

다양한 혈청 물질의 첨가가 염소 수정란의 체외배양에 미치는 영향

김관우, 전다연, 이진욱, 이성수, 김승창, 김찬란, 이상훈*
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터

Influence of various serum supplement on *in vitro* culture for goat embryos

Kwan-Woo Kim, Dayeon Jeon, Jinwook Lee, Sung-Soo Lee,
Seungchang Kim, Chan-Lan Kim, Sang-Hoon Lee*

Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA

요약 본 연구는 염소 수정란의 체외배양용 배지에 FBS, gBS 및 PVA 첨가시 배발달 및 apoptosis 발생률을 분석하여 체외배양시 각 첨가물의 효과를 조사하였다. 체외수정 후 체외수정을 실시하여 체외배양 배지에 10% FBS, 10% gBS 및 10% PVA를 첨가하고 배발달 효율과 배반포의 품질을 확인하기 위해 TUNEL assay를 통해 apoptosis 발생 비율을 조사한 결과, 난할률 및 배반포 형성률에서 처리군 모두 대조군(무혈청) 보다 유의적으로 높은 결과를 보였다. 특히 gBS와 PVA 처리군에서 각각 31.95, 35.29%로 유의적으로 가장 높은 배반포 형성률을 보였다. 또한 TUNEL assay의 결과에서도 배발달 비교실험에서와 같이 대조군에서 가장 적은 총세포수와 가장 높은 apoptosis 비율을 보였으며, gBS와 PVA 처리군에서 가장 많은 총세포수 및 가장 적은 apoptosis 비율을 보였다. 염소의 체외배양 효율 향상을 위한 본 연구의 결과, 무혈청 배지나 FBS첨가 보다는 gBS나 PVA의 첨가가 배발달 효율뿐만 아니라 배반포 품질에도 긍정적임을 알 수 있었으나, gBS내 확인되지 않는 물질들의 위험성을 감안했을 때 PVA가 보다 안전하고 효율적일 것으로 생각된다.

Abstract This study examined the effects of fetal bovine serum (FBS), goat blood serum (gBS), and poly-vinyl alcohol (PVA) on the *in vitro* development and embryo quality of goats for an improvement of embryo production. For the experiment, an *in vitro* fertilized embryo culture medium was supplemented with 10% FBS, 10% gBS, and 10% PVA to determine their effects on the embryo development efficiency and blastocyst quality. The results showed that the non-serum supplementation group showed significantly lower cleavage rate and blastocyst formation. On the other hand, the gBS and PVA supplementation groups showed a significant increase in the cleavage rate and better blastocyst formation than the control and FBS supplementation group. Furthermore, a TUNEL assay performed to confirm the blastocyst quality showed the same pattern as the embryo development experiment. These results showed that the supplemented gBS or PVA was more efficient in enhancing the *in vitro* development efficiency of goats than the supplementation of FBS or non-serum. On the other hand, considering the risk of an unidentified factor in gBS, PVA appears to be safer and more efficient in the *in vitro* development of goat embryos.

Keywords : Serum, *In Vitro* Culture, Goat, Embryo, Blastocyst

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ01431502)의 지원과 국립축산과학원 전문연구원 과정 지원 사업에 의해 수행되었음.

*Corresponding Author : Sang-Hoon Lee(National Institute of Animal Science, RDA)

email: sanghoon@korea.kr

Received July 19, 2019

Revised August 20, 2019

Accepted September 6, 2019

Published September 30, 2019

1. 서론

도축 난소에서 채취한 미성숙 난자의 이용은 과거 체외성숙 및 체외배양을 통한 수정란을 생산하여 생축에 이식하는데 주로 이용하였다. 하지만 복제양 "Dolly"가 태어나고 [1], 포유류 난자의 체외성숙 및 체외배양 효율 향상을 위한 연구가 다양하게 진행되어 왔다 [2-5]. 초기에는 림프액이나 혈장과 같은 biological fluid를 [6], 이후에는 항산화제나, 성장인자, vitamin, hormone과 같은 화학적 조성이 확실한 물질을 이용하여 연구하였다 [7-8].

