

돼지에서 HSP70 유전자형과 IVF 수정란 배 발달과의 관련성

진현주[†] · 김인철¹ · 위미순 · 연성흠 · 김종대 · 조창연 · 최선호 · 조상래 · 손동수 · 김영근 ·
정중현² · 최화식³ · 박춘근⁴ · 김정익⁴
농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장

Relationship between HSP70 Gene Polymorphisms and IVF Embryo Development in Pigs

H. J. Jin[†], I. C. Kim¹, M. S. Wee, S. H. Yeon, C. D. Kim, C. Y. Cho, S. H. Choi,
S. R. Cho, D. S. Son, Y. K. Kim, J. H. Jung², H. S. Choi³,
C. K. Park⁴ and C. I. Kim⁴

Animal Genetic Resources Station, National Livestock Research Institute, RDA

SUMMARY

This study was performed to investigate the relationship between Heat shock protein 70 (HSP70) gene polymorphism and in vitro fertilization(IVF) embryo development in the pigs. The single strand conformation polymorphism(SSCP) genotypes from HSP70 K1, K3 and K4 PCR products were detected different patterns. In cleavage rate of oocyte fertilized *in vitro*, HSP70 K1-AA genotype(73.1%) and K1-AB genotype(62.3%) showed significantly higher oocyte cleavage rate than HSP70 K1-BB genotype(49.3%)($p<0.05$). And HSP70 K3-AA genotype (72.4%) and K3-AB(62.2%) also showed significantly higher oocyte cleavage rate than HSP70 K3-BB genotype(49.1%)($p<0.05$). The IVF embryo development of 2-cell stage according to HSP70 genotypes of sperm and pig breeds also showed a significant difference. The number of embryos developed to 2-cell stage in Landrace(28.8) and Duroc(29.8) were significantly higher than in Yorkshire(10.9)($p<0.05$). And also HSP70 K4-AB genotype group(29.6) higher than HSP70 K4-AA genotype group(10.6)($p<0.05$). However, the number of embryos developed to blastocyst stage did not showed significant differences among breeds as well as HSP70 genotypes. These results suggest that in vitro development in porcine early embryos may be affected by HSP70 genotypes and breeds.

(Key words : HSP70 gene, IVF embryo, PCR-SSCP, pig)

서 론

돼지에서 열충격단백질(Heat Shock Protein 70; HSP70) 유전자는 7번 염색체에 위치하며, 돼지주

This Study was performed by the grant awarded (2002-2005) of RDA

¹ 농촌진흥청 축산연구소 양돈과(Swine Science Division, NLRI, RDA)

² 서울대학교 동물생명공학전공(Animal Science and Biotechnology, Seoul National University)

³ 김천대학 애완동물뷰티패션디자인과(Course of Pet Beauty Fashion Design, Kimcheon College)

⁴ 강원대학교 동물자원과학대학(College of Animal Resource Science, Kangwon National University)

[†] Correspondence : E-mail : genezoo@rda.go.kr

조직적합체(swine major histocompatibility complex, MHC) classⅢ군으로 분류된다(Rothschild와 Ruvinsky, 1998). 이 유전자는 고온 및 저온의 온도 변화에 따른 돼지 체내에서 단백질 분비에 관여하며, 유전적으로 DNA 변이인자를 가진 돼지는 온도 변화에 따라 생리적 대응력이 떨어져 돼지의 생산성과 번식능력 저하를 가져올 것으로 추측된다(Huang 등, 2000; Huang 등, 2002). 특히 스트레스 단백질들은 핵 및 세포질 액상 내에 열충격 전구물질(heat shock cognate; HSC70) 구성물로 나타나며, 심한 스트레스가 지속되면 세포질, 핵 및 핵소체 내에 HSP 70 분비를 유도한다(Lcung 등, 1996). 한편 HSP는 새로 합성된 polypeptide의 정상적인 접침(folding), 결합(assembly) 및 이동(transport)을 수행하게 하는 동반분자(chaperone)로서 중요한 역할을 하는 단백질 군이다(Minowada와 Welch, 1995; Morimoto, 1993). HSP는 분자량에 따라 20~30 kDa, 50~60 kDa, 70 kDa, 90 kDa 및 100~110 kDa의 5개 군으로 분류할 수 있으며, 이중 HSP70은 스트레스를 받는 동안 구조적으로 변형되어 발현된다. 따라서 세포의 온도가 갑자기 상승할 때 HSP가 유도되어 높은 온도에서도 세포가 생존할 수 있게 보호작용을 한다. 이는 세포온도가 올라가면 열충격인자(heat shock factor; HSF)가 TAB (TATA binding) 단백질 결에서 프로모터(promoter) DNA의 특수 염기 서열에 결합하여 RNA 중합효소에 의해 HSP 유전자 전사가 이루어진다. 그러나 세포의 온도가 다시 낮아지면 HSF는 더 이상 promoter와 결합하지 않고 HSP 유전자의 전사는 중지된다. 이러한 기능들은 정상적 성장 조건에서 항상성(homeostasis)이 유지되고 스트레스 상태에서는 세포의 생존성에 기여하고 있다(Nishihara 등, 1998).

