	10943A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5	ND4L	T59A
84	11327G>A	G	A	G	G	G	A	A	G	G	G	0.3	ND4	S90N
85	11357T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	ND4	I100T
86	11419T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	ND4	L121L
87	11466G>A	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	0.1	ND4	W136W
88	11481G>A	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	0.2	ND4	E141E
89	11557A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5	ND4	I167V
90	11634T>C	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	0.3	ND4	N192N
91	11727T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	ND4	A223A
92	11815G>A	G	A	G	G	G	A	A	G	G	G	0.3	ND4	A253T
93	11856G>A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	0.1	ND4	L266L
94	11922C>T	C	T	C	C	C	T	T	C	C	C	0.3	ND4	Y288Y
95	12015T>C	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	0.3	ND4	H319H
96	12136C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	ND4	L360L
97	12159A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	ND4	L367L
98	12198T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	ND4	F380F
99	12246G>A	A	G	G	G	A	G	G	A	A	A	0.5	ND4	M396I
100	12360T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	ND4	N434N
101	12646T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	ND5	F4F
102	13033C>T	C	T	C	C	C	T	T	C	C	C	0.3	ND5	T133T
Num	polymorphism	Sample name										Frequency	Gene	Amino acid change
		Clone-B	S-2	RC2-1	OD2-2	S-3	RC3-1	RC4-2	S-5	OD5-3	OD5-4			
103	13057C>T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	0.1	ND5	F141F
104	13090T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	ND5	F152F
105	13214 A insdel	INS	Del	INS	Del	Del	INS	INS	INS	INS	INS	0.3	ND5	N194T
106	13243C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	ND5	I203I
107	13249G>A	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	0.2	ND5	Q205Q
108	13286T>C	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	0.3	ND5	L218L
109	13591T>C	T	C	T	T	T	C	T	T	T	T	0.2	ND5	I319I
110	13900C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2	ND5	Y422Y
111	14032T>C	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	0.1	ND5	Y466Y
112	14187A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	ND5	N518S
113	14338A>G	G	A	A	A	G	A	A	G	G	G	0.5	ND5	L568L
114	14752G>A	G	A	G	G	G	A	G	G	G	G	0.2	ND6	C(R)105H

115	14760T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	ND6	L(S)108P
116	15098T>C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2	CYTB	D20D
117	15104C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	CYTB	P22P
118	15105G>A	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	0.2	CYTB	A23T
119	15217T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	CYTB	M60T
120	15332A>G	A	G	A	A	A	G	G	A	A	A	0.3	CYTB	V98V
121	15344A>G	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	0.2	CYTB	M102M
122	15479T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	CYTB	T147T
123	15578C>T	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	0.5	CYTB	G180G
124	15590T>C	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	0.3	CYTB	I184I
125	15757T>C	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	0.2	CYTB	M240T
126	15905G>A	G	A	G	G	G	A	A	G	G	G	0.3	CYTB	G289G
127	15949T>C	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	0.1	CYTB	I304T
Num	polymorphism	Sample name										Frequency	Gene	Amino acid change
		Clone-B	S-2	RC2-1	OD2-2	S-3	RC3-1	RC4-2	S-5	OD5-3	OD5-4			
128	16019C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2	CYTB	L327L
129	16117C>T	C	T	C	C	C	T	C	C	C	C	0.2	CYTB	S360L
130	16163T>C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	C	0.5	CYTB	R375R
131	16423C>A	C	A	C	C	C	A	A	C	C	C	0.3		
132	16461C>T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	0.2		
133	16376C>A	C	A	C	C	C	A	A	C	C	C	0.3		
134	16480T>C	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	0.3		
135	16507A>G	A	A	A	A	A	A	G	A	A	.	0.111		
136	16534G>A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	.	0.111		
137	16614G>A	G	G	G	G	G	G	G	A	G	.	0.111		
138	16737G>A	G	A	G	G	G	A	G	G	G	.	0.222		

표8. 미토콘드리아 유전체 genotyping에 사용된 시료 정보

sample name	sample information
Clone-B	체세포 제공고양이 체세포(Clone-B)
S-2	대리모 2 (S-2)
RC2-1	대리모 2에서 출생한 고양이1 (RC2-1)
OD2-2	대리모 2에서 출생한 고양이1 에 난자제공 고양이 조직 (난소)
S-3	대리모 3
RC3-1	대리모 3에서 출생한 고양이1 (RC3-1)
RC4-2	대리모 4에서 출생한 고양이2 (RC4-2)
S-5	대리모 5
OD5-3	대리모 5에서 회수한 태아 조직 1과2 에 난자제공 고양이 조직
OD5-4	대리모 5에서 회수한 태아 조직 1과2 에 난자제공 고양이 조직

(4) 복제 산자와 복제 개체의 미토콘드리아 유전체 D-loop 분석

- ① 1단계에서 실험된 미토콘드리아 유전체 중 polymorphism이 많은 non

coding 영역인 D-loop을 분석하여 복제 산자와 복제 개체에서 미토콘드리아 polymorphism 분석

- ② 분석한 시료는 복제 고양이 (TG-C)와 복제 산자들과 어미 암컷 고양이 F와 G
- ③ 1,2,33,34 primer set이 D-loop에 해당하는 부분이고, 이중 1, 34 primer optimization에 문제가 있어 2,33 primer만 사용
- ④ 2,33 primer로 미토콘드리아 유전체를 분석한 결과, 복제 산자들은 암컷 어미의 미토콘드리아 sequence를 가짐을 확인 (그림12)

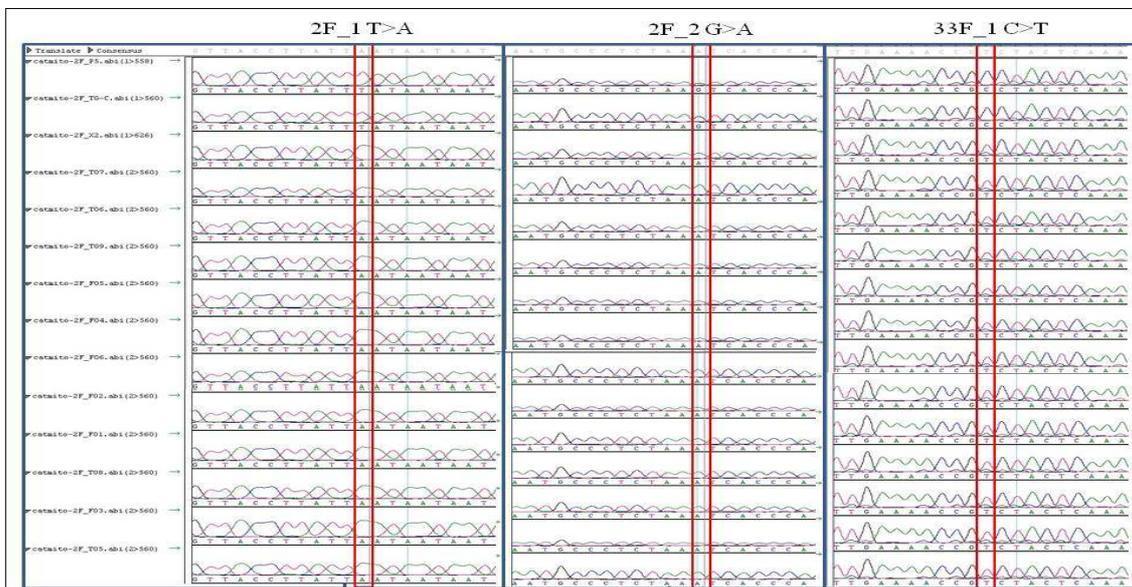


그림 12. TG-C, 암컷 및 복제 산자들 시료로 미토콘드리아 D-loop분석한 결과(I)

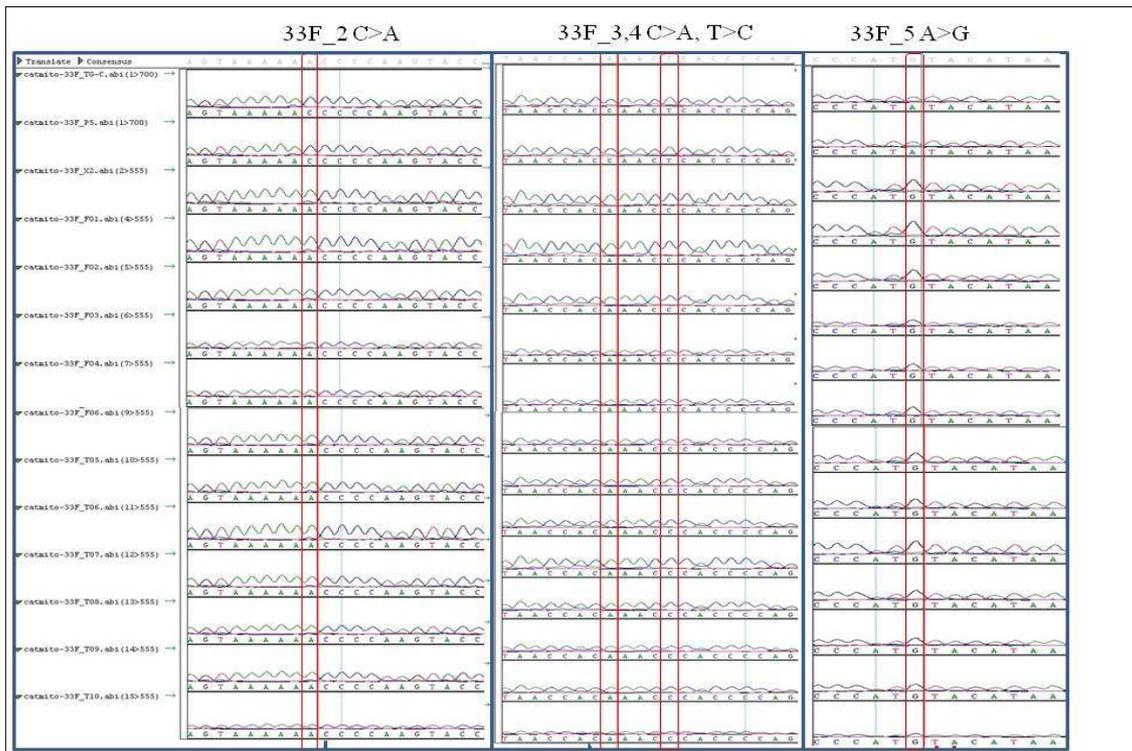


그림 5계속. TG-C, 암컷 및 복제 산자들 시료로 미토콘드리아 D-loop분석한 결과(I)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

