

초자화 동결과 1-단계 용해된 체세포 핵이식란의 직접 이식 기술로 제주흑우 복제소 생산

김은영^{1,2} · 박민지^{1,2,5} · 김재연^{1,2} · 박효영^{1,2} · 노은지^{1,2,5} · 노은형^{1,2,5} · 송동환^{2,5} · 오창언² ·
김영훈³ · 문성호² · 이동선⁵ · 고문석⁴ · 류기중⁵ · 박세필^{1,2,5,†}

¹미래생명공학연구소, ²제주대학교 줄기세포연구센터, ³제주특별자치도 축산진흥원,
⁴국립축산과학원 난지축산시험장, ⁵제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부

Production of Cloned Jeju Black Cattle (Korean Cattle) from SCNT Embryo using Vitrification, One-Step Dilution and Direct Transfer Technique

Eun Young Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,5}, Jae Youn Kim^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2,5},
Eun Hyung Noh^{1,2,5}, Dong Hwan Song^{2,5}, Chang Eon Oh², Young Hoon Kim³, Seong Ho Mun²,
Dong Sun Lee⁵, Moon Suck Ko⁴, Key Zung Riu⁵ and Se Pill Park^{1,2,5,†}

¹Mirae Biotech, Seoul 143-854, Korea, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, Korea

³Jeju Special Self-Governing Province, Institute for Livestock Promotion, Jeju 690-180, Korea

⁴National Institute of Subtropical Agriculture, Jeju 690-150, Korea, ⁵Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

One-step dilution and direct transfer would be a practical technique for the field application of frozen embryo. This study was to examine whether Jeju Black Cattle (JBC, Korean Cattle) can be successfully cloned from vitrified and one-step diluted somatic cell nuclear transfer (SCNT) blastocyst after direct transfer. For vitrification, JBC-SCNT blastocysts were serially exposed in glycerol (G) and ethylene glycol (EG) mixtures [10% (v/v) G for 5 min., 10% G plus 20% EG (v/v) for 5 min., and 25% G plus 25% EG (v/v) for 30 sec.] which is diluted in 10% FBS added D-PBS. And then SCNT blastocysts were loaded in 0.25 ml mini straw, placed in cold nitrogen vapor for 3 min. and then plunged into LN₂. One-step dilution in straw was done in 25°C water for 1 min, by placing vertically in the state of plugged-end up and down for 0.5 min, respectively. When *in vitro* developmental capacity of vitrified SCNT blastocyst was examined at 48 h after one-step dilution, hatched rate (56.4%) was slightly lower than that of control group (62.5%). In field trial, when the vitrified-thawed SCNT blastocysts were transferred into uterus of synchronized 5 recipients, a cloned female JBC was delivered by natural birth on day 299 and healthy at present. In addition, when the short tandem repeat marker analysis of the cloned JBC was evaluated, microsatellite loci of 11 numbers was perfectly matched genotype with donor cell (BK94-14). This study suggested that our developed vitrification and one-step dilution technique can be applied effectively on field trial for cloned animal production, which is even no longer in existence.

(Key words : Jeju Black Cattle, SCNT blastocyst, Vitrification, One-step dilution, Direct transfer)

서 론

체세포 핵이식 기술에 의한 포유동물 생산은 1997년 영국의 Wilmut 등이 멸양에서 최초로 보고한 이레 생쥐 (Wakayama 등, 1998), 염소 (Baguisi 등, 1999), 돼지 (Polejaeva 등, 2000), 토끼 (Chesne 등, 2002), 고양이 (Shin 등, 2002) 등 다양한 종에서 연구 결과가 보고되었

으며, 복제소 생산의 경우 1998년 Kato 등과 Cibelli 등에 의해 연구 결과가 보고된 바 있고, 우리나라에서도 Im 등 (2001)과 Kim 등 (2010)이 한우 복제소 생산에 대하여 보고한 바 있다. 그러나, 체세포 핵이식에 의한 복제소 생산 효율은 인공수정이나 체외수정란에 비해 매우 낮아 분만율이 7% 미만 정도인 것으로 보고되고 있다 (Heyman 등, 2002; Yang 등, 2008).