가축에서 체내·외의 수정란 발생중 온도 상승은 세포질과 세포질내 분자적 수준에서 특이 유전자 발현과 단백질 합성 장애를 일으키며, 수정란 발달율이 잠정적으로 감소되고, 또한 초기 수정란에 직접적 영향을 주는 것으로 여겨진다(Alliston 등, 1965; Ealy 등, 1993; Edwards와 Hansen, 1997). Morange 등(1984)은 난모세포의 단백질 대사를 연구하였고, Edwards와 Hansen(1997)은 소수정란 발

생동안 2세포기부터 hatched blastocyst 단계까지 HSP70 단백질 군을 동정하였다. 마우스는 수정 후 계놈 접합체에서 HSP70 및 HSP72는 합성되었지만 HSP60, 70 및 90 유사유전자 군들은 8세포기 혹은 배반포기에서 구조적으로 발현되었음을 보고하였다(Mirkes, 1997). King 등(2000)은 blocking stage 이후 HSP60과 HSP72의 획득으로 수정란의 활발한 분화가 시작되기 전에 돼지 수정란 발생을 위하여 필요성이 증가한다고 하였다. 이러한 결과는 돼지의 초기 배 발생에서 HSP60 및 HSP72의 작용이 필수적임을 입증한다고 하였다. 이와 같이 수정란에서도 초기 배 발달에는 HSP 단백질이 관여되는 것으로 추정되지만 DNA 유전자의 변이성 인자들이 수정란 발달에 어떠한 저해 요인이 있는지에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 돼지의 스트레스 관련 HSP70 유전자의 변이성을 탐색하여 변이성 인자가 체외 수정으로부터 얻은 수정란의 발달에 미치는 영향을 구명하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 공시축 및 난소

공시재료는 축산연구소에서 사육되고 있는 종모돈 17두와 도축장에서 도축되는 암돼지로부터 난소를 채취하여 이용하였다.

2. DNA 추출

돼지의 genomic DNA는 혈액 및 난소 조직으로부터 추출하였다. 돼지 혈액은 항응고제 헤파린이 함유된 10mL 진공 튜브에 채취하여 3,500rpm에서 15분간 원심 분리 후 백혈구 층 300 μ L를 1.5mL micro tube에 옮겼다. 0.14 mol의 NH_4Cl 용액 800 μ L를 넣어 혈구를 파괴시킨 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 도축장에서 채취한 난소는 조직 0.2g을 액체질소가 담긴 막자사발에서 분쇄하여 0.06g을 1.5mL micro tube에 옮긴 후 600 μ L PBS 용액으로 5분간 진탕 후 3,000 rpm에서 15분 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 회수된 백혈구 세포 및 난소 조직 튜브에 400 μ L추출 buffer(10mM Tris-HCl, 400mM NaCl,

2mM EDTA), 50 μ L의 10% SDS 및 10 μ L의 Rnase(20 μ g/mL)를 첨가 37°C에서 1시간 배양 후 다시 5 μ L의 proteinase K (20mg/mL)를 첨가하여 55°C에서 6시간 배양하였다. 배양이 끝나면 동일량의 6M NaCl을 넣고 천천히 상하로 흔든 후 12,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액 400 μ L를 1.5mL 튜브에 회수하였다. 회수된 튜브에 800 μ L의 100% ethanol을 넣어 DNA를 응축시키고, 70%의 ethanol 300 μ L를 넣어 DNA를 세정하였다. 세정된 DNA는 건조 후 50 μ L의 TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0 1mM EDTA)에 용해시켜 시험을 수행할 때까지 -20°C 냉동고에 보관하였다.