본 연구를 통하여 고양이의 cell line을 확보하여 세계 2번째 고양이 복제를 성공을 바탕으로 외래 유용유전자의 조절을 통하여 RFP 형광을 발현하는 형질전환 복제 고양이를 생산하는데 성공하였다. 이와 같은 원천기술의 기반을 마련하는 전기가 되었고, 복제동물 생산 방법에 대한 표준을 제시하였으며 복제동물의 생식능력의 가능성과 유용유전자의 다음세대로의 유전가능성을 확인하여 복제동물의 대량생산이 가능한 방법을 제시하여 세계적으로 복제 강국으로의 자리매김하는데 일조를 하였다.

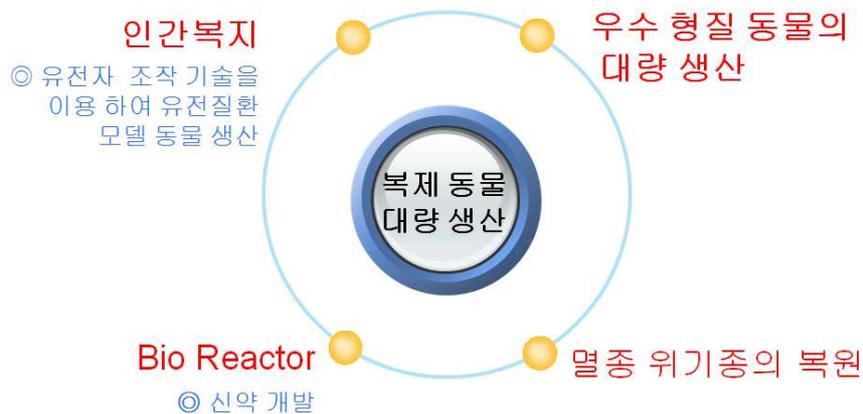
1차 년도에는 수컷 RFP 고양이의 유전자 전이를 일반 대리모와 자연 교배를 통하여 F1 세대로 전달되는 것을 확인하였고, 도나세포의 처리방법에 따른 복제효율 향상하는 방법을 모색하고 호르몬 처리방법에 대한 과배량과 발정동기화의 표준을 제시하였다. 응용연구 측면에선 고양이 줄기세포 특이 마커를 완성하고 검증하였으며, RFP 임신 45일령 산자의 뇌와 눈에서 망막재생유도 줄기세포의 분리와 분화 특성을 연구하여 그 가능성을 입증하였다. 뿐만아니라 이숙간의 복제 수정란 생산과 체외발달 능력의 향상을 위하여 도나세포에 TSA를 처리하여 그 발달율을 크게 증대시켰다.

2차 년도에는 RFP 형질전환 복제고양이의 계통구축 및 RFP 고양이 대량생산을 위한 방안으로 RFP 형질전환 고양이와 일반대리모의 자연교배를 통하여 RFP의 형질이 다음세대로의 유전 및 생식능력을 검증하여 10마리의 F1을 생산하여 RFP 형광고양이 5마리를 확보하였다. 응용연구를 위하여 줄기세포 특이마크 6종 (POU5F1, Nanog, Sox2, Lin28, KLF4, Myc-A, Myc-B)를 cloning 하였다. RFP 형질전환 중간엽줄기세포의 분화 가능성을 조사하여 조골세포, 지방세포 그리고 연골세포로 분화가능성을 확인 하였다. 복제 효율을 향상시킬 방안으로 복제동물 생산할 때 태반에서 발현되는 이상단백질을 프로테오믹스를 이용하여 동정하였다. 뿐만아니라 외래유전자가 삽입된 vector를 도나세포에 접종하여 외래유전자 조절을 가능하게 하였다.

3차 년도에는 RFP 형질전환 복제고양이에서 F1 산자 생산을 지속적으로 실시하여 10두의 F1의 산자를 추가적으로 생산하였고, RFP 수컷 2마리와 RFP 암컷 3마리를 확보를 하였다. 뿐만아니라 F1의 성성숙이 시작되어 자연교배를 하여 F2 산자 2마리를 확보하였으며 RFP 형광을 확인한 결과 RFP는 발현되지 않았다. RFP 고양이의 응용연구를 위하여 이종간 (rat) 선조체에 RFP-MSCs를 이식하여 신경관련 세포로의 분화를 검증하여 6주간은 β

III-tubulin, NF-M, GFAP 그리고 MOSP의 마커를 이용하여 MDCs의 생존과 분화를 확인하였다. 그 결과 2~3주간은 세포가 증식 분화하여 neuron, astrocyte 그리고 oligodendrocyte로 분화되는 것을 확인할 수 있었으며, 4~6주간은 그 수가 줄어들어 6주때는 완전히 사라지는 것을 확인하였다. 이로써 RFP 형질전환 고양이의 MSCs가 이종간 이식을 통하여 증식 분화가 가능함을 검증하였다. 그리고 복제고양이 생산 및 이속간의 복제동물을 생산하기 위한 방안으로 HVJ-E를 통한 fusion 방법을 이용하여 체외 및 체내 수정란의 발달 가능성을 제시하였다. 복제동물 생산시 이민 초기의 유산이나 사산의 이유를 밝히기 위해서 초기 임신기간인 21일경에 복제태반을 회수하여 츠로테오믹스 기술을 기반으로 이상발현되는 단백질을 분석한 결과 혈관형성과 관련된 단백질의 이상발현을 확인할 수 있었으며 그결과 환경적 스트레스 지표를 나타내는 단백질과 세포사와 관련된 단백질들의 발현을 동정할 수 있었다. 이런 문제점을 해결한다면 복제동물의 생산성의 향상을 기대할 수 있을 것으로 예상된다. 마지막으로 형질전환 복제고양이의 유전자원 보존을 위한 동결정액 제조기술을 개발하여 RFP의 유전 형질을 보존하므로써 필요시 언제든지 사용 가능하며 안전하게 보존하여 연구할 수 있는 가능성을 제시하였다.

이상의 연구결과에서 고양이— 체세포 복제기술의 정립으로 복제고양이, 계대복제고양이 및 형질전환 복제고양이를 생산할 수 있는 기반 기술을 확보하였다. 이러한 원천 기반기술은 이종간장기이식, 질환모델동물 생산, 반려동물 생산 및 멸종위기종의 복제·복원등의 관련 분야의 연구 및 산업화에 크게 기여할 것으로 판단된다.



본 연구팀에서 생산한 RFP 형질전환 복제고양이는 국내·외 큰 관심과 언론의 주목을 받았고, 형질전환 복제고양이를 이용한 다양한 응용연구에 활용하고자 외국의 HIV-cloned cat 생산 연구 등을 공동으로 수행하고자 하며, 형질전환 고양이 자체가 특허출현원이 되어있으며 이를 애완동물 산업화로 발전할 수 있는 토대를 마련하였다.

*** 상기 내용 기술 이후, 다음의 내용을 포함**

(1) 연구개발의 최종목표

본 연구를 통하여 체세포복제기술과 형질전환 복제고양, 개의 생산 기반기술을 확립하고, 복제동물의 초기발생과정을 규명하여 복제동물의 정확한 검증과 안전성 평가를 통하여 정확한 복제기술의 방향을 제시하여 미개척복제동물에 대한 복제가능성을 제시하고 다양한 유용유전자를 도입하여 유용물질을 생산하는 복제 동물을 생산하여 인류복지 개선과 멸종위기종의 복원이 이번 연구의 최종 목표이다.

(2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

※ (1)과 (2)의 내용은 반드시 선정연도 협약용 연구계획서에 기재된 것 이어야 함.