체세포 핵이식 배반포기배의 체외발달율이 체외수정란

* 본 연구는 농림수산물부 농림기술개발사업(과제번호 308008-5)의 지원에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-2-457-8758, E-mail: sppark@jejunu.ac.kr

의 배반포기배 발생률과 유사한 30~50%로 보고되고 있는 반면 (Lonergan 등, 2007), 복제소 생산 효율이 낮은 이유는 체외에서의 장시간 동안 기계적·화학적 여러 과정을 거치는 데 따른 스트레스, 불안정한 체외 배양 환경, 발생된 배아의 이식 후 착상 실패 또는 불완전한 착상으로 인해 분만까지의 비율이 낮은 데서 찾을 수 있다. 한편, 우량 유전자원 또는 멸종 위기 동물 복제수정란의 유용성을 높이기 위해서는 생산된 체세포 핵이식 배반포기배의 동결보존기술이 선행 확립되어야 한다. 일반적으로 복제수정란은 다수의 환경 요인에 의한 질적 저하가 우려되므로 동결하지 않고 바로 이식하는 것이 대부분이나 복제수정란의 임신과 산자 발생율을 높이기 위해서는 우수한 자궁상태를 보유한 수란우 선정과 더불어 적절한 시기에 언제든지 이식할 수 있는 안정된 복제수정란 동결 기술개발이 필요하다. 지금까지, 복제소 생산에 대한 많은 보고가 이루어져 왔으나, 대부분 신선 복제수정란 이식에 의한 결과로 체세포 핵이식 유래 동결배반포기배 이식을 통한 복제소 생산은 극소수에 불과하며 (Tecilrioglu 등, 2003; Gong 등, 2004), 더욱이 필드에서 바로 적용할 수 있는 초간편법을 이용한 결과는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 제주에서만 서식하는 토종자원인 제주흑우의 귀세포를 이용하여 생산된 체세포 핵이식 배반포기배를 자체 개발된 초자화 동결방법으로 -196°C 에 냉동보존하고 일정 시간이 경과한 다음 초간편 1-단계 방법으로 융해하여 곧 바로 수란우 자궁에 이식한 후 체내발생율을 검토함으로써 체세포 핵이식 동결배반포기배를 이용한 제주흑우 복제소 생산 가능성 및 동결-융해 방법의 유용성을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

소 난자의 회수 및 체외성숙

본 실험에 공시될 도축된 소 난소로부터 난자의 회수 및 체외성숙은 Kim 등 (2010)의 방법에 준하여 실시하였다. 도축장에서 채취한 난소를 2~4시간 이내에 $32\sim 37^{\circ}\text{C}$ 생리 식염수에 유지하여 실험실로 운반한 뒤 직경 2~6 mm의 난포로부터 채취하여 사용하였다. 실험현미경하에서 획득된 미성숙난자는 난구세포가 부착되어 있고 세포질이 균일한 난자만을 선별하였으며, TL-HEPES로 세척하여 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)가 첨가된 TCM-199 (Gibco-BRL) 배양액에 0.2 mM Na-pyruvate (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 $\mu\text{g/ml}$ FSH (Sigma), 1 $\mu\text{g/ml}$ estradiol-17 (Sigma)와 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin (Sigma)를 넣어 38.8°C , 5% CO_2 조건하에서 20시간 동안 체외 배양하여 성숙을 유도하였다.

제주흑우 체세포 핵이식배아의 생산 및 체외 배양

체외성숙된 소 수핵 난자는 0.1% hyaluronidase (Sigma)가 첨가된 TL-HEPES 배양액에서 난구세포를 제거한 뒤 제 1극체가 방출된 난자만을 선별하여 사용하였다. 탈핵된 난자는 7.5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B (Sigma)가 첨가된 TCM-HEPES 배양액 소직으로 옮겨 Oocyte Imaging Sys-

tem (CRi) 카메라를 blinking 옵션으로 지정한 후 핵의 위치를 확인하여 탈핵하였다. 공여 체세포는 2007년 제주특별자치도 축산진흥원 소재 제주흑우 우수혈통 종빈우 (BK94-14, ♀)의 귀세포를 채취하여 체외에서 배양하여 동결 보관하였던 것으로 4~8 계대의 세포를 사용하였다. 핵이식 시 공여 체세포는 Tryple 용액 (Gibco)으로 처리하여 단일세포로 분리한 후 3% proteinase (Sigma) 용액에 50 초간 처리하고 TCM-HEPES 배양액으로 3번 세척한 후 10 μm 크기의 체세포를 골라 핵이 제거된 수핵 난자의 투명대와 세포질 사이의 공간에 이식하였다. 체세포가 주입된 난자는 0.3 M mannitol (Sigma) 용액 내에서 LF101 Electro Cell Fusion Generator (NEPA GENE, Shioyaki, Japan)을 사용하여 직류 22 volt에서 1 pulse로 세포 융합을 실시하였으며, 세포융합 여부는 30분 후에 관찰하였다. 융합이 확인된 핵이식란은 5 μM Ca-ionophore (Sigma)에 5분 노출시키고, 2.0 mM DMAP (Sigma)에서 3시간 동안 배양하여 난활성을 유도하였다. 핵이식 후 활성화 처리된 난자는 3 mg/ml FAF-BSA (Sigma)가 들어 있는 CR1aa 배양액에 옮겨 배양하고, 배양 48시간째 분열된 핵이식 배아는 동일 개체의 체세포로 단층 배양이 유도된 10 μl 소직에서 1 $\mu\text{g/ml}$ Epidermal growth factor (Bio-Research Product, Inc, North Liberty, Iowa), 1 $\mu\text{g/ml}$ Insulin-like growth factor (Bio-Research Product), 10 μM flavonoid (3,4'-Dihydroxyflavone; INDOFINE Chemical Co., Inc, Hillsborough, NJ)와 10% FBS가 들어 있는 CR1aa 배양액으로 공동 배양함으로써 배 발생을 유도하였다.