용해된 DNA는 3차 증류수를 이용 20배 희석한 후 spectrophotometer를 이용하여 DNA 정량분석을 260nm와 280nm 흡광도에서 측정하여 OD260 : OD280의 비가 1.5~1.8의 농도를 가지는 DNA를 선택하여 사용하였다.

3. PCR 및 SSCP

돼지 HSP70 유전자를 PCR 이용 증폭시키기 위한 primer는 GenBank(accession No. X68213)의 Dezeure 등(1993)이 보고한 cDNA에 근거하여 290~2,041 영역 내에서 Jin 등(2005)이 설계한 HSP70 K1(290~512), HSP70 K3(830~1424)과 HSP70 K4 (1363~2041)를 이용하였다. PCR용 프라이머의 제작은 한국 바이오니아 (Bioneer Co., Korea)에 의뢰하여 이루어졌다. HSP70 K1 프라이머 염기서열은 Forward 5'-CCC TGA ATC CGC AGA ATA CC-3', Reverse 5'-TAC GCC TCC GCA GTC TCC TT-3'이며 HSP70 K3 프라이머 염기서열은 Forward 5'-ACT TCA TGG AGG AGT TTC G-3', Reverse 5'-ACT CCA GGT TGG TGG TCT GAA TAA G-3'이고, HSP70 K4 프라이머 염기서열은 Forward 5'-GCC ACC ATC CCT ACA AAG -3', Reverse 5'-CCA TTT AAT CAA CCT CCT CA-3'이었다. HSP70 유전자를 증폭하기 위한 PCR 반응물 구성은 50ng의 template DNA, 프라이머 각 10 pmol, dNTPs 각 50 μ M, 10 \times reaction buffer 그리고 1unit의 Taq polymerase(Bioneer Co., Korea)을 혼합하여 최종 volume이 25 μ L가 되도록 하여 실시하였다. 반응조건은 PCR System(Gene Amp.

9700, Perkin Elmer, U.S.A)을 사용하여 Pre-denaturation 94°C 5분과 Denaturation 94°C 30초, Annealing 56°C 30초 및 Extension 72°C 30초를 30회 반복 후 Post-extension 72°C 5min으로 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 -20°C에 보관하면서 SSCP 분석에 이용되었다.

SSCP를 수행은 PCR 산물 5 μ L와 2 \times loading dye (95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) 5 μ L를 혼합하여 95°C에서 3분간 열 변성시킨 다음 곧바로 얼음에 5분간 냉각시켰다. Reannealing을 방지한 denature된 DNA 시료는 30% MDE(Cambrex Bio Science Rockland, Inc.) 겔을 이용 300V로 전기영동 후 Ethidium Bromide (EtBr, 2 μ g/mL) 염색을 실시하여 DNA의 변이성 부분을 확인하였다.

4. 동결정액의 제조

체외수정을 위한 동결정액 제조는 수압법으로 채취된 농후정액을 등온의 BTS 보존액으로 1:1 희석하여 실험실로 옮겨 실온에서 22~25°C까지 약 2시간에 걸쳐 서서히 냉각시켜 15mL 시험관에 나누어 담은 정액을 1,500rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액은 제거하고 침전된 정자덩어리만 이용하였다.

동결보존액은 이와 김(1999)의 방법에 따라 lactose-egg yolk(LEY)을 이용하였으며, 희석처리된 침전된 농후정액을 1차 동결보존액(lactose hydrate 11.0g, egg yolk 25.0mL, distilled water up to 100.0mL)으로 최종 희석량의 2/3가 되도록 첨가하여 정자농도가 1.5×10^9 /mL가 되도록 혼합하였다. 1차 보존액으로 희석 후 정액 저온 처리장치(FHK, FA 112, Japan) 내에서 5°C가 될 때까지 2시간 동안 냉각 후, 2차 동결보존액(lactose hydrate 11.0g, egg yolk 25.0mL, glycerol 6.0%, orvus es paste; Nova Chemical Sales - USA 1.0%, distilled water up to 100.0mL) 1/3분량을 4회로 나누어 15분 간격으로 희석하였다. 최종 glycerol 농도는 2.5%, 정자농도는 1.0×10^9 /mL가 되도록 하였다. 최종 희석된 정액은 5mL maxi-straw (Minitüb, GmbH, Landshut, Germany)에 주입하고 양끝을 금속 구슬로 봉입하였다. Cryogenic-vial(Corning, Cambridge, MA