[제1세부]

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	암컷 RFP 고양이 생산 및 숫컷 RFP 고양이의 유전자 전이 확인 검증	F1고양이 생산, 유전자 검증 확인, 핵형분석 및 FISH 방법 정립
	복제효율 향상 연구	도나세포 처리방법에 따른 복제효율 향상 (BL 25% 이상)
		과배란 및 발정동기화 최적화 구축
	Tetracycline RFP 유전자의 발현을 조절할 수 있는 virus vector의 구축	Vector의 cloning 여부
	형질전환 체세포 복제란 생산 연구	형질전환 복제란 체세포 핵이식 조건 제시
		세포융합 조건 도출
		형질전환 복제란 활성화 방법 연구
		형질전환 복제란 검증 평가
2차년도	RFP 고양이 계통구축	퇴교배에 의한 F2 산자 생산
	RFP 고양이 이용한 응용연구	고양이줄기세포 특이마크(4-6개)건립
		망막재생 국제공동연구 체계구축으로 기술 확보

		이중간 MSCs 이식에 의한 신경분화 유도
	복제효율 향상 연구	도나처리 방법에 따른 산자생산 효율 검증
	선정된 vector가 도입된 세포를 형질 전환 복제 동물의 생산에 활용	Tetracycline에 의한 RFP 유전자 발현의 제어 정도 발현유도 조건 하에서 RFP 유전자의 발현 정도
	이속간 복제수정란 생산 효율 연구	체내/외 발달능력 향상 연구
3차년도	RFP 고양이 계통구축 완성	RFP발현 암/수고양이 각 100두씩 확보 및 유지관리
	RFP 고양이의 응용연구에 적극적 활용	망막세포 재생유도기술 정립 고양이 줄기세포마크 활용한 응용 연구
	복제효율 향상 연구	복제수정란 체외발생능의 획기적 개선(BL 30% 이상)
	생산된 RFP 형질전환 복제동물의 분자생물학적, 생물학적 안정성 검증	RFP 유전자의 염색체내 안정적인 삽입과 copy 수 확인 여부
		RFP 유전자의 발현을 분자생물학적 확인 생산된 복제동물로부터 recombination에 의해 wild type virus가 생성되지 않음을 확인
이속간 복제수정란의 이식에 의한 산자생산 유도	이속, 이아과간 복제수정란의 체내발달을 조사	

[제2세부]

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
4차년도	개 와 고양이의 초기 발생 기전 규명 및 체외성숙방법 개발	체내와 체외 수정된 배아의 미세소관과 microfilament의 변화에 대한 연구.
		성장인자 및 cytokine 의 첨가에 의한 체외 발생을 조사
5차년도	개 와 고양이 체외수정 / 체외 배양방법 개발	미성숙란의 배양기간이 체외수정란의 전핵 형성에 미치는 영향조사
		기본 배양액 및 단백질 첨가 (Omics 기술에서 밝혀진) 에 의한 체외 발달을 조사
5차년도	고양이 Trophoectoderm / 줄기세포 line 건립	고양이 Trophoectoderm / 줄기세포 배양
	개 Trophoectoderm/ 줄기세포line 건립	복제 및 수정된 고양이 난자의 발생과정 규

	립	명
6차년도	고양이 복제란의 미세소관과 microfilament의 변화 및 reprogramming / remodeling에 대한 조사	고양이의 난자에 표범 또는 샴의 체세포를 핵이식한 복제란의 미세소관과 microfilament의 변화
	개 복제란의 미세소관과 microfilament의 변화 및 reprogramming / remodeling에 대한 조사	고양이의 난자에 표범 또는 샴의 체세포를 핵이식한 복제란의 reprogramming / remodeling

[제3세부]

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	체세포 유전자 적중	리포터 유전자 도입 세포주 생산
		질환관련 유전자 녹아웃 또는 녹인 (Knock-out, or in) 세포주 개발
		성체 및 태아 체세포의 비교 연구
	형질전환 체세포 복제란 생산 연구	형질전환 복제란 체세포 핵이식 조건 제시
		세포융합 조건 도출
		형질전환 복제란 활성화 방법 연구
소형품종 개 복제생산 연구	형질전환 복제란 검증 평가	
	소형품종 개 체세포 확보 및 복제연구	
2차년도	형질전환 복제 개 생산	소형품종 개 복제란 이식 및 임신모니터링
		작성된 cell-line을 이용한 transgenic cloned dog 생산가능성 여부
		형질전환 복제란 이식
	개과동물의 체세포 복제 생산 기술 향상	형질전환 복제란 이식 대리모 임신유지 관리
		세포처리에 따른 세포주기 동기화 연구
		체세포복제 효율증진 연구
	형질전환 복제 검증 연구	여러종류의 공여세포의 체세포핵이식 비교 연구
		형질전환 초기 착상 태아체의 분석
3차년도	형질전환 복제 개 실용화 연구	외래유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 GFP 형질전환 복제란 생산 및 이식

		GFP 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 복제 개 생산 및 검증
		질환 모델 복제개로서의 형질 전환 복제개의 산업화 및 실용화 가능성 모색
	줄기세포를 이용한 복제개 생산	지방줄기세포를 이용한 복제수정란 작성
		지방줄기세포를 이용한 복제수정란 이식 및 생산 가능성 타진
	산업적 개과동물의 체세포 복제 생산기술 개발	개 복제를 위한 체세포 핵이식 표준 프로토콜 제시
		개복제를 위한 난자공여견과 대리모의 선정 기준 제시

[제4세부]

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 복제동물 복제여부 확인용 유전적 표지자로 복제 확인 선발된 유전적 표지자의 분석기법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 복제 개체 및 체세포 공여동물, 대리모의 샘플을 비교, 분석함으로써 유전적 이상을 확인하고자 함 복제동물의 복제여부 확인과 유전적 이상을 확인할 수 있는 유전적 표지자를 선별함. microsatellite를 screening하여 고양이 등의 복제여부 확인의 정확성과 신속성 확립 및 유전적 이상 확인
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 선정된 유전적 표지자를 이용한 고양이 등의 복제동물 복제여부 확인 고양이 유전적 표지자를 응용한 고양이과 동물의 분석기법 확립 복제동물의 사양 및 관찰에 의한 질병발생 양상, 행동학적 이상 등 발생 유무 관찰로 선발된 유전부위, 유전자, 미토콘드리아 등의 분석 기법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 복제 고양이 확인을 위해 기 확립된 유전자 표지자를 이용하여 복제 개체의 신속 정확한 복제 유무 확인 및 유전적 이상 유무를 확인. 고양이 이외에 개 등 다른 특수 유용 복제 동물의 유전 표지자 선별 및 실험 방법 확립. 고양이 미토콘드리아 유전체 17kb 전체를 sequencing하기 위해 primer를 제작하고 복제개체들 체세포, 제공 시료, 난자 제공시료 및 대리모 시료들의 미토콘드리아 유전체 분석하여 복제 개체의 유전적인 특성 확인 및 이상 여부 확인
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 체세포 복제 동물 및 재 복제 동물들의 복제 여부 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 복제 개체의 신속 정확한 복제 유무 확인 및 유전적 이상 유무를 확인.

	o 미토콘드리아 염기서열 추가 분석 및 복제동물 간의 비교 정리	o 기 확립된 미토콘드리아 유전체 분석 방법을 이용하여 복제 개체들의 유전적 이상 확인 및 기 실험에서 재확인 및 5개 미토콘드리아 유전자 primer 부분에 대한 보완 실험
--	-------------------------------------	---

(3) 계획대비 달성도(선정시 제시된 연구목표)

[제1세부]

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	복제효율 향상 연구	·도나 처리방법에 따른 복제효율 향상 및 획기적인 개선 (30%~50%) ·HJV-E fusion 방법을 이용한 fusion rate의 향상과 체외발달율의 향상 ·proteomic 기수를 이용하여 복제 고양이가 태반에서 발현되는 유전자 동정 및 표시자로서의 활용방안 제시	100%
2	외래유전자를 이용한 유전자 발현 조절할 수 있는 virus vector 구축	·Tetracycline에 의한 RFP d전자 발현의 제어 ·발현 유도 조건하에서 RFP 유전자 발현 정도 확인	100%
3	RFP 형질전환 복제고양이를 이용한 응용 연구	·고양이 줄기세포 특이마크 6종 cloning (POU5F1, NANOG, SOX2, LIN28, KLF4, MYC-A, MYC-B) ·RFP-F1 45일령의 뇌와 망막에서 망막재생 줄기세포 분리 및 셀라인 구축·검증 ·RFP-MSCs의 분리·배양 및 이종간 이식을 통한 분화 가능성 확인 및 검증	100%
4	RFP 형질전환 복제고양이의 계통구축	· 수컷 RFP 복제고양이의 번식능력 및 RFP 유전자의 삽입지역 FISH로 확인 · RFP 복제고양이와 일반 고양이의	100%

		<p>자연교배에 의한 F1 산자 20마리 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> · 확보된 RFP F1 산자에 대한 유전형질의 분석 및 검증 · 성성숙 된 F1의 번식능력 확인 및 RFP 형질의 전이 검증 · RFP 형질의 보존을 위한 정액동결 방안 제시 및 효율성 검증 	
5	이속간 복제수정란의 생산과 이식에 의한 산자생산을 위한 노력	<ul style="list-style-type: none"> · HJV-E fusion 방법을 이용한 삶 복제 수정란의 발달율을 향상. · TSA 처리를 통한 삶 복제 수정란의 BL 발달율 향상과 셀 수의 유의적인 증가 확인 · 체내배반포와 삶 복제수정란의 ICM 대체법을 이용한 삶 생산에 관한 연구 · 복제기술로 생산한 삶 복제 수정란의 이식을 통한 산자 삶 산자 생산에 대한 연구와 가능성 확인 	100%