국내에서 염소의 난자 및 수정란에 관한 연구는 1980년 말 수정란 이식에 관해서만 일부 연구되었으며, 수정란 배양에 관한 연구는 절대적으로 부족하여 소의 방법을 적용하고 있는 실정이다. 현재 소의 체외성숙 효율은 90% 이상으로, 이중 약 75%가 정상적인 수정란으로 발달된다[9]. 소와 돼지에서는 현재까지도 체외성숙이나 체외수정 등 수정란 생산 효율 향상을 위한 연구가 많이 진행되어 있으나 [2-5], 염소의 수정란 생산과 관련된 연구가 많이 부족한 상황으로 적절한 배양방법의 확립이 필요한 실정이다.

과거 소와 돼지 등의 미성숙 난자 체외성숙에서 배양액에 혈청을 첨가하여 효율을 향상시키는 연구가 많았다 [10-15]. 난자의 체외성숙 또는 체외배양에 이용되는 혈청에는 호르몬, 성장인자, 영양소, cytokine 및 각종 확인되지 않은 여러 물질이 포함되어 있어 세포배양이나 난자의 성숙 및 배발달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[16-18]. Estrus goat blood serum (gBS), fetal bovine serum (FBS), fetal calf serum (FCS) 및 bovine serum albumin (BSA) 등 다양한 혈청물질들이 연구되어 난자의 핵 성숙, 세포질 성숙 및 수정란의 배발달에 효과가 있음을 증명하였다 [19-20]. 하지만 이 혈청들의 정확한 작용기전이 밝혀지지 않았으며, 체외배양 배지에 혈청의 첨가가 large offspring syndrome (LOS)와 같은 부작용이 있어 [21] 최근에 들어서는 무혈청 배지를 이용하는 경우도 있다. 몇몇 연구에서는 poly-vinyl alcohol을 혈청을 대체하는 물질로 체외배양 배지에 첨가하여 체외수정란 생산효율을 향상시킨 결과도 있었다[19]. 또한, 발정주기에 있는 동물은 난소의 발달에 필요한 호르몬과 난포액의 성분이 되는 여러 물질들이 혈액을 통해 공급을 받는다. 이와 같은 원리로 체내에서 배발달이 이뤄지는 곳인 난관의 난관액 역시 혈액을 통해 공급받은 물질들로 이뤄졌다 볼 수 있어, 발정주

기에 있는 염소의 blood serum (gBS)을 수정란 체외배양 배지에 첨가하는 시도가 필요할 것으로 생각된다. 이 모든 연구가 소와 돼지의 난자를 이용한 것으로 국내에서 염소에 적용한 연구는 현재까지 없었다.

따라서 본 연구에서는 염소 수정란의 체외배양 효율 향상을 위해 체외배양용 배지에 FBS, gBS 및 PVA 첨가에 대한 배발달 및 apoptosis 발생률 분석을 실시하여 각 첨가물의 효과를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시약

본 연구에서 특별히 명시하지 않은 화학물질들은 Sigma-Aldrich Korea (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2 난소 채취 및 난자 회수

체외수정란 생산을 위해 도축장에서 도축된 염소의 난소를 적출하여 50 µg/ml Gentamicin 0.9%가 함유된 32°C 내외의 생리식염수에 담아 1-2시간 내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 항생제가 첨가된 새로운 32~35°C 생리식염수로 3-4회 세척하였다. 세척된 난소는 21게이지 바늘이 장착된 10 ml 멸균주사기를 이용하여 난포액을 회수하여 15 ml 튜브에 모아 32~35°C 항온수조에 정치하였다. 정치된 난포액의 상층액을 제거하고, 침전물은 10 mM HEPES, 0.013 mM kanamycin 이 포함된 TCM-199로 2회 세정하여 현미경을 통해 난자를 회수하여 체외성숙 실험에 이용하였다.