02140, USA)을 이용하여 포장한 후 2시간 동안 glycerol 평형 후 실험목적에 따라 액체질소 표면에서 5cm떨어진 곳에서 20분간 수평동결시킨 후 -196℃ 액체질소 내에 침지하여 보관하였다. 정액의 용해는 액체질소에 보관된 Maxi-straw를 꺼내어 53℃ water bath에서 45초간 용해하고 미리 준비된 80mL BTS 보존액(25℃)과 희석하여 사용하였다.

5. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 도축되는 암퇘지로부터 난소를 채취하여 30~34℃의 생리식염수에 넣어 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 멸균 생리식염수로 2회 세척한 다음 70% 에틸알콜로 난소의 표면을 소독한 후 직경 2~6mm 크기의 난포로부터 18gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 실제현미경하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 성숙배양액 NCSU-23액으로 3회 세척 후 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 성숙배양은 NC SU23을 기본 배양액으로 하고 10IU/mL PMSG, 10 IU/mL hCG, 10% pFF 및 0.57mM L-cysteine을 첨가한 배양액을 plastic petri dish에 50 μL의 소적을 만들어 mineral oil로 피복하고 5% CO₂, 39 °C 온도 조건하에서 각 소적당 10개의 난포란을 넣어 20~22시간 동안 1차 배양하였다. 그 후 hormone이 함유되지 않은 NCSU23 배양액으로 3회 세정 후 20~22시간 동안 동일 조건하에서 2차 성숙배양을 실시하였다.

6. 체외수정

체외수정을 위한 정자는 동결정액을 용해하여 15mL 튜브에 정액과 동량의 PBS로 희석하여 550g에서 5분간 원심분리를 2회 실시하였다. 정자의 처리는 2mM caffein이 함유된 mTBM배양액으로 1회 세정하고 15분간 CO₂ 배양기에서 swim-up을 실시하였으며, 수정을 위한 정액의 최종농도는 1×10⁴cell/mL로 조정하였다. 처리된 정액은 200 μL drop을 제작하여 체외성숙된 난포란을 주입하여 체외수정을 유도하였다. 6시간동안 수정을 실시한 후 mTBM으로 2회 이상 씻어낸 다음 NCSU23 배양액으로 옮겨 체외 배양시켰으며, 48시간마다 신선 배양액을 교환하였다.

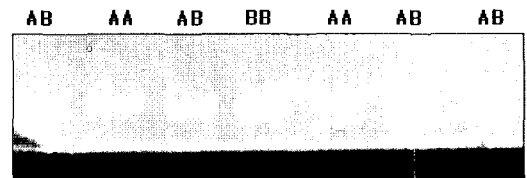
7. 통계분석

본 연구의 실험 자료에 대한 통계처리는 SAS (1995) program을 이용하여, GLM(General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인별 최소자승평균치(Least Square Mean)를 추정하여 유의차를 검정하였다.

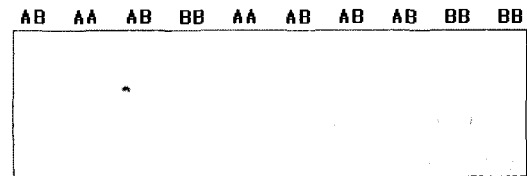
결 과

돼지에서 HSP70 유전자의 특정 영역에서 PCR 산물을 SSCP 분석한 결과 다형성은 Fig. 1과 같다.

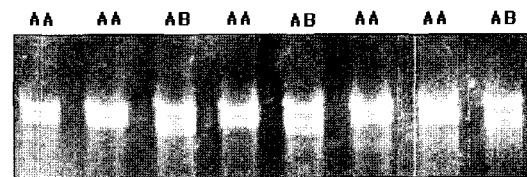
난소의 근육 DNA에 대한 HSP70 유전자형과 IVF 수정란의 분할을 간의 비교는 Table 1에 나타났다. 체외수정에서 난소의 HSP70 유전자형에 따른 체외수정 수정란 분할율은 HSP70K1의 PCR 산물인 경우 AA형(73.1%)과 AB형(62.3%)이 BB형(49.3%)보다 유의적으로 높은 분할율을 보였다($p<0.05$).



