



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0037420
(43) 공개일자 2024년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/073 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0604 (2013.01)

C12N 5/0605 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0115659

(22) 출원일자 2022년09월14일

심사청구일자 2022년09월14일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

조종기

대전광역시 유성구 가정로 43, 103동 1201호(신성동, 한올아파트)

모하메드 이슬람 모하메드 사아델딘

대전광역시 유성구 어은로 57, 113동 1306호(어은동, 한빛아파트)

(74) 대리인

최규환

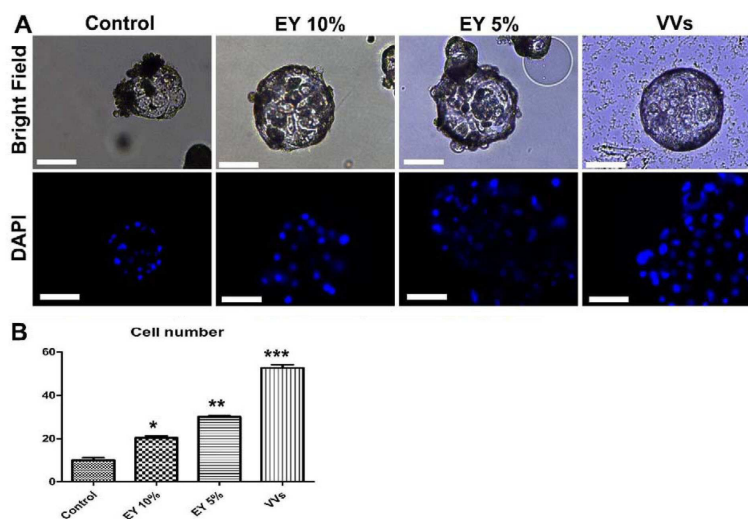
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 난황 소포체를 포함하는 포유동물 배아 발달 향상용 배지 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 난황 유래 소포체를 유효성분으로 포함하는 포유동물의 배아 발달 향상용 배지 조성물 및 상기 조성물을 이용한 포유동물의 체외배양 배아 발달률 향상 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12N 2500/80 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711168266
과제번호	2021R1A2C2009294
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	Cellular reprogramming 및 착상 과정에서 엑소좀 기능 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

난황 유래 소포체를 유효성분으로 포함하는 포유동물의 배아 발달 향상용 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 난황 유래 소포체는 단백질 총 함량 기준 30~40%의 알부민, 16~18%의 아포비텔레닌-1(apovitellenin-1), 10~14%의 오보트랜스페린(ovotransferrin), 5~6%의 아포지질단백질 A-I, 4~5%의 Ig-유사 도메인 함유 단백질(Ig-like domain-containing protein) 및 4~5%의 아포지질단백질 B를 함유하는 것을 특징으로 하는 포유동물의 배아 발달 향상용 배지 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 난황 유래 소포체는 1×10^5 입자/ml 내지 1×10^7 입자/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 포유동물의 배아 발달 향상용 배지 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 난황 유래 소포체는 배반포 세포의 총 세포수를 증가시키고, 세포사멸(apoptosis)을 억제하고, 세포 부착율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 포유동물의 배아 발달 향상용 배지 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 포유동물은 인간을 제외한 동물인 것을 특징으로 하는 포유동물의 배아 발달 향상용 배지 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 배아는 체내수정란, 체외수정란, 단위발생란(parthenogenetic embryo) 또는 복제수정란인 것을 특징으로 하는 포유동물의 배아 발달 향상용 배지 조성물.

청구항 7

난황 유래 소포체를 유효성분으로 포함하는 포유동물 배아의 체외배양용 배지에 포유동물 배아를 첨가하여 체외 배양시키는 단계를 포함하는, 포유동물의 체외배양 배아 발달을 향상 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 체외배양용 배지는 난황 유래 소포체를 1×10^5 입자/ml 내지 1×10^7 입자/ml의 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 포유동물의 체외배양 배아 발달을 향상 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 난황 소포체를 포함하는 포유동물 배아 발달 향상용 배지 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포유동물의 수정란을 체외에서 배양할 수 있다는 것은 가축 등의 포유동물 증식 및 개량에 있어서 매우 유용한 기술이 된다. 특히 최근에는 동물 형질전환기술 및 복제동물 생산 기술의 유용성이 전 세계적으로 인정되면서 포유동물의 수정란을 체외에서 조작하는 것이 필수적인 과정이 되었다. 상기 체외조작은 체외배양을 전제로 하여 이루어지는 과정이기에, 보다 간편하고 안정적인 체외배양 기법을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 배아 할구에서 아포토시스(apoptosis)의 발생은 수정란의 초기 배발생을 저하하는 주요한 요인인 것으로 보고되었다(Juriscova A et al., Mol Hum Reprod (1996) 2:101-106). 따라서, 수정란의 체외배양 시 아포토시스 발생을 억제함으로써 배발달률을 향상시키는데 초점을 맞추어야 한다.