2.3 체외성숙

난자의 체외성숙은 기본적으로 3층 이상 난구세포로 둘러싸인 Cumulus oocyte complex (COC)를 골라 10 mM HEPES, 0.013 mM kanamycin, 0.2 mM sodium pyruvate, 1 µg/ml Epidermal Growth Factor (EGF), 1 µg/ml, Follicular Stimulating Hormone (FSH, Folltropin-V, Bioniche Co., Canada) 그리고 발정주기에 있는 염소의 혈액에서 혈청 (gBS, goat blood serum)을 분리하여 10% 첨가된 TCM-199 (IVM medium)을 준비하여 3회 세정하고, 500 µl의 IVM medium이 채워진 4-well dish에 옮겨 38.5°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때

사용된 IVM medium은 배양기에서 20시간 전후로 전 배양하여 사용하였다. 체외성숙 배양 24시간 후에 COC는 0.1% hyaluronidase에서 난구세포를 제거하고 체외수정을 위해 제1극체의 유무로 난자의 성숙을 판단하였다.

2.4 체외수정 및 체외배양

체외수정을 위해 국립축산과학원 가축유전자원센터에서 생산된 염소 동결정액과 114 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 15 mM sodium lactate, 2 mM CaCl₂·2H₂O, 0.5 mM MgCl₂·6H₂O, 0.5 mM sodium pyruvate, 8 mg/ml bovine serum albumin(BSA), 0.75 µg/ml kanamycin으로 구성된 체외수정 배지를 이용하였다. 성숙된 난자는 2x10⁶의 정자와 38.5℃의 5% CO₂ 배양기에서 6시간동안 공배양 하였다. 이후 0.1% hyaluronidase를 이용하여 투명대에 붙어있는 정자를 제거하고 103 mM NaCl, 7.2 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 5.6 ml/L Na-lactate, 0.13 mM kanamycin, 25 mM NaHCO₃, 0.3 mM Na-pyruvate, 0.5 mM MgCl₂·6H₂O, 1.7 mM CaCl₂·2H₂O, 1.5 mM D-glucose, 2% essential amino acids, 1% non-essential amino acids, 1 mM L-glutamin, 10 ng/ml EGF로 구성된 mSOF를 기본으로 체외배양 효율 향상 실험을 위해 10% fetal bovine serum(FBS), 10% gBS, 0.1 mg/ml poly vinyl alcohol (PVA) 가 첨가된 배지에서 6일간 배양하여 배발달을 확인하였다.

2.5 TUNEL 분석

염소의 배반포에서 apoptosis된 세포를 알아보기 위해 TUNEL assay kit (In Situ Cell death detection kit, TMR red)를 이용하여 제조 회사의 지침에 따라 진행하였다. 체외수정 6일 후 배반포를 회수하여 0.1% PVA가 포함된 phosphate buffer saline (PBS)에서 5분간 3회 세정하고, 4% paraformaldehyde가 포함된 PBS-PVA에서 1시간동안 실온에서 고정을 진행하였다. 고정된 배반포는 permeabilization을 위해 1% triton X-100, 0.1% sodium citrate solution이 함유된 PBS-PVA에 30분간 실온 처리하였다. Permeabilization 후, 배반포는 PBS-PVA에 3회 세정하고 TUNEL reaction medium (Enzyme solution : Label solution = 1 : 9)에 37℃ 배양기에 1시간 처리하였다. 1시간 후 PBS-PVA에 세정 후 Hoechst 33342로 배반

포의 핵을 염색하고 mounting medium (Vectashield, Vector Laboratories, Inc, CA)을 이용하여 slide glass에 배반포를 고정하였다. 준비된 slide glass는 현미경을 통해 핵 (Blue fluorescence)과 apoptosis가 일어난 세포 (Red fluorescence)를 확인하여 두 이미지를 merging하여 겹치는 부분 (Violet color)을 배반포내 apoptosis로 판정하였다 (Fig. 1).