(1a)



(1b)



(1c)

Fig. 1. PCR-SSCP polymorphisms detection of HSP70 gene for (1a) HSP70 K1(223bp, 290~512), (1b) HSP70 K3(595bp, 830~1424) and HSP70 K4 (679bp, 1363~2041).

Table 1. Effects of HSP70 K1 and K3 genotype on embryos cleaved after *in vitro* fertilization using frozen semen in the pigs

Geno- type	No. of heads	No. of oocytes inseminated (LSM±SE)	No.(%) of oocytes cleaved (LSM±SE)
HSP70K1			
AA	4	36.25±8.99	26.25±6.51(73.1) ^a
AB	7	42.43±6.80	26.43±4.92(62.3) ^a
BB	11	27.09±5.42	13.36±3.93(49.3) ^b
HSP70K3			
AA	4	36.25±9.46	26.25±6.85(72.4) ^a
AB	8	38.00±6.69	23.63±4.84(62.2) ^a
BB	10	29.10±5.98	14.30±4.33(49.1) ^b

^{ab} Value with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

또한 HSP70K3의 PCR 산물도 AA형과 BB형의 분할율(72.4%와 62.2%)이 BB형(49.1%)보다도 유의적으로 높았다($p < 0.05$).

종모돈의 HSP70 유전자형이 IVF 수정란의 배발달에 미치는 효과는 Table 2에 나타났다. 체외수정란의 발달에서 종모돈의 요인을 보면 품종별로 2-cell 단계까지는 Duroc종(29.8)과 Landrace종(28.8)이 Yorkshire종(10.9)보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 그러나 배반포기(Blastocyst) 단계까지 배발달 수정란 개수에서는 유의적인 차이는 없었다. HSP70 유전자형에서는 HSP70K1의 PCR 산물은 AA형과 AB형이 확인되었는데 유전자형간의 배발달에는 차이를 보이지 않았다. HSP70K4의 PCR 산물인 경우는 AA형과 AB형의 2개 유전자형만 확인되었고, 초기 배발달 단계인 2-cell까지는 AB형이 29.6개로 AA형의 16.6개보다 유의적으로 높았으나($p < 0.05$) Blastocyst 단계에서는 유의적인 차이가 없었다.

고 찰

본 연구는 돼지의 열충격단백질 유전자형이 난자의 체외수정란의 배발육과 관련된 기초 자료를

얻고자 HSP70유전자의 특정영역 PCR산물에 대한 다형성탐색으로 DNA 인자형에 따른 체외수정란의 배발달을 검토하였다.

Favaier(1999)등은 사람의 HSP70-1 유전자에서 5% 범위 영역의 변이성 대립유전자들은 유전자 발현과 차이가 없음을 확인하였고, 또한 HSP70-1A와 HSP70-1C 동형접합 세포 계통간의 HSP70-1 mRNA 축적과 HSP 발현에서도 유의적인 차이가 없음을 보고하였다. 이러한 결과는 HSP70-1 유전자의 변이성 프로모터 대립유전자형은 HSP 발현에 미치는 영향은 유의적인 차이가 없음을 제시한다고 보고하였다. Shoichi 등(1999)은 사람의 HSP 70-1 유전자는 exon 1, 2 및 3 영역으로 구성되어 있으며 발현과정에서 DNA 염기 변이에 따른 exon 2 영역 부분 결손(deletion)이 일어나 exon 2 영역이 빠진 exon 1과 3 영역에서만 발현되면 스트레스에 민감해지며, 질병 저항성도 떨어진다고 보고하였다. Huang 등(2000)은 HSP70 유전자의 발현에 따른 종모돈의 정자 성상을 조사한 결과 HSP70 단백질의 발현량이 증가할수록 운동성이 좋아지고, 정상 정자율이 증가되며, 정자의 농도도 높아졌음을 확인하였다. 계절별로는 여름철보다는 겨울철이 발현량이 많았고, 품종별로는 유의적인 차이는 없었다. 그러나 정자의 농도를 보면 겨울철보다는 여름철이 더 높은 것으로 보고하였다.