[제2세부]

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	개의 초기 발생 기전 규명 및 체외성숙방법 개발	PGF2a의 첨가가 난구세포에 대한 변화 및 난구세포의 영향에 대한 조사 개 발정기 난소의 난포액을 첨가하였을 때 난자의 체외성숙에 미치는 영향	100%
2	고양이 초기 발생 기전 규명	미성숙 난자의 체외배양시 핵의 성숙에 따른 미세소관과 microfilament의 변화 규명	100%
3	고양이 복제수정란의 체외배양방법 개발	TSA가 복제수정란의 발달에 미치는 영향을 규명 TSA가 복제수정란의 세포사멸과 세포사멸 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 규명	100%
4	고양이 난자에 이종간 정자를 주입하였을 때 미세소관 및	자성전핵과 응성전핵의 성숙 정상적인 M-phase 와 2C의 형성	100%

	epigenetic reprogramming / remodeling에 대한 조사	DNA 합성분석 전핵형성시기 정상체의 형성	
5	고양이 정자를 이용한 이종간 배아의 미세소관 및 epigenetic reprogramming / remodeling에 대한 조사	이종간 배아의 발달을 조사 히스톤 단백질의 아세틸화와 메틸화의 변화에 대한 조사 DNA 메틸화의 변화에 대한 조사 M-phase시기 미세소관의 관찰 고양이 염색체의 분석 이종간 배아의 배반포단계에서 유전자의 발현분석	100%

[제3세부]

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	체세포 유전자 적중	RFP를 비글 섬유아세포의 유전자 내에 도입시킨 형질전환 세포주 생산 (Genesis 47(5);314-322)	100
2	형질전환 체세포 복제란 생산 연구	RFP 도입 형질전환 체세포를 이용한 복제란 작성 및 발현 평가, 복제 가능성 확인 (Genesis 47(5);314-322)	100
3	소형품종 개 복제생산 연구	14년령의 토이 푸들 1두 복제 (Theriogenology 69(5);556-563)	100
4	형질전환 복제 개 생산	RFP 도입 형질전환 비글 암컷 5두, 수컷 2두 생산 (Genesis 47(5);314-322)	100
5	개과동물의 체세포 복제 생산 기술 향상 및 산업적 개과동물의 체세포 복제 생산기술 개발	복제 생산 기술 향상을 위한 체세포복제 조건 중 1) fusion 조건 확립 (Theriogenology 75(4);777-782), 2) 체세포에 Roscovitine 처리 조건 확립 (Theriogenology 72(4);461-470), 3) 난자공여견과 대리모 조건 확립 (Theriogenology 74(3);473-478)	100
6	형질전환 복제 검증 연구	RFP 도입된 형질전환 비글에서 RFP 유전자의 삽입 및 형광 발현을 확인 (Genesis 47(5);314-322)	100
7	형질전환 복제 개 실용화 연구	외래유전자의 발현이 유도적으로	100

		조절되는 형질전환 비글 2두 생산 (Genesis, accept)	
8	줄기세포를 이용한 복제개 생산	RFP 도입된 형질전환 비글의 지방조직에서 분리한 줄기세포를 이용하여 비글 2두 생산 (Therigenology, accept)	100

[제4세부]

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	복제 개체 샘플 확보 및 체계적인 보관	o 복제 개체 시료를 다수 확보하고, 부족한 부분을 genomic DNA amplify의 방법으로 확보하고, DNA 시료에 대한 지속적인 follow-up을 통하여 복제동물의 분석 자료를 체계적으로 관리함	100
2	복제 확인 유전적 표지자들 분석 기법 재확립	o 기확립된 유전자 표지자 중 FAC224에서 비특이적 PEAK이 나타나는 문제를 여러 가지 PRIMER를 재합성 실험을 통해 기존과 같은 결과는 내는 조건 확립함	100
3	복제 개체들의 복제 여부를 신속 정확하게 확인 및 복제 개체의 유전적 이상 유무 확인	o RFP TG cat, 대리모 시료 및 복제 개체의 조직 및 세포에서 기확립된 고양이 유전자 표지자를 이용하여 복제 여부 확인 결과 정확하게 RFP TG cat의 유전자 표지자와 일치함을 확인 TG-C, 암컷 시료 및 복제 산자의 귀 또는 꼬리 조직에서 기확립된 고양이 유전자 표지자를 이용하여 복제 산자들을 분석한 결과 9개 표지자에서 정확하게 친자로 확인됨.	100
4	미토콘드리아 유전체 분석 완료 및 복제 동물의 미토콘드리아 분석 및 이상 유무 확인	o 전 단계 실험에서 미토콘드리아 유전체 분석이 완료 되지 않은 5개 부분에 대한 primer를 재합성하여	100

	re-sequencing한 결과, 8개를 추가로 발굴하여 총 138개의 polymorphism을 확인함 o TG-C, 암컷 및 복제 산자의 D-loop region에 대한 sequencing을 진행함. 2, 3 primer set 으로 15개 시료에 대해 분석하였고, 유전적 이상은 없음을 확인함	
--	--	--

※ 선정연도 협약용 계획서에 기재된 최종목표, 연구개발목표, 연구개발 내용 및 범위, 세부연구목표의 변동이 있을시 자세히 기재 요망(승인 여부, 변경 전/후 내용 비교표 등)

(4) 위 연구목표(총연구기간)에서 중요도 순으로 4-5개 목표 추출 및 가중치 부여

[제 1세부]

번호	세부연구목표	가중치
1	RFP 형질전환 복제고양이 재복제 및 유전형질 전이 확인	25%
2	RFP 형질전환 복제고양이 계통 구축	25%
3	복제효율 향상을 위한 연구	15%
4	RFP 형질전환 복제공양이의 응용 연구	15%
5	이속간의 복제수정란의 생산방법 제시 및 산자생산을 위한 연구	20%
계		총 100%

[제 2세부]

번호	세부연구목표	가중치
1	고양이 초기 발생 기전 규명	30%
2	개의 초기 발생 기전 규명 및 체외성숙방법 개발	30%
3	고양이 난자에 이종간 정자를 주입하였을 때 미세소관 및 epigenetic reprogramming / remodeling에 대한 조사	20%
4	고양이 정자를 이용한 이종간 배아의 미세소관 및	20%

	epigenetic reprogramming / remodeling에 대한 조사	
계		총 100%

[제 3세부]

번호	세부연구목표	가중치
1	형질전환 복제 개 생산	35%
2	형질전환 복제 개 실용화 연구	35%
3	줄기세포를 이용한 복제개 생산	10%
4	소형품종 개 복제생산 연구	10%
5	개과동물의 체세포 복제 생산 기술 향상 및 산업적 개과동물의 체세포 복제 생산기술 개발	10%
계		총 100%

[제 4세부]

번호	세부연구목표	가중치
1	복제 개체 샘플 확보 및 체계적인 보관	15
2	복제 개체에서 유전적 이상 유무 확인 및 분석	40
3	유전자표지자의 확립 및 지속적 유지	15
4	고양이 미토콘드리아 유전체 분석을 통한 복제 동물의 유전적 이상 확인 및 특성 연구	30
계		총 100%

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- * 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

1. 추가연구의 필요성

- 비록 체세포 복제고양이와 RFP 형질전환 복제고양이를 생산하는데 성공하였으나 이를 체계적으로 인간의 유전질환 연구용으로 활용하기 위해서는 RFP 유전자의 발현양상과 계통구축 등을 위한 추가연구가 필요하다.
- 이를 위하여 1) 복제효율 향상을 위한 기술개발과, 2) RFP 유전자의 다음세대 전이확인, 3) 계통구축을 위한 암고양이 생산 및 번식육종체계의 구축이 요구되고, 4) 전염성질환을 차단하고 무균상태에서 계통을 구축할 수 있는 체계의 구축이 무엇보다 요구됨.
- 이러한 연구개발에 의한 연구결과물들은 원천기반기술을 위한 특허출원/등록이 가능하며, 국내/외에 licensing을 통해 산업화가 가능할 것이며, 다양한 응용연구에 활용이 가능할 것이다.
- 복제 삶 임신태아의 조기사멸에 관한 원인을 분석하고자 하며 이러한 사멸원인이 이 종간의 분류학적 거리와 관련을 찾고자 한다 즉 고양이와 분류학적 거리로 이속간에 속하는 삶 뿐만 아니라 이아과 에 속하는 호랑이 에 체세포를 이용하여 고양이 난자에 이속간 복제를 실시하여 초기 핵 리모델링이나 고양이 대리모에 이식시 임신 태아의 완성여부 등을 비교 분석하고자 한다.
- 현재의 복제 기술과 분자유전학을 접목시켜 다양한 유용유전자 도입 형질전환 복제 개의 생산을 통해 사람질환 발생 기전에 관한 연구와 유전자 발현 양상 등에 관한 연구의 수행이 필요하다.
- 이를 위하여 1) 체세포 복제 효율이 향상되어야 하며, 2) 체세포 유전자 적중 기술개발이 시급하고, 3) 유용 유전자의 도입 또는 제거한 체세포를 이용한 복제동물의 생산이 효율적으로 이루어질 수 있어야 한다.
- 연구결과로 확립된 기술은 국내외에 원천특허가 가능하며, 생산동물의 특허를 통해 막대한 기술료를 창출할 수 있으며, 신약개발 시장에 적용할 경우 그 경제적 파급효과는 지대할 것으로 기대된다.
- 따라서, 본 연구가 결실을 맺기 위해서는 지속적이고 안정적인 연구 지원이 필수불가결함. 또한 과제의 성격상 연구개발에 중점을 두는 것보다는 체세포복제 기술을 바탕으로 한 원숭이 연구 인프라를 구축하고 산학연 지원 체계를 확립하는 방향으로 목표를 설정해나가는 것이 바람직하다고 사료됨.
-