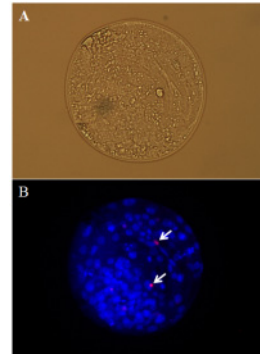


Fig. 1. Apoptosis analysis in blastocyst by TUNEL. (A) bright field image (B) merged image between DAPI (blue) and TUNEL (red). The white arrow was indicated that apoptosis cell.

2.6 통계분석

본 연구에서 얻은 모든 백분율 데이터는 평균±표준의 표준오차(SEM)로 나타내었다. 실험 결과의 통계학적 분석을 위하여 SAS (Statistical Analysis System) package를 이용하였으며, GLM (General Linear Models) procedure를 적용하여 각 요인별 least square means를 구하여 처리군간 유의성을 검정하였다. 본 연구에서 나타난 결과들에 대한 통계적 유의차는 P<0.05 이하인 것만 표기하였다.

3. 결과

3.1 혈청 및 PVA가 체외배양에 미치는 효과

체외성숙된 난자를 이용하여 체외수정을 통해 얻은 수정란을 다른 체외배양 배지로 배양한 결과는 Table 1과 같다. 난할물에서는 아무것도 처리하지 않은 대조군에서 유의차 있게 낮은 결과를 보였으며 FBS, gBS 및 PVA 처리군에는 차이를 보이지 않았다. 하지만 배반포 형성률에서는 대조군이 가장 낮았고 gBS와 PVA를 처리가 두

Table 1. Effects of different serum and PVA on the embryo development of goat.

Treatments	No. of examined oocytes	No. of embryos developed to (% ± SEM)	
		2-cell	Blastocyst
Control (Non serum)	106	87 (82.01 ± 2.63 ^a)	14 (13.44 ± 1.67 ^a)
FBS	106	105 (96.36 ± 1.59 ^b)	26 (24.17 ± 1.95 ^b)
gBS	108	105 (96.88 ± 1.10 ^b)	35 (31.95 ± 1.43 ^c)
PVA	109	103 (97.28 ± 0.96 ^b)	38 (35.29 ± 1.23 ^c)

^{a-c} Different letters with in a column are significantly different (P<0.05).

Table 2. Effects of different serum and PVA on the embryo development of goat.

Treatments	No. of examined blastocyst	Total cell No.	Apoptosis cell No.	Apoptosis of Ratio
Control (Non serum)	10	556	21	3.78
FBS	10	791	16	2.02
gBS	10	846	12	1.42
PVA	10	887	13	1.47

그룹간 유의차는 없었으나 대조군 및 FBS처리보다 유의 차있게 높은 배반포 형성률을 보였다.

3.2 배반포에서 apoptosis 발생률 확인

TUNEL assay kit을 통해 각 그룹별 배반포에서 총세포수에 따른 apoptosis의 비율을 조사하였다. 그 결과는 Table 2와 같다. 각 그룹별 10개씩의 배반포를 TUNEL assay를 통해 총세포수와 apoptosis 비율을 조사한 결과 배반포 발달률 결과와 유사한 결과를 보였다. 각 그룹별 배반포의 총세포수를 조사한 결과 대조군 (무혈청)에서 가장 적은 수의 총세포수를 보였고 gBS와 PVA 처리군에서 가장 많은 총세포수를 보였다. 총세포수에 따른 apoptosis 세포수의 비율을 알아보았을 때도 같은 결과를 보였다.