돼지의 수정란 발달에서 HSP60의 합성은 King 등(2000)에 의하여 처음 보고되었고, Kojima 등(1996)은 수정란의 발달 초기에 일시적인 고온 충격은 HSP70의 발현량을 증가시켜 발달율을 양호하게 한다는 것을 보고하였는데, 본 실험에서는 Table 1과 같이 종모돈의 HSP70K1과 HSP70K3 유전자형에 따른 난할율이 유의적 차이를 보였고, Table 2에서 난소의 HSP70K4 유전자형에 따른 2-cell 단계까지 배발달에도 유의적 차이를 보였다. 이러한 결과를 볼 때 종모돈과 난자의 HSP70 유전자형에 따른 수정란의 초기 발달율에는 영향을 미칠 것으로 추측되고 있다.

한편 Huang 등(2000)은 Landrace, Yorkshire 및 Duroc의 종모돈에서 더운 여름철에 HSP70 발현이 현저히 낮으며($p < 0.05$), HSP70 발현량과 정자능력 간에는 상관관계가 낮지만 HSP70 발현량이 낮은

Table 2. Effects of breeds, sperm types and HSP70 genotype on IVF embryo development in pigs

Sources		No. of boar	No. of oocytes examined	No. of embryos developed to	
				2-cell (LSM±SE)	Blastocyst (LSM±SE)
Breeds	Duroc	1	401	29.8±7.5 ^a	4.9±3.7
	Landrace	9	2,795	28.8±3.3 ^a	7.0±1.2
	Yorkshire	7	1,075	10.9±4.1 ^b	1.0±1.2
HSP70 K1	AB	4	620	24.6±5.2	4.0±1.8
	BB	12	3,373	21.7±2.7	2.9±1.0
HSP70 K4	AA	5	1,268	16.6±3.4 ^b	2.3±1.2
	AB	10	2,545	29.6±4.4 ^a	4.6±1.5

^{ab} Value with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

개체는 정자능력이 현저히 떨어진다고 하였다.

또한 Favaiter 등(1999)은 사람에서 HSP70-1 유전자의 변이성 대립유전자형이 HSP70-1 단백질 발현량에는 영향을 미치지 않는다고 제시한 것을 고려할 때 이분야에 좀더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

King 등(2000)은 돼지 수정란의 1세포기 단계에서 HSP60과 HSP72 단백질의 발현을 확인하였으며, 이들 단백질이 초기 수정란의 배발달에 동반분자로서 중요한 역할을 한다고 하였다. 그러나 Crosby 등(1988)은 면양 수정란의 초기 1~4 cell 단계에서는 HSP를 비롯한 단백질 합성이 활발하나 4~8 cell 단계에서는 95% 수준으로 단백질 합성이 감소한다고 보고한 것을 고려할 때 수정란의 초기 발달에서 발육 저하를 방지하기 위하여 난자의 세포질 내 스트레스성 유전자의 유전자형과 HSP70 발현에 관한 연구는 계속되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 돼지에서 스트레스 관련 HSP70 유전자의 다형성과 IVF 수정란의 배발달간의 관련성을 조사하기 위하여 수행되었으며 그 결과는 다음과 같다.

HSP70-K1, -K3 및 -K4의 PCR 산물로부터 SSCP 다형성은 각각 다르게 확인되었다. 체외수정란의

분할을 시험에서 HSP70 K1-AA(73.1%) 및 K1-AB(62.3%) 난할율은 HSP70 K1-BB(49.3%)보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 또한 HSP70 K3-AA(72.4%) and K3-AB(62.2%)형도 HSP70 K3-BB(49.1%)형보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 돼지 품종들과 정자의 HSP70 유전자형에 따른 2-cell 단계까지의 체외수정란 배발달은 유의적 차이를 보였다. Landrace(28.8)와 Duroc(29.8)에서 2세포기까지 발달된 수정란의 수는 Yorkshire(10.9) 보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 또한 HSP70K4-AB(29.6)형의 2세포기 단계까지의 배발달 수정란 수는 HSP70K4-AA(10.6)형보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 그러나 돼지 품종 및 HSP70 유전자형에 따른 배반포기까지 수정란 배발달 정도는 유의적 차이는 없었다. 이러한 결과들은 돼지 체외수정란의 초기 배발달은 HSP70 유전자형과 품종에 따라서 영향을 받는 것으로 확인되었다.