2. 타 연구에의 응용

- RFP reporter 유전자를 가지고 있는 유사줄기세포 및 중간엽줄기세포의 분리 유도가 가능하기 때문에 줄기세포 연구에 매우 효과적으로 활용할 수 있다. 왜냐하면 red color에 의한 추적이 용이하여 이식 후 발현여부를 red color 발현 여부에 의해 검증이 가능하기 때문이다.
- 고양이과(삿, 표범, 호랑이 등), 개과동물(토종여우 등)의 보호종 및 멸종위기 야생동물들의 복제에 의한 복원을 시도하고, 궁극적으로 생태계복원과 유전자원의 다양성에 기여
- 유전능력이 동일한 복제동물을 이용한 신약 약리활성의 동질성 검토에 활용
- 난자의 체외조작에 의하여 야기되는 각종 질병을 장기간 추적함으로써, 시험관에 의하여 생산된 아기들의 안정성 검토에 활용
- 국내외에 체세포 핵이식으로 동물 복제 성공 사례가 증가하고 있고, 이를 이용한 줄기세포 기술도 빠르게 발전하고 있지만, 복제 동물 및 체세포 핵이식 기술을 이용한 줄기세포의 유전적 이상 유무에 대한 연구는 아직 미비한 실정이므로, 본 연구팀의 복제동물의 유전적 이상 및 특성 확인 결과들은 국내 다른 복제 연구팀의 연구 활성화에 기여할 것임
- 고양이과 동물의 미토콘드리아 유전체 full sequencing 결과 발굴된 133여개의 polymorphis 결과는 향후 진행될 복제 고양이의 미토콘드리아 분석 연구에 이용 가능하고, 고양이 복제를 연구하는 다른 연구단체에도 유용한 자료로 활용될 것임
- Telomere length 측정하여 복제 동물과 control과 비교한 결과는 향후 복제 동물의 수명과의 연관성 여부를 확인하는 자료로 활용될 것이며, 다른 복제 연구 분야에도 적용 가능할 것임
- 개의 체세포 복제연구를 통해 개뿐만이 아니라 포유동물의 생명현상에 관한 연구가 가능하며, 유용동물의 자원 확보가 용이하다. 또한 형질전환 복제개를 체세포 복제로 생산할 경우 신약개발에 매우 유용하게 응용할 수 있으며, 유전자자적중기술을 통해 유전자의 기능, Proteomics, Phenomics 등의 연구에 응용이 가능하다.

3. 기업화 추진방안

- RFP 고양이에 대한 특허권 licensing으로 반려동물 산업화를 추진하고자 하는 기업이 있으나 아직까지 결론에 이르지 못하고 있는 상태임. 그러나 현재 미국에서는 hypo-allergy 고양이의 산업화 등에 대한 관심과 실제 애완고양이의 복제고양이 생산 등에 관한 산업화가 많이 진행되고 있는 실정임
- RFP 형질전환 복제고양이의 계통구축이 가능하고 다양한 질환모델고양이의 생

산기술이 정립되어 의약관련 복제고양이의 산업화는 국내/외에서 충분한 가능성을 가지고 있다고 판단되어 관련 기업에 기술이전 및 학교기업(GAST) 등으로 산업화가 가능할 것임

- 복제 동물에서 발현되는 특이 유전자 및 유전적 이상 부위 영역을 체계적으로 정리하여, 복제 동물에서 검사하여 복제 동물 산업화에 이용하면 막대한 부가가치를 창출 할 수 있으리라 사료됨
- 복제 동물의 유전적 특성 및 이상 연구를 통한 복제동물의 노화, 종양발생률 증가의 원인 및 체세포 핵이식에 의해 생성된 줄기세포의 안전성 확인 등의 기술은 인간 난치병 치료가 가능한 줄기세포의 연구 분야에도 기술적 기반이 되어 국가적인 경쟁을 키울 수 있을 것임
- 형질전환 질병모델개의 생산이 가능할 경우 의약관련 개 복제 산업분야를 개척하여 국내에 새로운 산업을 창출하고 전 세계를 상대로 고부가가치산업으로 육성 가능성이 가능할 것으로 기대되므로 학교기업, 기술이전 등으로 산업화 및 실용화에 점진적으로 접근할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 고양이를 이용한 실험동물로서의 활용을 위하여 cat genome sequence 관련 정보가 반드시 필요하였는데 Pontius 등 (2007)이 고양이 중요한 genome sequence를 밝힌 논문을 발표하였다. 그 논문에서 고양이는 인간의 유전질환과 유사한 유전자가 약 250여종으로 보고하였다. 또한 OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals)에서는 인간의 유전질환모델로 가능성이 있는 유전자가 133개로 발표하였음.
- 미국을 중심으로 복제애완동물생산의 사업화를 추진하고 있음. 예를들면, Allerca Inc. 회사는 2006년부터 자연적인 변종으로부터 Hypo-Allergenic cat을 번식육종시켜 공급하고 있으며 궁극적으로 Allergy-free cat을 복제생산하여 사업화를 목적으로 하고 있다.
- 현재 국내에서 발견되는 삶의 분류를 보면 *Prionailurus bengalensis* 종으로, 식육목 고양이과 삶속에 속한다. 삶의 특징은 눈 위, 코로부터 이마 양쪽에 흰 무늬가 확실히 나타나 있다. 머리의 색체에 있어서 코의 상부는 회색의 흑갈색의 2개의 종선이 있으며 종선에 연결하여 흰 줄도 있다. 현재 삶은 국내 환경부 지정 멸종위기Ⅱ급으로 지정되어 있으며, 워싱턴협약 CITES (Washington Convention/Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)]협약대상 종으로 세계적으로도 보호 받고 있는 동물이다.
- 2008년 Li 등은 비정상적 reprogramming된 체세포 복제 소에서 배아 발달과 기관 분화 관련 유전자 (*b-actin*, *VEGF*, *oct4*, *TERT*, *H19* and *Igf*) 유전자 및 DNA methylation에 이상이 발견되었다고 보고함
- 2004년 Li 등은 체세포 복제 소에서 배아 발달과 기관 분화와 관계된 8개 (PCAF, *Xist*, *FGFR2*, *PDGFRa*, *FGF10*, *BMP4*, *Hsp70.1*, *VEGF*) 유전자를 조사한 결과 유전자 발현 양상의 이상이 발견되었다고 보고함
- 2003년 Han 등은 체세포 복제 배아에서 공여 체세포 핵의 재발생 단계에서 DNA methylation 양상의 차이가 관찰되었다고 보고함
- 2004년 Schaetzlein 등은 쥐와 소의 배아연구에서 세포의 노화와 관련된 telomere는 초기 배아단계에서 배아 발생과 관계되며 telomerase의 활성이 이를 결정한다고 보고, 또한, telomere 길이는 초기 blastocyst의 상실 배단계인 morula 단계에서 reset된다고 보고함
- 현재 체세포 복제는 국내외적으로 활발히 연구되고 있고, 유전적 표지자를 이용한 복제동물의 확인 방법 시도되고 있으나, 고양이, 개 등의 동물을 대량 복제하고 복제동물의 복제여부 확인 및 분석은 세계 최초로 시도되는 것임
- 고양이, 개 등의 유전적 표지자는 현재 해외 연구결과인 유전자 정보 DB, 논문 등의 자료를 통해 확보 가능함. 국내의 고양이, 개 등의 유전적 표지자 개발은 미비한 실정이나 기존 발굴된 유전적 표지자의 활용으로 복제동물의 복제여부 확인은 충분히 가능할 것임
- 유전적 이상, 염색체 변이 등의 복제동물이 지닌 문제점 등을 연구하여 빠른 노화, 중앙

발생확률 증가 등의 이상원인을 규명하는 국외 연구결과가 있으나, 소수의 복제 동물을 대상으로 하는 연구이므로 본 연구의 대량 복제와 이를 이용한 복제동물의 유전적 이상 분석은 세계 최초로 시도되는 것이며, 복제동물을 이용한 통계분석 또한 가능할 것임