4. 고찰

본 연구는 염소 수정란의 체외배양 효율 향상을 위해 체외배양용 배지에 FBS, gBS 및 PVA 첨가에 대한 배반포 발달 및 apoptosis 발생률 분석을 통해 각 첨가물의 효과를 조사하였다.

난자 체외성숙 또는 수정란 체외배양에 이용되는 혈청에는 호르몬, 성장인자, 영양소, cytokine 등 난자의 성숙과 수정란 배발달에 긍정적 효과를 보이나, 아직까지 확인되지 않은 여러 물질이 다수 포함되어 있다. 그런 이유로 미성숙 난자 체외성숙 또는 수정란 체외배양 배양액에 난포액이나 FBS 같은 혈청을 첨가하여 효율을 향상시키는 연구가 많았다 [10-15].

본 실험에서는 기본 체외성숙 배양액에 10% gBS, 10% gFF를 첨가하여 혈청 유무에 따른 효과와 이와 더불어 혈청의 대체 물질로서 0.1 mg/ml PVA의 효과를 알아보았는데, 우선 무혈청과 혈청 배지의 난할 및 배반포 형성률을 비교해 보았을 때, 혈청배지에서 체외 배양된 수정란이 무혈청 배지보다 난할률과 배반포 형성률 모두 향상된 결과를 보였다 (Table 1). 혈청배지 중에서도 발정주기에 있는 염소의 혈액에서 추출한 혈청 gBS의 첨가가 무혈청과 FBS 처리군과 비교하여 난할률과 배반포 형성률 모두 유의적으로 향상되는 결과를 보였다. 이는 혈청에 존재하는 여러 물질들이 난자의 성숙 및 배발달에 중요한 역할을 한다는 이전 [16] 연구와 같은 결과로 생각된다. 배반포의 품질을 알아보기 위한 배반포 총세포수와, TUNEL assay 결과에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었다 (Table 2). 이 역시 혈청내 성장인자와 같은 물질의

영향으로 총세포수의 증가를 유도하고, apoptosis를 억제하는 cytokine에 의해 apoptosis 비율이 감소한 것으로 추정된다. 체외배양 배지에 혈청의 첨가가 수정란 발달 효율을 향상시킴을 알 수 있었다.

혈청에는 아직 다 밝혀내지 못한 미확인 물질들이 다수 존재하며 LOS와 같은 부작용이 존재한다. 그렇기 때문에 무혈청 배지를 이용하여 배발달 효율을 향상시킬 수 있는 성분이 확실한 물질을 첨가한다. 본 연구에서 이용된 PVA 역시 다른 연구에서 혈청을 대체한 결과도 있다 [19]. 염소의 수정란에서 PVA의 효과를 조사한 결과 FBS보다 배발달이나 수정란의 품질이 유의적으로 우수하다는 결과를 얻을 수 있었고, gBS 첨가와 비교하여 비슷한 수준의 배발달과 배반포 품질의 결과를 얻을 수 있었다.

결론적으로 본 연구의 결과 염소의 체외배양 효율 향상을 위해서는 무혈청 배지나 FBS첨가 보다는 gBS나 PVA의 첨가가 배발달률과 배반포 품질에 있어 보다 효율적임을 알 수 있었다. 하지만 gBS의 성분중 확인되지 않은 많은 물질들의 알 수 없는 위험성을 감안한다면, PVA의 첨가가 보다 안전하고 효율적일 것으로 사료되며, 이후의 연구에서는 PVA의 효과를 더욱 뒷받침 할 수 있는 유전적 분석과 같은 추가적인 데이터가 필요할 것으로 생각된다.