참고문헌

- Alliston CW, Howarth B Jr and Ulberg LC. 1965. Embryonic mortality following culture *in vitro* of one- and two-cell rabbit eggs at elevated temperatures. J. Reprod. Fertil., 9:337-341.
- Crosby IM, Gandolfi F and Moor RM. 1988. Con-

- trol of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 82:769-775.
- Ealy AD, Drost M and Hansen PJ. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.*, 76(10):2899-2905.
- Edwards JL and Hansen PJ 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*, 46: 138-145.
- Favatiere F, Jacquier-Sarlin MR, Swierczewski E and Polla BS. 1999. Polymorphism in the regulatory sequence of the human hsp 70-1 gene does not affect heat shock factor binding or heat shock protein synthesis. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 56:701-708.
- Huang SY, Chen MY, Lin EC, Tsou HL, Kuo YH, Ju CC and Lee WC. 2002. Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.*, 70(1-2): 99-109.
- Huang SY, Kuo YH, Lee YP, Tsou HL, Lin EC, Ju CC and Lee WC. 2000. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.*, 63:231-240.
- Jin HJ, Park BY, Park JC, Hwang IH, Lee SS, Yeon SH, Kim CD, Cho CY, Kim YK, Min KS, Feng ST, Li ZD, Park CK and Kim CI. 2006. The Effects of Stress Related Genes on Carcass Traits and Meat Quality in Pigs. *AJAS.*, 19:Accepted printing.
- King YT, Lee WC, Gao MS, Wang JL, Tu CF, Wu SC and Kuo YH. 2000. Synthesis of 60- and 72 kDa heat shock proteins in early porcine embryogenesis. *Anim. Reprod. Sci.*, 63:221-229.
- Kojima T, Udagawa K, Onishi A, Iwahashi H and Komatsu Y. 1996. Effect of heat stress on development *in vitro* and *in vivo* and on synthesis of heat shock proteins in porcine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 43(4):452-457.
- Leung SM, Senisterra G, Ritchie KP, Sadis SE, Leopock JR and Hightower LE. 1996. Thermal activation of the bovine HSC70 molecular chaperone at physiological temperatures: physical evidence of a molecular thermometer. *Cell Stress Chaperones*, 1:78-89.
- Minowada G and Welch WJ. 1995. Clinical implications of the stress response. *J. Clin. Invest.*, 95 (1):3-12.
- Mirkes PE. 1997. Molecular/cellular biology of the heat stress response and its role in agent-induced teratogenesis. *Mutat. Res.*, 396:163-173.
- Morange M, Diu A, Bensaude O and Babinet C. 1984. Altered expression of heat shock proteins in embryonal carcinoma and mouse early embryonic cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4:730-735.
- Morimoto RI. 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259: 1409-1410.
- Nishihara M, Sumimoto R, Fukuda Y, H.Southard J, Asahara T, Kawaishi H and Dohi K. 1998. TNF-a and heat-shock protein gene expression in ischemic-injured liver from fasted and non-fasted rats. Role of donor fasting in the prevention of reperfusion injury following liver transplantation. *Transpl. Int.*, 11 [Suppl 1]:417-420.
- Rothschild MF and Ruvinsky A. 1998. The Genetics of the Pig. CAB. INTERNATIONAL, pp. 135-197.
- Sambrook J, Fritsh EF and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SAS Institute, 1989. *SAS User's Guide: Statistics*. Release 6.3 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Shoichi S, Kaoru N, Makoto U and Hiroshi D. 1999. An Additional Exon of Stress-Inducible Heat Shock Protein 70 Gene (HSP70-1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257:193-198.
- 이장희, 김인철. 1999. 돼지정자의 동결융해 후 활력 및 생존성에 대한 보존액, 동해보호제, 예비동결 및 동결처리시간의 영향. *한국가축번식학회지*, 23: 165-174.

(접수일: 2005. 10. 12 / 채택일: 2005. 12. 17)