[0004] 난황(egg yolk)은 전체 달걀 구조의 약 3분의 1을 구성하며, 닭 배아 발달에 필수적인 대사물질과 영양소가 풍부하게 함유되어 있다. 그러나 난황 유래 지질막 소포체가 배아발달에 미치는 영향은 아직 밝혀지지 않았다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제2354994호에는 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime, 6-Bio)을 이용한 '6-Bio를 포함하는 포유동물 배아 발달 향상용 배지 조성물 및 이를 이용한 배양 방법'이 개시되어 있고, 한국 공개특허 제2021-0074852호에는 '아메로카나 난황 추출물을 유효성분으로 포함하는 정액 동결 보존용 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '난황 소포체를 포함하는 포유동물 배아 발달 향상용 배지 조성물 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 종래 포유동물의 체외 발육이 체내 배아에 비해 낮은 발육능을 보이고 있어 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

[0007] 본 발명에서는 난황 유래 소포체를 분리 및 특성화한 후 돼지의 단위생식 배아를 대상으로 효과를 확인한 결과, 난황 유래 소포체가 배반포 세포의 총 세포 수를 증가시킬 뿐만 아니라, 세포사멸(apoptosis)을 억제하고, 세포 부착율을 증가시키며, 항산화 효과가 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 난황 유래 소포체를 유효성분으로 포함하는 포유동물의 배아 발달 향상용 배지 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 난황 유래 소포체를 유효성분으로 포함하는 포유동물 배아의 체외배양용 배지에 포유동물 배아를 첨가하여 체외배양시키는 단계를 포함하는, 포유동물의 체외배양 배아 발달률 향상 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 난황 유래 소포체를 포함하는 배지 조성물은 포유동물의 체외배양 배아의 발달률을 증대시키고, 배아 세포의 세포사멸을 억제시켜 내부세포외 영양막 세포를 포함한 전체 세포 수를 증가시킴으로써 배양된 포유동물 배아를 질적으로 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 난황 유래 소포체는 배아 부착을 크게 향상시킬 수 있으므로 배반포의 착상 잠재력 증진에도 기여할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 난황 유래 소포체(vitellocicles, VVs)의 획득 과정을 보여주는 것으로, VVs는 표적 나노여과법으로 분리하였으며, 나노사이트(Nanosight) 나노입자 추적분석으로 특성을 분석하였다. 그 결과 VVs는 평균 직경이 158.6 ± 20.5 nm이고, 농도는 1.1×10^8 입자/ml (희석배율 20 X)인 것으로 확인되었다. VVs는 극저온 투과 전자 현미경으로 시각화되었으며, 이중지질(bilipid) 소포체로 확인되었다(화살표).

도 2는 난황(EY) 또는 난황 유래 소포체(VVs)가 돼지 배아 발달에 미치는 영향을 분석한 결과이다. (A)는 매트릭셀 코팅 접시에서 Day-7 Zona-free 배아(n=20, 3 반복)에 난황 10%, 5% 또는 2.6×10^6 입자/ml의 VVs를 처리한 후 48시간 배양한 후의 명시야(bright field)에서 촬영된 모습 및 대조염색인 DAPI 염색의 결과를 보여준다(스케일바 = 100 μ m). (B)는 대조군(control, 일반배지 조건) 및 각 실험군의 세포수를 나타낸 그래프로, 각 수치는 분산 분석과 비교한 다음 Tukey's 검정을 수행하여 그룹 간의 차이를 확인하였다. 별표(*, **, ***) 표시는 통계적으로 유의함을 의미한다(P<0.05).

도 3은 난황 유래 소포체(VVs)가 돼지 배아의 세포사멸(apoptosis)에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 4는 난황 유래 소포체(VVs)가 돼지 배아의 부착 및 발달에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 5는 CMF2HC (4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin) 및 H2DCFDA (2',7'-

dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하여 난황 유래 소포체(VVs)가 GSH 및 활성산소종(ROS) 수준에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 6은 난황 유래 소포체(VVs)로 처리된 배아에서 *BAX* (*BCL2 Associated X*), *BCL2*, *SOD1* (*Superoxide Dismutase 1*), *LIPE* (*Lipase E, Hormone Sensitive Type*) 및 *MGL* (*Monoglyceride Lipase*) 유전자의 mRNA 전사체 수준을 분석한 RT-qPCR 결과이다. qPCR 분석에는 4회 반복실험에 대해 각 그룹에서 5개 배반포체를 사용하였다. 평균값은 대조군에 정규화되어 임의 단위로 표현하였으며, 데이터는 평균±표준편차로 나타났다. 두 그룹 간의 차이는 Student's t-검정으로 비교되었으며, 별표(*) 표시는 통계적으로 유의한 것을 의미한다($P<0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 난황 유래 소포체를 유효성분으로 포함하는 포유동물의 배아 발달 향상용 배지 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 명세서에서 용어 "배아 발달"이란 이에 한정되는 것은 아니나, 배반포 세포의 발달을 의미한다. 상기 배반포는 수정란이 난황을 거둬들이는 자라는 과정에서 치밀화된 상질배 이후에 배반포강을 형성하여 태아로 분화할 내세포괴(inner cell mass)와 태반으로 분화할 영양막세포(trophectoderm)로 구분이 될 정도로 발육된 상태의 수정란을 의미한다.
- [0014] 본 발명에 따른 배지 조성물에 있어서, 상기 난황 유래 소포체는 카고 단백질 총 함량 기준 30~40%의 알부민, 16~18%의 아포비텔레닌-1(apovitellenin-1), 10~14%의 오보트랜스페린(ovotransferrin), 5~6%의 아포지질단백질 A-I, 4~5%의 Ig-유사 도메인 함유 단백질(Ig-like domain-containing protein) 및 4~5%의 아포지질단백질 B를 함유하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 또한, 본 발명에 따른 상기 난황 유래 소포체는 평균 입자크기 158.6 ± 20.5 nm의 이중지질(bilipid) 소포체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 배지 조성물에 있어서, 상기 난황 유래 소포체는 바람직하게는 1×10^5 입자/ml 내지 1×10^7 입자/ml의 농도로 포함되는 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 1×10^6 입자/ml 내지 1×10^7 입자/ml의 농도로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 예에 있어서, 상기 난황 유래 소포체를 통상적인 포유동물 배아 배양에 이용되는 기본 배지에 첨가하여 사용할 수 있다. 상기 기본 배지는 포유동물의 종(species)에 따라 차이가 있으나, 무기염류, 탄소원, 아미노산, 소 혈청 알부민 및 보조인자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하며, 당업자에게 알려진 일반적인 배지를 모두 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 무기염류로는 염화나트륨, 염화칼륨 및 탄산수소나트륨 등을 사용할 수 있고, 탄소원으로는 글루코즈, 피루베이트 및 젖산칼슘염 등을 사용할 수 있으며, 아미노산으로는 글루타민을 비롯한 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 보조인자로 는 기타 미량원소 및 완충액 등을 사용할 수 있다. 또한 상기 기본 배지는 항생제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 배지 조성물을 적용시킬 수 있는 포유동물은 인간을 제외한 동물일 수 있고, 바람직하게는 돼지, 소, 양, 염소 또는 말 등의 가축일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 돼지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 또한, 본 발명의 배지 조성물에 있어서, 상기 배아는 체내수정란, 체외수정란, 단위발생란(parthenogenetic embryo) 또는 복제수정란일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 체외배양 시 배발생 정지현상을 보이는 수정란을 대상으로 할 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 "체외수정란"이란 난자와 정자를 채취하여 체외에서 수정시킨 것을 말하고, "복제수정란"은 체세포 공여핵을 유전물질이 제거된 수핵 난자에 주입한 후 물리적 또는 화학적 방법으로 융합시킨 것을 의미한다. 또한, 용어 "단위생식"이란 단성생식, 단위발생, 단성발생이라고도 하며, 수정 시 융성 전핵이 자성 전핵과 융합하지 않아서 할구나 배세포가 자성전핵에서만 유래하는 핵을 갖게 되는 개체발생을 의미한다.
- [0022] 본 발명에 따른 배지 조성물은 수정란의 세포 사멸을 억제하고, 세포 부착을 증가시키며, 항산화 효과가 있는 난황 유래 소포체를 유효성분으로 포함하고 있어 포유동물의 배아 발달률을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.
- [0023] 본 발명은 또한, 난황 유래 소포체를 유효성분으로 포함하는 포유동물 배아의 체외배양용 배지에 포유동물 배아를 첨가하여 체외배양시키는 단계를 포함하는, 포유동물의 체외배양 배아 발달률 향상 방법 또는 포유동물 배아

의 체외배양 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 난황 유래 소포체 및 포유동물 배아는 전술한 것과 같다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "체외배양"이란 수정란이 체내에서 자라는 상태와 구분되는 방법으로 실험실의 인큐베이터(incubator)에서 체내 자궁의 환경과 유사한 조건으로 배양하는 일련의 실험실 과정을 의미하는 것으로, 본 발명의 난황 유래 소포체를 유효성분으로 포함하는 포유동물 배아의 체외배양용 배지는 이러한 체외배양에서 포유동물의 배아 발달률을 향상시킬 수 있는 배지이다.