- 미국 생명과학산업협회(www.bio.org)에 따르면 지난해 40개 주정부들이 생명과학을 주 경제를 개발할 수 있는 중추 산업으로 지정했다. 특히 플로리다주 5억 달러, 애리조나주 4억 4천만 달러 등 주정부들이 생명과학기업을 유치하기 위해 투자를 증액했으며 개인 벤처캐피탈의 경우 세금 감면 혜택을 부여하고 있음
- 미국의 경우 상업적 애완동물 복제에 소비자가 최소 5만 달러에서 최대 500만 달러 정도의 비용을 지불하고 있음
- 염기서열 분석 및 유전적 표지자 분석 등의 사업은 세계적으로 투자 규모가 증가하는 추세임
- 계놈지도를 발표한 셀레라사의 유료서비스는 올해 약 1억 달러 정도의 수익을 올릴 수 있을 것으로 전망
- 멸종 위기 동물의 복원 연구 분야에서는 국내와 마찬가지로 해외에서도 지속적인 연구가 진행되고 있으며, 꾸준히 결과가 보고되고 있다. 2005년 중국의 Li 등이 멸종 위기 동물인 takin (*Budorcas taxicolor*)의 체세포를 이용하여 소의 난자에 이종간 핵이식을 통해 복제 연구를 수행하였으며, 미국의 Sansinena 등이 소의 난자에 이종간 핵이식을 통해 멸종위기에 처한 Banteng (*Bos javanicus*)의 배아 형성과 임신 성공을 보고하였다. 2006년에는 미국 그룹에서 Li 등이 Domestic ferret (*Mustela putorius furo*)에서의 배아이식과 관련 멸종위기 동물의 응용 복원연구 결과를 보고하였다.
- 반려 동물의 체외 배양에 관한 연구 분야는, 특히 개의 경우 번식 생리의 특성상 아직도 미개척 분야로 남아있기 때문에, 세계적으로 왕성한 연구가 진행되고 있다. 2006년 이탈리아의 Luvoni GC 등이 개과 동물 난자의 체외성숙을 위한 배양 방법을 연구하는 한편, 개와 고양이 난자의 발달 연구에서 최근 진보된 점에 대해 정리하였다. 미국의 Bolamba는 Epidermal growth factor(EGF) 등은 2006년 다양한 호르몬의 첨가가 개 난자의 체외성숙에 미치는 영향에 대해 연구하여 보고하였다. 최근 2007년 Rodriques 등이 신선하고 냉각된 동일종의 정액으로 수정된 개 난자의 시험관 내 난할에 미치는 성숙 배지의 영향에 대해 연구하였고, 캐나다 그룹에서는 Songsasen 등이 pyruvate와 glutamine가 개 난자의 체외 성숙에 미치는 영향에 대해 연구하였다.
- 최근 복제동물에서의 미토콘드리아 DNA 연구는 2005년 St John JC 등이 중북핵이식란 으로부터 mtDNA가 어떻게 자손에게 전달되는지를 밝히는 연구를 수행하였고, Jiang Y등도 2006년에 핵이식 이후 공여세포의 mtDNA의 존재여부를 확인한 결과를 보고하였다. Takeda K등은 2006년에 복제돼지에서, 같은 해 Li Y등은 이종간의 핵이식에서 mtDNA에 관한 연구를 수행하였다.

- 돼지에서는 2006년 Lavitrano 등이 Sperm-mediated gene transfer (SMGT)를 이용해 multigene transgenic pig 연구를 보고하였고, 같은 해에 Chen 등은 hDAF transgenic pig의 신장을 baboon에 이식하는 연구를 수행하였다. P347L 또는 P347S rhodopsin을 발현하는 transgenic pig을 이용해 망막의 변성에 관해 연구한 논문은 2005년 Kraft 등에 의해 발표되었다. 앞선 2005년에는 Monaco 등이 insulin-like growth factor-I (IGF-I)를 유전 특이적으로 과 발현 시킨 형질전환 돼지연구를 수행한 바 있다. 형질전환 소에 대한 연구로는 Donovan 등이 2005년 유선상피세포에 lysostaphin을 발현하며 항 미생물 단백질을 우유 중으로 발현하는 유전자 적중 젖소를 생산하였고, 같은 해에 Fecteau등이 유전자 적중된 복제 송아지의 초기 care에 대해 연구하였다. 또, Wall RJ 등이 2005년 Nature Biotechnology 학술지에 유전자 적중을 통하여 Staphylococcus aureus에 의한 유방염 저항소에 대해 연구한 결과를 보고하였다.
- 그밖에 형질전환 동물에 관한 연구는 그 용이성 때문에 마우스에서 가장 활발하게 이루어지고 있으나, 마우스는 사람과 유전적, 생리적으로 차이가 크다는 단점이 있다. 따라서, 임상목적의 질병 기전연구나 치료연구에 응용하기 위해, 비설치 동물의 형질전환 연구가 필요한 상황이다. 특히, 개와 고양이는 인간의 질병과 유사성이 높은 동물일 뿐 아니라, 유전적으로도 가깝고, 지능이 높고 사람과 친숙하여 실험동물로 다루기 수월한점 등 여러 가지 장점이 있다. 그러나 해외에서는 아직 해당 동물의 복제 기술이 국내를 따라오지 못하는 상황이기 때문에, 개나 고양이를 이용한 복제 형질전환 연구는 거의 보고 되지 않고 있다.
- 마지막으로, 본 연구팀의 주요한 기술이자 본 연구의 기반기술인 개의 체세포 복제 분야는 전 세계적으로 많은 관심을 가지고 있지만, 2005년 본 연구팀이 세계 최초로 복제 개 스너피의 생산을 Nature지에 발표한 이후로, 현재까지도 해외에서는 성공사례가 보고 되지 않고 있다.

제 7 장 참고문헌

* 보고서 작성시 인용된 모든 참고 문헌을 열거한다

Bhuiyan MM, Kang SK, Lee BC., Effects of fructose supplementation in chemically defined protein-free medium on development of bovine in vitro fertilized embryos, *Anim Reprod Sci.*, 2007, 102(1-2) : 137-44.

Bhuiyan MM, Kang SK, Lee BC., Supplementation of fructose in chemically defined protein-free medium enhances the in vitro development of bovine transgenic cloned embryos, *Zygote*, 2007, 15(3) : 189-98.

Bolamba D, Russ KD, Harper SA, Sandler JL, Durrant BS., Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro., *Theriogenology*. 2006 Apr 1;65(6):1037-47. Epub 2005 Sep 15.

Brem G, Besenfelder U, Aigner B, Muller M, Liebl I, Schutz G, Montoliu L., YAC transgenesis in farm animals: rescue of albinism in rabbits., *Mol Reprod Dev*. 1996 May;44(1):56-62.

Chen G, Sun H, Yang H, Kubelik D, Garcia B, Luo Y, Xiang Y, Qian A, Copeman L, Liu W, Cardella CJ, Wang W, Xiong Y, Wall W, White DJ, Zhong R., The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy., *Transplantation*. 2006 Jan 27;81(2):273-83.

Cho SJ, Yin XJ, Choi E, Lee HS, Bae I, Han HS, Yee ST, Kim NH, Kong IK. DNA methylation status in somatic and placenta cells of cloned cats. *Cloning Stem Cells* 2007; 9: 477-484.

Cho SJ, Bang JI, Yu XF, Lee YS, Kim JH, Jeon JT, Yee ST, Kong IK. Generation of a recloned transgenic cat expressing red fluorescence protein. *Theriogenology*. 2010 Apr 15;73(7):848-55.

Comizzoli P, Wildt D, Pukazhenthi B. In vitro development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. *Theriogenology*, Volume 66, Issue 6-7, Pages 1659-1663

Counter CM., Avilion AA., LeFeuvre CE., Stewart NG., Greider CW., Harley CB., Bacchetti S. (1992) *EMBO J.* 11(5), 1921-9. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which

express telomerase activity.

- Cui XS, Jin YX, Shen XH, Lee JY, Lee HS, Yin XJ, Kong IK, Kim NH.
Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. *Theriogenology* 2006; 66: 267-274.
- De los Reyes M, de Lange J, Miranda P, Palominos J, Barros C., Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes., *Theriogenology*. 2005 Jul 1;64(1):1-11. Epub 2004 Dec 19.
- Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memilli E, McKusick B, et al. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod* 1999;60:1496-502.
- Dominko T, Ramalho-Santos J, Chan A, Moreno RD, Luetjens CM, Simerly C, Hewitson L, Takahashi D, Martinovich C, White JM, Schatten G., Optimization strategies for production of mammalian embryos by nuclear transfer., *Cloning*, 1999;1(3):143-5
- Donovan DM, Kerr DE, Wall RJ., Engineering disease resistant cattle., *Transgenic Res*. 2005 Oct;14(5):563-7.
- Eaves AC, Bamett MJ, Ponchio L, Cashman JD, Petzer AL, Eaves CJ. Differences between normal and CML stem cells: potential targets for clinical exploitation. *Stem Cells*. 1998. 16(suppl. 1):77-83.
- Fecteau ME, Palmer JE, Wilkins PA., Neonatal care of high-risk cloned and transgenic calves., *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2005 Nov;21(3):637-53, vi.
- Felidae. <http://en.wikipedia.org/wiki/felidae>.
- Fischer KM., Transgenic domestic animals provide an animal model for rheumatoid arthritis., *Med Hypotheses*. 1992 Jul;38(3):240-3
- Gomez MC, Jenkins JA, Giraldo A, Harris RF, King A, Dresser BL, et al. Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol Reprod* 2003;69:1032-41.
- Gomez MC, Jenkins JA, Giraldo A, Harris RF, King A, Dresser BL, Pope CE., Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes., *Biol Reprod*. 2003 Sep;69(3):1032-41. Epub 2003 May 28
- Gomez MC, Pope CE, Dresser BL. Nuclear transfer in cats and its application.