체세포 핵이식 배반포기배의 초자화 동결

Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Gibco)에 10% FBS를 첨가하여 기본 용액으로 사용하였으며, 초자화 동결 용액은 glycerol (G, Sigma)과 ethylene glycol (EG, Sigma)을 혼합하여 사용하였다. 체세포 핵이식 배반포기배를 동결하기 전에 10% G가 첨가된 D-PBS (+10% FBS)에서 5분, 10% G (v/v)와 20% EG (v/v)가 첨가된 D-PBS (+10% FBS)에서 5분씩 순서대로 처리하여 탈수화 평형을 유도한 후 피펫을 사용하여 25% G와 25% EG가 혼합된 D-PBS (+FBS)에 20~30초간 노출시킨 후 0.25 ml French 미니 스트로에 장착하고 열 봉입하였다. 제작된 스트로는 LN_2 vapor에 3분간 노출하여 냉각시킨 후 -196°C LN_2 에 바로 침지하였다. 1-단계 융해를 위한 스트로 내의 구성층은 자체 제작 (Kim 등, 1999) 하였으며, 다음과 같이 준비되었다. 7.5 cm (0.5몰 슈크로즈층)-0.5 cm (공기층)-1.0 cm (G25EG25 초자화 동결액층, 난자가 들어가는 층)-0.5 cm (공기층)-1.5 cm (0.5몰 슈크로즈층)으로 슈크로즈와 초자화 동결액이 9:1 비율로 희석될 수 있게 준비하였다. 각 스트로 당 넣는 체세포 핵이식 배아 수는 2개였다.

1-단계 융해 간편법(One-step Dilution)

동결 스트로는 25°C 물에서 수직상태로 놓아 30초 다시 뒤집어서 수직상태로 30초간 방치하여 스트로 내의 내용물이 완전히 섞이도록 하였다. 1-단계 융해 후 체외 발달율을 조사하기 위한 대조군은 LN_2 vapor 노출을 제외한 초자화 동결 전-처리용액과 1-단계 융해액에 순차적

으로 처리한 후 배양액으로 최종 세척한 다음 공-배양함으로써 동결-용해 처리용액의 독성 유무를 조사하였다.

결 과

수란우 발정동기화, 1-단계 용해 체세포 핵이식 배반포기배 이식 및 복제소 생산

수란우 준비는 CIDR-PLUS를 질 내 7일간 삽입하고 제거하는 당일 PGF₂ α 25 mg을 투여하는 방법으로 발정동기화를 유도하였다. 스트로 내에서 1-단계로 용해된 체세포 핵이식 배반포기배는 발정 동기화 처리된 대상우 중 정상적인 발정을 보이고, 이식 당일 (발정 발현 7~8일째) 직장 검사를 통하여 황체 상태가 양호한 개체를 선발하여 황체가 존재하는 자궁각에 곧 바로 이식되었으며, 700 회 이상 수정란이식 경험을 가진 전문기술자 2명에 의해 수행되었다. 수란우의 임신 진단은 동결-용해된 복제수정란 이식 후 45일째에 직장 검사법에 의하여 임신 여부를 진단하였다. 분만 시기가 가까이 올 10~20일 전부터 수란우의 분만 징후를 관찰하고, 적절한 시기에 정상적인 분만이 이루어지도록 유도하였다.