References

- [1] I. Wilmut, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, K. H. Campbell, "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells", *Nature*, Vol.385, pp.810-813, 1997.
DOI: <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- [2] NAR. Sá, LA. Vieira, ACA. Ferreira, J. Cadenas, JB. Bruno, C. Maside, FGC. Sousa, FWS. Cibir, BG. Alves, APR. Rodrigues, JH. Leal-Cardoso, EL. Gastal, JR. Figueiredo, "Anethole Supplementation During Oocyte Maturation Improves *In Vitro* Production of Bovine Embryos", *Reprod. Sci.*, Vol.26, in press, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1177/1933719119831783>
- [3] MVO. Santos, LE. Nascimento, ÉA. Praxedes, AA. Borges, AR. Silva, LM. Bertini, AF. Pereira, "Syzygium aromaticum essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development", *Theriogenology*, Vol.128, No.1, pp.74-80, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.031>
- [4] Z. Cao, D. Gao, X. Tong, T. Xu, D. Zhang, Y. Wang, Y. Liu, Y. Li, Y. Zhang, Y. Pu, Melatonin improves developmental competence of oocyte-granulosa cell complexes from porcine preantral follicles", *Theriogenology*, Vol.15, No.133, pp.149-158, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.003>
- [5] J. D. Yoon, S. U. Hwang, M. Kim, Y. Jeon, S. H. Hyun, "Growth differentiation factor 8 regulates SMAD2/3 signaling and improves oocyte quality during porcine oocyte maturation *in vitro*", *Biol. Reprod.*, Vol.101, No.1, pp.63-75, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/iox066>
- [6] I. D. Lee, H. D. Park, H. B. Song, "Effects of the additives in the medium for *in vitro* culture of mouse embryos", *Korean J. Animal Reprod.*, Vol.22, No.3, pp.229-235, 1998.
- [7] Bates RD, JA Kontio, WR Dukelow. Chemically defined and serum supplemented media effects on mouse embryo development. *Theriogenology*. Vol.23, pp.697-700, 1985.
- [8] B. D. Bacister, M. L. Leibfried, G. Lieberman, "Development of preimplantation embryos of golden hamster in a defined culture medium", *Biol. Reprod.*, Vol.28, No.1, pp.235-247, 1983.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.1.235>
- [9] A. J. Watson, P. Sousa, A. Caveney, L. C. Barcroft, D. Natale, J. Urquhart, M. E. Westhusin, "Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis", *Bio. Reprod.*, Vol.62, No.2, pp.355-364, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.355>
- [10] M. L. Leibfried-Rutledge, E. S. Critser, N. L. First , "Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes", *Biol Reprod.*, Vol.35, No.4, pp.850-857, 1986.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.4.850>
- [11] M. DelCollado, N. Z. Saraiva, F. L. Lopes, R. C. Gaspar, L. C. Padilha, R. R. Costa, G. F. Rossi, R. Vantini, J. M. Garcia, "Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos", *Reprod. Fertil. Dev.*, Vol.28, No.11, pp.1721-1732, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1071/RD15067>
- [12] B. Avery, L. Strøbech, T. Jacobsen, I. B. Bøgh, T. Greve, "In vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development", *Theriogenology*, Vol.59, No.3-4, pp.987-99, 2003.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01139-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01139-1)
- [13] G. Puri, S. S. Chaudhary, V. K. Singh, A. K. Sharma, "Effects of fetal bovine serum and estrus buffalo serum on maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes *in vitro*", *Vet. World*, Vol.8, No.2, pp.143-146,