- Theriogenology 2006; 66: 72-81.
- Gomez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL., Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats., Cloning Stem Cells. 2004;6(3):247-58.
- Gomez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, et al. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. Cloning & Stem Cells 2004;6:247-58.
- Gupta N, Taneja R, Pandey A, Mukesh M, Singh H, Gupta SC. (2007) Cell Biol Int. Oct;31(10):1257-64. Epub 2007 May 21. Replicative senescence, telomere shortening and cell proliferation rate in Gaddi goat's skin fibroblast cell line.
- Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. (1992) Exp Gerontol. 27(4), 375-82. The telomere hypothesis of cellular aging.
- Hewitt DA, England GC, Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches, J Reprod Fertil Suppl. 1997;51:83-91
- Hishinuma M, Sekine J., Influence of theophylline supplementation on oocyte penetration of canine epididymal spermatozoa., J Vet Med Sci. 2004 Nov;66(11):1417-9.
- Hong SG, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Park JE, Kang JT, Koo OJ, Kim T, Kwon MS, Koo BC, Ra JC, Kim DY, Ko C, Lee BC., Generation of red fluorescent protein transgenic dogs., Genesis. 2009 May;47(5):314-22.
- Hossein MS, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Koo O, Kim JJ, Kang SK, Lee BC, Hwang WS., Effects of thiol compounds on in vitro maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages, Mol Reprod Dev., 2007, 74(9) : 1213-20.
- Hwa J. Lim, Jung S. Cho, Jae H. Oh, Sun B. Shim, Dae Y. Hwang, Seung W. Jee, Su H. Lee, Yhun Y. Sheen, Seok H. Lee, Yong K. Kim, NSE-controlled carboxy-terminus of APP gene over-expressing in transgenic mice induces altered expressions in behavior, A β -42, and GSK3 β binding proteins
- Jang G, Kim MK, Oh HJ, Hossein MS, Fibrianto YH, Hong SG, Park JE, Kim JJ, Kim HJ, Kang SK, Kim DY, Lee BC., Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer., Theriogenology. 2007 Mar 15;67(5):941-7.
- Jang G, Hong SG, Oh HJ, Kim MK, Park JE, Kim HJ, Kim DY, Lee BC, A

- cloned toy poodle produced from somatic cells derived from an aged female dog., *Theriogenology*. 2008 Mar 15;69(5):556-63.
- Jang G, Oh HJ, Kim MK, Fibrianto YH, Hossein MS, Kim HJ, Kim JJ, Hong SG, Park JE, Kang SK, Lee BC. Improvement of canine somatic cell nuclear transfer procedure, *Theriogenology*, 69(2) : 146-54.
- Jang G, Hong S, Kang J, Park J, Oh H, Park C, Ha J, Kim D, Kim M, Lee B., Conservation of the Sapsaree (*Canis familiaris*), a Korean Natural Monument, using somatic cell nuclear transfer., *J Vet Med Sci*. 2009 Sep;71(9):1217-20.
- Jeon HY, Hyun SH, Lee GS, Kim HS, Kim S, Jeong YW, Kang SK, Lee BC, Han JY, Ahn C, Hwang WS. (2005) *Mol Reprod Dev*. Jul;71(3):315-20. The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows.
- Jin GZ, Yin XJ, Yu XF, Cho SJ, Lee HS, Lee HJ, Kong IK. Enhanced tyrosine hydroxylase expression in PC12 cells co-cultured with feline mesenchymal stem cells. *J Vet Sci* 2007; 8: 377-382.
- Jin GZ, Yin XJ, Yu XF, Cho SJ, Choi EG, Lee YS, Jeon JT, Yee ST, Kong IK. Generation of neuronal-like cells from umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells of a RFP-transgenic cloned cat. *J Vet Med Sci*. 2008 Jul;70(7):723-6.
- Jin YX, Lee HS, Yin XJ, Cui XS, Kong IK, Kim NH. Chromatin, microtubule and microfilament configurations in the canine oocyte. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 849-856.
- Joan U. Pontius, James C. Mullikin, Douglas R. Smith, Agencourt Sequencing Team, Kerstin Lindblad-Toh, Sante Gnerre, Michele Clamp, Jean Chang, Robert Stephens, Beena Neelam, Natalia Volfovsky, Alejandro A. Schäffer, Richa Agarwala, Kristina Narfström, William J. Murphy, Urs Giger, Alfred L. Roca, Agostinho Antunes, Marilyn Menotti-Raymond, Naoya Yuhki, Jill Pecon-Slattey, Warren E. Johnson, Guillaume Bourque, Glenn Tesler, NISC Comparative Sequencing Program, and Stephen J. O'Brien. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Research* 2007; 17:1675-1689.
- Kang YK, Yeo S, Kim SH, Koo DB, Park JS, Wee G, Han JS, Oh KB, Lee KK, Han YM. (2003) *Mol Reprod Dev*. Sep;66(1):32-7. Precise recapitulation of methylation change in early cloned embryos.
- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS., Effect of beta-mercaptoethanol or epidermal growth factor

- supplementation on in vitro maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle., *J Vet Sci.* 2004 Sep;5(3):253-8.
- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS., Effects of estradiol-17beta and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes., *Theriogenology.* 2005 Mar 15;63(5):1342-53.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC., Endangered wolves cloned from adult somatic cells, *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(1) : 130-7.
- Kraft TW, Allen D, Petters RM, Hao Y, Peng YW, Wong F., Altered light responses of single rod photoreceptors in transgenic pigs expressing P347L or P347S rhodopsin., *Mol Vis.* 2005 Dec 31;11:1246-56.
- Kushi A, Sasai H, Koizumi H, Takeda N, Yokoyama M, Nakamura M. 1998. Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:15659-15664
- Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, et al. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2000;2:79-90.
- Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P, Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer., *Cloning.* 2000;2(2):79-90.
- Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, Giovannoni R, Manzini S, Vargiolu A., Sperm-mediated gene transfer., *Reprod Fertil Dev.* 2006;18(1-2):19-23.
- Lee B, Wirtu GG, Damiani P, Pope E, Dresser BL, Hwang W, Bavister BD., Blastocyst development after intergeneric nuclear transfer of mountain bongo antelope somatic cells into bovine oocytes., *Cloning Stem Cells.* 2003;5(1):25-33.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. 2005. *Nature*25;436(7054):641,970. Simerly C, Navara C, Hyun SH, Lee BC, Kang SK, Capuano S, Gosman G, Dominko T, Chong KY, Compton D, Hwang WS, Schatten G. Embryogenesis and blastocyst development after somatic cell nuclear transfer in nonhuman primates: overcoming defects caused by meiotic spindle extraction. *Dev Biol.*, 2004. 15:276(2):237-235.

- Lee HS, Seo YI, Yin XJ, Cho SG, Lee SS, Kim NH, Cho SK, Kong IK. Effect of follicle stimulation hormone and luteinizing hormone on cumulus cell expansion and in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2007; 42: 561-565.
- Lee HS, Yu XF, Bang JI, Cho SJ, Deb GK, Kim BW, Kong IK. Enhanced histone acetylation in somatic cells induced by a histone deacetylase inhibitor improved inter-generic cloned leopard cat blastocysts. *Theriogenology*. 2010 Nov;74(8):1439-49.
- Li JS, Han ZM, Zhu ZY, Wen DC, Liu ZH, Wang MK, Lian L, Du J, Wang PY, Zhang HM, Chen da Y., Interspecies nuclear transfer using nonquiescent somatic cell, *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*. 2002 Mar;35(1):62-5
- Li Y, Dai Y, Du W, Zhao C, Wang H, Wang L, Li R, Liu Y, Wan R, Li N., Cloned endangered species takin (*Budorcas taxicolor*) by inter-species nuclear transfer and comparison of the blastocyst development with yak (*Bos grunniens*) and bovine., *Mol Reprod Dev*. 2006 Feb;73(2):189-95.
- Li Z, Sun X, Chen J, Leno GH, Engelhardt JF., Factors affecting the efficiency of embryo transfer in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*), *Theriogenology*. 2005 Dec 2
- Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Kang SK, Lee BC., Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium, *Anim Reprod Sci.*, 2008, 103(3-4) : 239-48.
- Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Lee SH, Hwang WS, Lee BC, Kang SK., Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media, *Theriogenology*, 2007, 67(2) : 293-302.
- LinksGong G, Dai Y, Zhu H, Wang H, Wang L, Li R, Wan R, Liu Y, Li N. Generation of cloned calves from different types of somatic cells. *Sci China C Life Sci*. Oct;47(5):470-6 (2004).
- Lin L, Li Q, Zhang L, Zhao D, Dai Y, Li N. (2008) *BMC Dev Biol*. Feb 11;8(1):14. Aberrant epigenetic changes and gene expression in cloned cattle dying around birth.
- LinksGong G, Dai Y, Zhu H, Wang H, Wang L, Li R, Wan R, Liu Y, Li N. (2004) *Sci China C Life Sci*. 2004 Oct;47(5):470-6. Generation of cloned calves from different types of somatic cells.

- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M., Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells., *Nat Biotechnol.* 2001 Oct;19(10):962-4.
- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J, Cappai P, Clinton M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* 2001;19:962-4.
- Lubon H., Transgenic animal bioreactors in biotechnology and production of blood proteins., *Biotechnol Annu Rev.* 1998;4:1-54.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D, Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct., *Reprod Domest Anim.* 2003 Oct;38(5):410-4.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D., Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes., *Theriogenology.* 2005 Jan 1;63(1):41-59.
- Luvoni GC, Chigioni S., Culture strategies for maturation of carnivore oocytes., *Theriogenology.* 2006 Mar 13
- Martin C, Plat M, Nerriere-Daguin V, Coulon F, Uzbekova S, Venturi E, Conde F, Hermel JM, Hantraye P, Tesson L, Anegon I, Melchior B, Peschanski M, Le Mauff B, Boeffard F, Sergent-Tanguy S, Neveu I, Naveilhan P, Soullillou JP, Terqui M, Brachet P, Vanhove B., Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation., *Transgenic Res.* 2005 Aug;14(4):373-84.
- Mastromonaco GF, Perrault SD, Betts DH, King WA. (2006) *BMC Dev Biol.* Aug 9;6:41. Role of chromosome stability and telomere length in the production of viable cell lines for somatic cell nuclear transfer.
- Merlo B, Iacono E, Zambelli D, Prati F, Belluzzi S. Effect of EGF on in vitro maturation of domestic cat oocytes. *Theriogenology*, Volume 63, Issue 7, Pages 2032-2039
- Min Kyu Kim, Goo Jang, Hyun Ju Oh, Fibrianto Yuda, Hye Jin Kim, Woo Suk Hwang, Mohammad Shamim Hossein, Joung Joo Kim, Nam Shik Shin, Sung Keun Kang, And Byeong Chun Lee. Endangered Wolves Cloned From Adult Somatic Cells. *Cloning And Stem Cells* .Volume 9, Number 1, 2007. 130-137
- Monaco MH, Gronlund DE, Bleck GT, Hurley WL, Wheeler MB, Donovan SM., Mammary specific transgenic over-expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) increases pig milk IGF-I and IGF binding proteins, with no effect on milk composition or yield., *Transgenic Res.* 2005 Oct;14(5):761-73.

- Nakatsuji N. Establishment and manipulation of monkey and human embryonic stem cell lines for biomedical research. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2005. (54):15-26.
- Oh HJ, Fibrianto YH, Kim MK, Jang G, Hossein MS, Kim HJ, Kang SK, Lee BC, Hwang WS., Effects of canine serum collected from dogs at different estrous cycle stages on in vitro nuclear maturation of canine oocytes., *Zygote*. 2005 Aug;13(3):227-32.
- Oh HJ, Kim MK, Jang G, Kim HJ, Hong SG, Park JE, Park K, Park C, Sohn SH, Kim DY, Shin NS, Lee BC., Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem., *Theriogenology*. 2008 Sep 1;70(4):638-47.
- Oh HJ, Hong SG, Park JE, Kang JT, Kim MJ, Kim MK, Kang SK, Kim DY, Jang G, Lee BC., Improved efficiency of canine nucleus transfer using roscovitine-treated canine fibroblasts., *Theriogenology*. 2009 Sep 1;72(4):461-70.
- OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals)
- Otoi T, Shin T, Kraemer DC, Westhusin ME., Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization., *Reprod Nutr Dev*. 2004 Nov-Dec;44(6):631-7.
- Park JE, Oh H, Hong S, Kim M, Kim G, Koo O, Kang S, Jang G, Lee B., Effective donor cell fusion conditions for production of cloned dogs by somatic cell nuclear transfer., *Theriogenology*. 2011 Mar 1;75(4):777-82.
- Park JK, Park JB, Kim T. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB Journal* 2006; 20: 2251-2260.
- Pera MF, Blasco Lafita MJ, Mills J. Cultured stem-cells from human testicular teratomas: the nature of human embryonal carcinoma, and its comparison with two types of yolk-sac carcinoma. 1: *Int J Cancer*. 1987. 15;40(3):334-43.
- Petters RM., Transgenic livestock as genetic models of human disease., *Reprod Fertil Dev*. 1994;6(5):643-5.
- Qiu J, Ogus S, Lu R, Chehab FF. 2001. Transgenic mice overexpressing leptin accumulate adipose mass at an older, but not younger, age. *Endocrinology* 142:348-358.
- Richard M.C., (2002) *Nucleic Acids Research*. 30, e47. Telomere measurement by quantitative PCR.

- Rodrigues BA, Rodrigues JL., Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation., *Reprod Domest Anim.* 2003 Feb;38(1):58-62
- Rodrigues Bde A, dos Santos LC, Rodrigues JL, Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes., *Mol Reprod Dev.* 2004 Feb;67(2):215-23.
- Rota A, Cabianca G., In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media., *Reprod Nutr Dev.* 2004 Mar-Apr;44(2):105-9.
- Sansinena MJ, Hylan D, Hebert K, Denniston RS, Godke RA., Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer., *Theriogenology.* 2005 Mar 1;63(4):1081-91.
- Satyanarayana A, Greenberg RA, Schaetzlein S, Buer J, Masutomi K, Hahn WC, Zimmermann S, Martens U, Manns MP, Rudolph KL. (2004) *Mol Cell Biol.* Jun;24(12):5459-74. Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate DNA damage responses and senescence signaling.
- Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP, Niemann H, Rudolph KL. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 25;101(21):8034-8. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis.
- Shin TY, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002;415:859.
- Starkey MP, Scase TJ, Mellersh CS, Murphy S, Dogs really are man's best friend--canine genomics has applications in veterinary and human medicine, *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2005 Jul;4(2):112-28.
- Van Cott KE, Monahan PE, Nichols TC, Velandar WH., Haemophilic factors produced by transgenic livestock: abundance that can enable alternative therapies worldwide., *Haemophilia.* 2004 Oct;10 Suppl 4:70-6.
- Wagner TE, Murray FA., Genetic engineering of laboratory and livestock mammals., *J Anim Sci.* 1985;61 Suppl 3:25-37.
- Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW., Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection., *Nat Biotechnol.* 2005 Apr;23(4):445-51. Epub 2005 Apr 3.
- Weng BC, Chew BP, Wong TS, Park JS, Kim HW, Lepine AJ., Beta-carotene

- uptake and changes in ovarian steroids and uterine proteins during the estrous cycle in the canine., *J Anim Sci.* 2000 May;78(5):1284-90
- Westhusin ME, Burghardt RC, Ruglia JN, Willingham LA, Liu L, Shin T, Howe LM, Kraemer DC., Potential for cloning dogs, *J Reprod Fertil Suppl.*, 2001;57:287-93
- White KL, Bunch TD, Mitalipov S, Reed WA., Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes., *Cloning.* 1999;1(1):47-54.
- Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME, Kraemer DC, Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro., *Reproduction.* 2003 Oct;126(4):501-8.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adults mammalian cells. *Nature.* 1997. 27;385(6619):810-813.
- Yin XJ, Lee HS, Kim LH, Shin HD, Kim NH, Kong IK. Effect of serum starvation on the efficiency of nuclear transfer using odd-eyed white cat fibroblasts. *Theriogenology* 2007; 67: 816-823.
- Yin XJ, Lee HS, YuXF, Lim LH, Shin HD, Cho SJ, Choi EG, Kong IK. peroduction of second-generation cloned cats by somatic cell nuclear tansfer. *Theriogenology* 2008; 69(8): 1001-6.
- Yin XJ, Lee Y, Lee H, Kim N, Kim L, Shin H, Kong I. In vitro production and initiation of pregnancies in inter-genus nuclear transfer embryos derived from leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) nuclei fused with domestic cat (*Felis silverstris catus*) enucleated oocytes. *Theriogenology* 2006; 66: 275-282.
- Yin, X.J., Cho, S.K., Park, M.R., et al. (2003). Nuclear remodeling and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes under delayedactivated conditions. *Zygote* 11, 167-174.
- Yin, X.J., Cho, S.K., Park, M.R., et al. (2003). Nuclear remodeling and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes under delayedactivated conditions. *Zygote* 11, 167-174.
- Yin, X.J., Lee, H.S., Lee, Y.H., et al. (2005). Cat cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* 129, 245- 249.
- Yin, X.J., Lee, H.S., Lee, Y.H., et al. (2005). Cat cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* 129, 245-249.

- Yin, X.J., Tani, T., Yonemura, I., et al. (2002). Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 67, 442- 446.
- Yin, X.J., Tani, T., Yonemura, I., et al. (2002). Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 67, 442-446.
- Yujing Zhang, Jing Shen, Yu Po-Huang Lee, Regina M.S., (2007) Cancer Investigation. 25, 668-677. Telomere Length in Hepatocellular Carcinoma and Paired Adjacent Non-Tumor Tissues by Quantitative PCR.
- Yu XF, Cho SJ, Bang JI, Lee HS, Lee YS, Kwon TH, Deb GK, Kong IK. Effect of equine chorionic gonadotropin on the efficiency of superovulation induction for in vivo and in vitro embryo production in the cat. *Theriogenology*. 2010 Mar 1;73(4):413-20.
- Yu XF, Kim JH, Jung EJ, Jeon JT, Kong IK. Cloning and characterization of cat POU5F1 and NANOG for identification of embryonic stem-like cells. *J Reprod Dev.* 2009 Aug;55(4):361-6.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술부에서 시행한 특수유용동물 복제사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특수유용동물 복제사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.