친자 감별 마커를 이용한 복제 유무 검증

초자화 동결-용해된 체세포 핵이식 배반포기배로부터 태어난 소의 복제 유무를 검증하기 위해 핵이식에 이용된 체세포 (BK94-14)와 복제송아지 귀세포의 유전자 검정을 실시하였다. 각각의 검사 샘플에서 유전물질인 DNA를 추출하고, 특정 유전자를 동시에 증폭하여, 여러 유전자 좌위에서 핵이식용 체세포와 복제송아지가 일치하는지 여부를 조사하였다. ISAG (International Society of Animal Genetics, 국제동물유전학회) 11개의 친자 감별 표지인자들을 사용하여 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 및 BM1824 각 primer의 forward에 형광 dye를 labeling하고 PCR을 실시하였다. 검체의 PCR 산물은 형광을 분석하는 3,100 genetic analyzer 기기를 이용하여 샘플 별로 peak 크기를 계산하고, 각각의 표지인자들의 반복성을 조사하여 검사한 모든 유전자 좌위에서 일치할 경우 친자라고, 3개 이상의 유전자 좌위에서 불일치할 경우 친자가 아니라고 판명하였다.

통계처리

초자화 동결 후 1-단계 용해된 체세포 핵이식 배반포기배의 생존율에 대한 결과는 SAS program을 이용하여 분석하였으며, 처리군 간 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검증하였다.

초자화 동결 체세포 핵이식 제주흑우 배반포기배의 1-단계 용해 후 체외발달을 조사

초자화 동결 체세포 핵이식 제주흑우 배반포기배의 1-단계 용해 후 체외발달율의 결과는 Table 1과 Fig. 1에 제시된 바와 같다. 액체질소에 노출 없이 초자화 동결 전-처리용액과 1-단계 용해액 [슈크로즈와 초자화 동결액 (9:1) 혼합액]에만 단계적으로 처리한 대조군과 초자화 동결/1-단계용해 처리군에서 회수된 복제수정란을 체외배양 환경에서 48시간 동안 배양하였을 때, 처리군에서 용해 후 생존율은 84.6% (33/39)였으며, 생존 배반포기배 (Fig. 1A) 중 부화 배반포기배 (Fig. 1B)로의 발달율은 56.4% (22/39)로 대조군 62.5% (25/40)에 비해 약간 낮았으나 유의차는 인정되지 않았다. 본 실험은 5회에 걸쳐서 조사하였다.

초자화 동결 체세포 핵이식 제주흑우 배반포기배의 1-단계 용해 후 직접이식에 따른 임신 결과

초자화 동결 체세포 핵이식 배반포기배를 1-단계 용해 방법으로 녹인 후 곧 바로 발정동기화가 유도된 5 마리의 수란우 자궁에 이식한 결과, 한 마리의 수란우에서 이식 후 45일째 정상임신이 확인되었다. 이후 정상 임신 기간 보다 2주 가량 경과하여 299일 째에 제주흑우 씨암소 체세포 핵이식 복제 송아지가 성공적으로 자연분만되었고 생시체중은 36 kg이었다. 또한, 복제 송아지 "흑우순이"는 101일째 (2011년 2월 9일 현재) 체중은 85 kg으로 건강하게 성장하고 있다 (Fig. 2).

Table 2. Production of cloned Jeju Black Cattle from vitrified-thawed SCNT embryo

No. of* transferred embryo	No. of recipient	No. of pregnancy	No. of** birth calf	No. of living calf
10	5	1	1	1

* Vitrified SCNT embryos were one-step diluted in 25°C water for 1 min. and then directly transferred into surrogate mother in field.

** A healthy and apparently normal cloned Jeju Black calf was born on day 299.

Table 1. *In vitro* survival of vitrified and one-step diluted bovine SCNT blastocyst

Treatment	No. of SCNT blastocyst	No. (%) of recovery	No. (%) of survived after 48 h	
			≥Hatching blastocyst	Hatched blastocyst
Control*	40	40 (100.0)	40 (100.0)	25 (62.5)
Vitrification & one-step dilution	39	39 (100.0)	33 (84.6)	22 (56.4)

* Fresh SCNT blastocysts were treated sequentially in vitrification solution and then in one-step dilution solution except LN₂ exposure, respectively.