2015.
DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.143-146>
- [14] Y. S. Zheng, M. A. Sirard, "The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes", *Theriogenology*, Vol.37, No.4, pp.779-790, 1992.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90041-O](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90041-O)
- [15] Y. Ducolomb, H. González-Márquez, R. Fierro, I. Jiménez, E. Casas, D. Flores, E. Bonilla, Z. Salazar, M. Betancourt, "Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization", *Theriogenology*, Vol.79, No.6, pp.896-904, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.024>
- [16] D. K. Gardner. "Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support", *Cell Biol. Int.*, Vol.18, No.12, pp.1163-1179, 1994.
DOI: <https://doi.org/10.1006/cbir.1994.1043>
- [17] K. P. McNatty, D. M. Smith, A. Markris, R. osathanonch, K. J. Ryan, "The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Vol.49, No.6, pp.851-860, 1979.
DOI: <https://doi.org/10.1210/jcem-49-6-851>
- [18] K. P. McNatty and R. S. Sawers, "Relationship between the endocrine environment within the Graafin follicle and the subsequent rate of progesterone secretory human granulosa cells *in vitro*", *J. Endocrinol.*, Vol.66, No.3, pp.391-400, 1975.
DOI: <https://doi.org/10.1677/joe.0.0660391>
- [19] S. K. Cho, G. J. Rho, J. G. Lee, H. J. Lee, S. Y. Choi, C. S. Park, "Effects of different culture conditions on *in vitro* production of bovine embryos", *Korean J. Emb. Trans.*, Vol.15, No.3, pp.271-277. 2000.
- [20] S. E. Mun, B. W. Sim, S. B. Yoon, P. S. Jeong, H. J. Yang, S. A. Choi, Y. H. Park, Y. H. Kim, P. Kang, K. J. Jeong, Y. Lee, Y. B. Jin, B. S. Song, J. S. Kim, J. W. Huh, S. R. Lee, Y. K. Choo, S. U. Kim, K. T. Chang, "Dual effect of fetal bovine serum on early development depends on stage-specific reactive oxygen species demands in pigs", *PLoS ONE*, Vol.12, No.4, e0175427, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175427>
- [21] L. E. Young, K. D. Sinclair, I. Wilmut, "Large offspring syndrome in cattle and sheep", *Reviews of Reproduction*, Vol.3, No.3, pp.155-218, 1998.
DOI: <https://doi.org/10.1530/ror.0.0030155>

김 관 우(Kwan-Woo Kim)

[정회원]



- 2015년 2월 : 충남대학교 대학원 축산학과 (농학석사)
- 2018년 8월 : 충남대학교 대학원 축산학과 (농학박사)
- 2018년 8월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원

<관심분야>

가축번식, 가축육종

전 다 연(Dayeon Jeon)

[정회원]



- 2016년 2월 : 건국대학교 동물생명대학 동물자원과학과 (농학학사)
- 2019년 8월 : 충남대학교 대학원 축산학과 (농학석사)
- 2016년 10월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

가축번식, 가축육종

이 진 욱(Jinwook Lee)

[정회원]



- 2015년 2월 : 전북대학교 축산학과 (농학석사)
- 2016년 10월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

가축영양, 반추미생물

이 성 수(Sung-Soo Lee)

[정회원]



- 1998년 2월 : 제주대학교 대학원 축산학과 (농학석사)
- 2010년 8월 : 제주대학교 대학원 축산학과 (농학박사)
- 1993년 8월~2012년 6월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

• 2012년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터장

<관심분야>

가축번식, 염소개량

이 상 훈(Sang-Hoon Lee)

[정회원]



- 2004년 8월 : 경상대학교 대학원 응용생명과학부 (이학석사)
- 2007년 8월 : 경상대학교 대학원 응용생명과학부 (이학박사)
- 2008년 1월 ~ 2014년 12월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

• 2015년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청국립축산과학원 농업연구관

<관심분야>

분자유종, 염소유전체

김 승 창(Seungchang Kim)

[정회원]



- 1999년 2월 : 전남대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 2009년 2월 : 전남대학교 자연과학대학원 생물학과 (이학박사)
- 2018년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

유전육종, 유전자원 관리

김 찬 란(Chan-Lan Kim)

[정회원]



- 1999년 2월 : 서울대학교 수의과대학 수의학과 (수의학박사)
- 2005년 3월 : 일본 기후연합대학원 수의학과 (수의학박사)
- 2006년 7월 ~ 2014년 10월 : 국립축산검역본부 수의연구사
- 2014년 10월 ~ 현재 : 국립축산과학원 수의연구사

<관심분야>

수의학, 예방의학, 친환경경