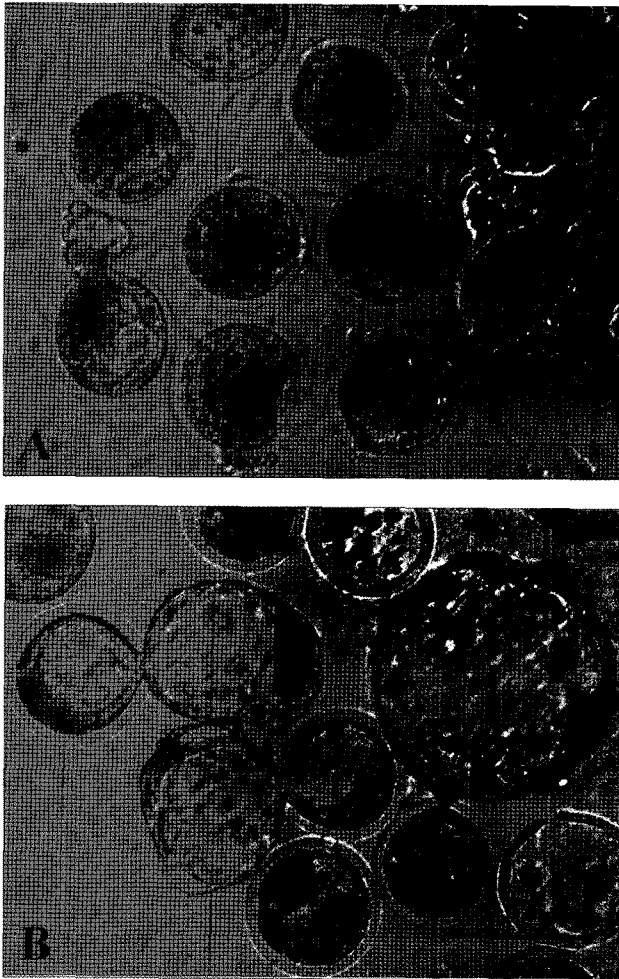


Fig. 1. *In vitro* survival morphology of vitrified Jeju Black Cattle SCNT blastocysts after one-step dilution. After co-culture with monolayered ear cell for 24 h (A) and 48 h (B), survived embryos were normally developed into hatching and hatched stages, respectively.

친자 감별 유전자 분석에 의한 복제소의 검정

초자화 동결 배반포기배의 1-단계 용해 후 간편 이식 방법으로 태어난 복제 송아지의 귀세포와 복제수정란 생산에 이용된 공여 제주흑우 씨암소의 체세포를 11개의 STR 마커로 친자 감별 유전자 분석을 실시한 결과, 복제 송아지와 공여된 제주흑우 체세포 간에 11개의 microsatellite loci에서 모두 완벽하게 유전자형이 일치하였으며, 성별도 동일한 암컷으로 확인되었다 (Fig. 3).

고 찰

본 연구는 우수 혈통 제주흑우 복제소를 생산함에 있어서 체세포 핵이식 배반포기 배아를 초자화 동결 보존해 두었다가 수란우가 준비되는 시점에 맞추어서 초간편 1-단계 용해 방법으로 녹이고, 수란우 자궁에 곧 바로 이

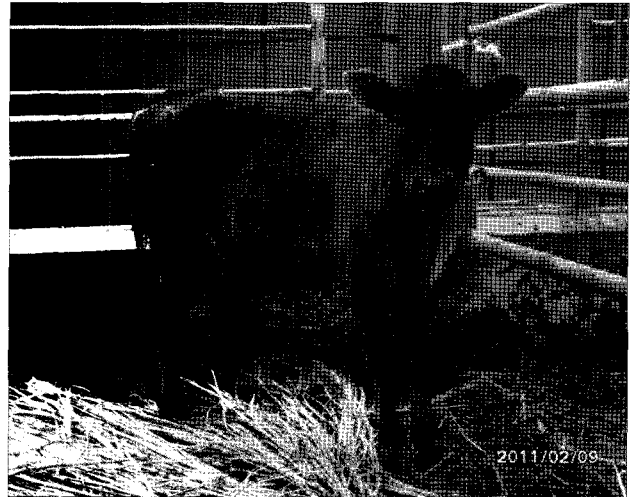


Fig. 2. One hundred and one day-old aged cloned female Jeju Black Cattle "Heuk Woo Sunee" (Birth date; Oct. 31, 2010).

식하는 전형적인 필드용 동결-용해 방법으로 복제송아지 생산이 가능함을 나타낸다.

초자화 동결은 고농도의 동해방지제를 이용하여 동결 시 세포 상해의 주된 원인이 되는 결빙이 형성되지 않게 하면서 난자를 수분 내에 동결하는 방법으로 (Rall과 Fahy, 1985), 고가의 장비가 필요하지 않고 효율이 높아 실험동물을 포함 인간배아 동결에서도 두루 적용되고 있는 실용적인 동결 방법이다. 그리고 동결란의 용해는 일반적으로 36°C 물에서 급속 용해되고 동해방지제 제거를 위해 여러 단계의 세척과정을 실시하는 것이 보통이다. 실험동물을 포함한 인간의 시험관아기 기술에서도 동결란의 용해는 실험실에서 이루어져 이식이 실시되므로 반드시 필드를 고려하는 용해 방법에 대한 연구가 필요하지 않다. 한편, 1-단계 용해는 가축 생산의 산업화를 위해 필드 적용 목적으로 개발된 초간편법으로 전문적인 기술 없이도 누구나 쉽게 할 수 있는 유용한 방법이다 (Massip 등, 1984; Voelkel과 Hu, 1992).

하지만, 체내수정란 및 체외수정란에 대한 연구 보고는 있으나 (Suzuki 등, 1990; Dochi 등, 1998), 복제수정란을 초자화 동결하고 초간편법으로 용해하여 산자를 획득한 보고는 드물다. Tecirlioglu 등 (2003)은 복제수정란을 OPS (open pulled straw) 방법을 이용하여 초자화 동결을 실시하였고, 용해는 OPS 스트로에서 희석용 스트로로 다시 옮겨 담은 2-단계로 실시하여 이식함으로써 이식 14두 중 복제소 1두를 획득하였다. Gong 등 (2004)은 복제수정란을 EFS40 용액에 노출하는 2-단계 방법으로 동결하였고, 용해 시 배양접시에 쏟아내어 2-단계로 세척한 후 다시 이식용 스트로에 장착하여 이식함으로써 이식 9두 중 복제소 1두를 생산하였다. 그러나 앞서 소개한 두 방법 모두 필드에서 바로 적용하기는 어려운 실정이어서 본 연구에서 보고한 내용이야말로 처음으로 필드 적용 동결방법에 의한 복제소 생산 예라고 할 수 있다. 본 연구의 차별성은 이식용 스트로를 이용해서 초자화 동결을 실시하고 1-단계 용해하여 (1분 소요) 바로 이식하는 최 단시간 이식 간편법으로 필드 어디에서나 환경의 제약 없이 이용할 수 있는 유용한 방법이다.

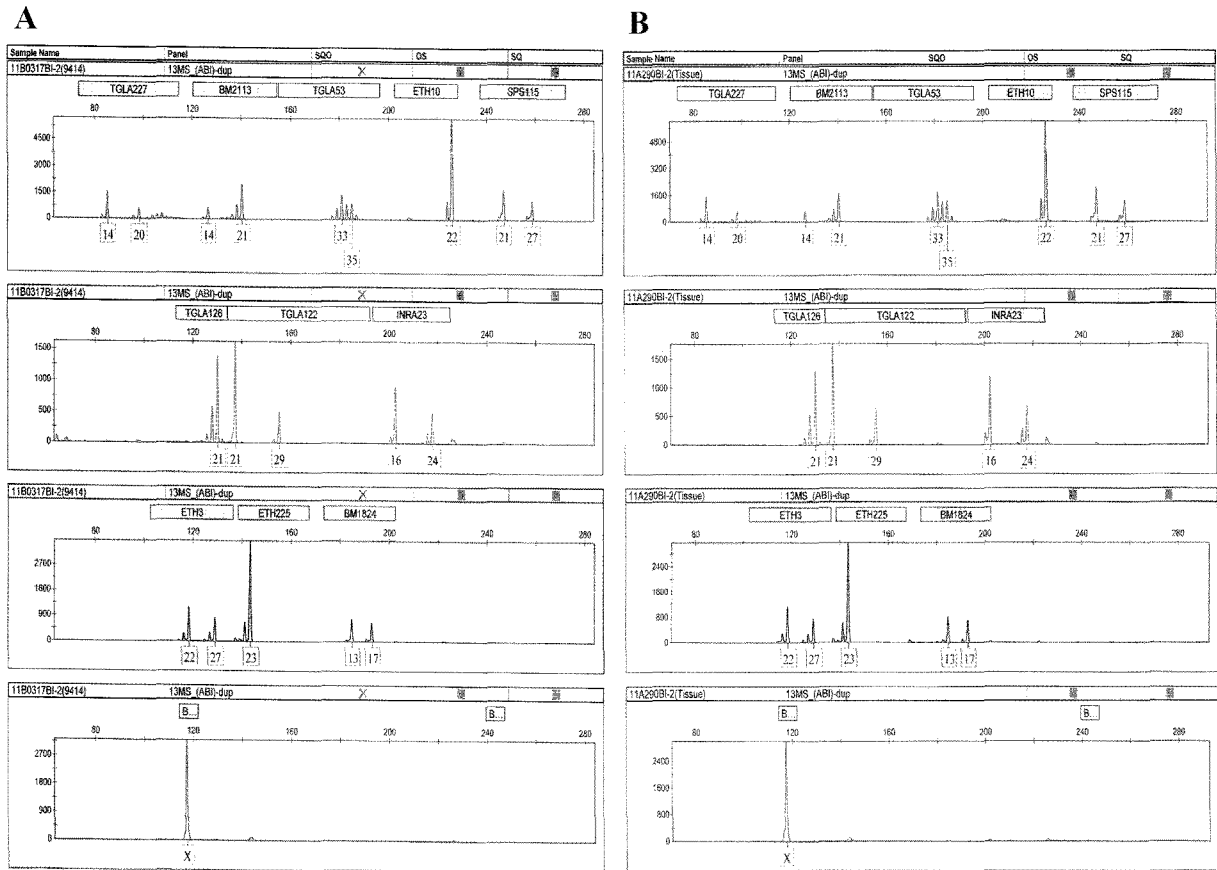


Fig. 3. STR (short tandem repeat) profile investigated full DNA fingerprint of elite female Jeju Black Cattle somatic cell (BK94-14, A) and it's cloned female calf ("Heuk Woo Sunee", B) using 11 STR markers and amelogenin.

이번에 개발된 초자화 동결/1-단계 융해 후 직접 이식 기술 방법의 유용성 및 안전성은 이미 본 연구팀이 체외 수정란을 이용한 선행연구로서 제주도 일부 농장에서 시행한 한우 엘리트 송아지 생산 시도에서 40% 분만율 (4/10)을 획득하여 그 가능성을 확인한 바 있다 (Park, 2008). 이러한 안정된 동결-융해 기술을 바탕으로 본 연구에서는 2007년에 냉동 보관해둔 제주특별자치도 축산진흥원 보유의 제주흑우 암소 (BK94-14, ♀, 1994년 7월 25일 출생, 2008년 12월 5일 도축)의 귀 체세포를 이용해 핵이식 배반포기배를 생산하고 2개씩을 각 스트로에 장착하여 초자화 동결 방법으로 보관해 두었다가, 그 중 일부를 초간편 융해법으로 녹인 후 이식하여 '현존하지 않는 최우량 혈통 제주흑우 씨암소 종을 복원하는데 성공하였다.

또한, 제주흑우 씨암소 공여체세포 (BK94-14)와 복제 송아지의 귀 조직 세포를 11개의 STR (short tandem repeat) 마커로 진자 감별 유전자 분석을 실시한 결과, 복제 송아지와 제주흑우 씨암소 공여체세포 간에 11개의 microsatellite loci에서 모두 완벽하게 유전자형이 일치되었으며, 성별도 동일한 암컷으로 확인되어 본 연구에서 생산된 송아지가 BK94-14 유래 복제소임이 증명되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 초자화 동결-초간편 융해 방법은 체세포 핵이식 배아의 유용성을 높여 산업화할 수

있는 기반 조성에 매우 귀중한 기술로 여겨져, 현재 우수 혈통복원을 위한 복제소 생산 연구에서 추가적인 동결복제수정란의 이식연구를 진행 중에 있다.

본 연구진은 앞선 연구 (Kim 등, 2010)에서 첫 번째로 현존하는 흑우 중 육량 형질이 제일 우수한 씨수소 (BK 01~10, ♂, 2001년 12월 11일 출생)를 2009년 3월 11일 복제하는데 성공하였고 (복제소 명명; "흑영돌이"), 본 연구에서 사용한 흑우 암소와 동시대에 태어나 생존했으며, 동일 연령에 도축된 (1994년 5월 9일 출생, 2008년 6월 12일 도축, 14년 생존) 육질 우수 씨수소 (BK 94~13, ♂)의 냉동 보관된 체세포로부터 2009년 9월 9일에 두 번째 복제소 ("흑울돌이")도 생산한 결과를 보고한 바 있다. "흑영돌이"와 "흑울돌이"는 2011년 2월 현재 23개월과 17개월로 건강하게 성장하였으며, Fig. 2에 제시된 바와 같이 세 번째 복제 암소 "흑우순이" 또한 임신 확인 이후 건강에 이상 없이 잘 성장하여 자연 분만하였고, 현재 정상적인 체중으로 (분만 후 101일째, 85 kg) 자라고 있다. 더욱이 이번에 생산된 제주흑우 복제 암소는 제왕절개 시술로 태어났던 두 복제 씨수소와 달리 임신 299일째 자연분만으로 태어났으며, 체중은 36 kg이었다. 빠른 회복으로 분만 20분 후에 바로 서서 어미젖을 빨았고, 이유기를 거쳐 현재 4달째 정상적인 성장을 보이고 있다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 본 연구진은 체세포 핵

이식, 배양 환경, 동결·융해, 이식, 임신 유지 및 관리 등 체세포 복제소 생산에 필요한 모든 기술 및 제반 환경을 두루 갖추고 있으며, 현존하는 씨수소와 현존하지 않은 씨수소 복제에 성공한 데 이어, 현존하지 않은 씨암소 복제이면서 더불어 초급속동결-간편융해에 따른 직접 이식 기술 접목으로 멸종 위기의 제주흑우의 대량증식 기술 개발 및 산업화를 위한 귀중한 연구 기반을 확립한 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구에서 개발된 초자화 동결과 1-단계 융해 및 직접 이식 기술은 체세포 핵이식 배반포기배뿐만 아니라 체내·외 수정란 활용에 효과적으로 이용될 수 있을 것이며, 제주흑우의 대량 증식 기술 개발 및 산업화의 기반 기술 구축뿐만 아니라 구제역 등 예견되지 않는 자연환경질환으로 인해 사라지는 우수 종 보존과 멸종 위기의 우수 혈통 복원에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

1. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P *et al.* (1999): Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotech* 17:456-461.
2. Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP (2002): Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotech* 20:336-369.
3. Cibelli JB, Stice SL, Goleuke PJ, Kane JK, Jerry J, Balackwell C, de Leon A, Robl JM (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
4. Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S (1998): Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 49:1051-1058.
5. Gong G, Dai Y, Fan B, Zhu H, Zhu S, Wang H, Wang L, Tang B, Li R, Wan R, Liu Y, Huang Y, Zhang L, Sun X, Li N (2004): Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 69:278-288.
6. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP (2002): Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 66:6-13.
7. Im GS, Yang BS, Park SJ, Im SK, Yang BC, Yi YJ, Park CS (2001): Effect of protein supplementation, O₂ concentration and co culture on the development of embryos produced by nuclear transfer using cultured cumulus cells in Hanwoo (Korean cattle). *Asian-Aust J Anim Sci* 14(9):1260-1266.
8. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1998): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
9. Kim EY, Kim DI, Park NH, Weon YS, Nam HK, Lee KS, Park SY, Yoon SH, Park SP, Chung KS, Lim JH (1999): Systems for production of calves from Hanwoo (Korean Cattle) IVM/IVF/IVC blastocyst III. Vitrification and one-step dilution of Hanwoo blastocyst. *Korean J Animal Reprod.* 23(4):293-301.
10. Kim EY, Kim YO, Kim JY, Park MJ, Park HY, Han YJ, Mun SH, Oh CE, Kim YH, Lee SS, Ko MS, Park SP (2010): *In vitro* development of somatic cell nuclear transfer embryo treated with flavonoid and production of cloned Jeju Black Cattle. *Reprod Dev Biol* 34(3):127-134.
11. Lonergan ACO, Evans E, Boland D, Rozos T, Fair P, Duffy L-Y, Sung F, Du S, Chaubal J, Xu X, Yang, Tian XC (2007): Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified *in vivo* and cloned bovine embryos. *Theriogenology* 68:1128-1137.
12. Massip A, Van der Zwalmen P, Leroy F (1984) Effect of stage of development on survival of mouse embryos frozen-thawed rapidly. *Cryobiology* 21:574-577.
13. Park SP (2008) Industrialization and mass production of Jeju Black Cattle. Annual report on Korea Institute of Planning & Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry & Fisheries.
14. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL *et al.* (2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
15. Rall WF, Fahy GM (1985): Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575.
16. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M (2002): A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.
17. Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata A, Matsuo-ka K, Nishikata Y, Okamoto K (1990): Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology* 34:1051-1057.
18. Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Koorfiatis NA, Hall VJ, Ruddock NT, Cooney MA, Trounson O (2003): Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod Fert Dev* 15:361-366.
19. Voelkel SA, Hu YX (1992): Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient

- female. *Theriogenology* 37:687-697.
20. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374.
21. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
22. Yang BC, Im GS, Kim DH, Ko YG, Hwang SS, Nho WG, Kim MJ, Yang BS, Lee SJ, Seong HH (2008): Effects of gestation length and birth weight on survival rate in cloned Korean Native Calves. *Reprod Dev Biol* 32(1): 51-58.
(접수일자: 2011. 2. 25 / 채택일자: 2011. 3. 3)