[0026] 본 발명에 따른 상기 체외배양의 방법은 당업계에 공지된 통상적인 체외배양 방법으로 수행될 수 있으며, 포유동물 배아의 종류 및 상태에 따라 당업자가 적절하게 변형하여 수행될 수 있다.

[0028] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 재료 및 방법

[0031] 시약

[0032] 달리 명시되지 않은 한, 본 발명의 화합물 및 시약은 Sigma-Aldrich (미국)사의 제품을 구매하여 사용하였다.

[0034] 난황 유래 소포체(egg yolk vesicles, VVs) 분리 및 특성 분석

[0035] VVs는 PureExo Exosome Isolation kit (101 Bio, 미국)를 사용하여 표적 단백질 결합 및 나노여과로 분리하여 인산염 완충 식염수(PBS)에서 100 μ l의 난황 소포체를 산출하였다. 난황 소포체는 ZetaView PMX 110 (Particle Metrix, 독일) 나노 형광세포 측정기 및 ZetaView 8.05.14 SP7 소프트웨어와 관련된 나노입자 추적 분석 도구 그리고 Microsoft Excel 365 (Microsoft Corporation, 미국)를 통해 특성을 분석하였다. 100 nm 폴리스티렌 입자(Thermo Fisher Scientific)로 교정 후, 1x PBS에서 20배 희석한 시료 1 ml을 기계에 넣고 11개의 서로 다른 위치와 위치당 2개의 판독 주기를 자동으로 설정하여 평균, 중앙값, 모드 크기(직경으로 표시), 농도 및 특이치(outlier) 제거 등을 측정하였다. 난황 소포체는 투과전자현미경(TEM)을 통해 조사되었다. 간단하게, 분리된 난황 소포체 용액의 4 μ l를 2% 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 염색하여 200-메쉬 구리 그리드의 중심에 장착하고 건조시킨 후 120 kV에서 OMEGA-에너지 필터링 TEM(ZEISS LEO 912, Carl Zeiss, 독일)을 통해 시각화하였다. 선택된 일부 mRNAs, miRNAs 및 단백질의 난황 소포체 화물(cargo) 내용물은 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 및 프로테오믹스(proteomics)를 통해 분석되었다.

[0037] 돼지 단위생식 배아(porcine parthenogenetic embryo)의 제조

[0038] 이전의 보고(Fang X et al., Molecular Reproduction and Development. (2021) 89:54-65; Tanga BM et al., Theriogenology. (2022)183:90-7; Saadeldin IM et al., Placenta. (2014) 35:286-8)에 따르면 돼지 단위생식 배아는 시험관 내 성숙한 난모세포의 화학적 단위생식 활성화를 통해 획득되었다. 도축장에서 돼지 난소를 채취하여 30℃에서 4시간 이내에 식염수(NaCl 0.9%)에 담아 실험실로 옮겼다. 난자난구 복합체(cumulus-oocyte complexes, COCs)는 10 ml 주사기에 연결된 18 게이지 바늘에 의해 흡인을 통해 회수되었다. 콤팩트 층 난구세포(cumulus cell)로 둘러싸인 난모세포를 입체현미경(SMZ 745T, 니콘, 일본)을 사용하여 선택하고 0.05% 폴리비닐알코올(TLH-PVA)이 함유된 HEPES 완충 타이로드 배지에서 3회 세척하였다. COCs는 TCM-199 (Gibco, 미국), 10%(v/v) 돼지 난포액(follicular fluid), 시스테인(0.6 mM), 피루브산나트륨(0.91 mM), 표피성장인자(epidermal growth factor, 10 ng/ml), 카나마이신(75 μ g/ml), 인슐린(1 μ g/ml), 인간 융모성 생식선 자극 호르몬(Human chorionic gonadotrophin, 10 IU/ml; Daesung Microbiological Labs, 미국) 및 말(equine) 융모성 생식선 자극 호르몬(10 IU/ml)으로 이루어진 500 ml의 성숙배지가 포함된 4-웰(Nunc, Thermo-Fisher-Scientific)에서 22시간 동안 배양되었다. 그 후, 상기 COCs를 호르몬이 존재하지 않는 동일한 배양 조건으로 이동시켜 22시간 동안 두었다. 성숙한 COCs를 채취하고, 히알루로니다아제(0.6%) 조건에서 피펫팅으로 난구세포를 분리한 후 TLH-PVA에서 세척한 후, 만니톨(0.28 M), 염화칼슘(0.1 mM), HEPES(0.5 mM) 및 황산마그네슘(0.1

mM)으로 구성된 펄스 배지에서 평형화시켰다. 난모세포는 활성화 매질에서 두 전극의 유리 챔버 내부에서 생성된 60 μ s에 대해 1.5 kV/cm의 단일 직류 펄스로 활성화시켰다. 전류는 BTX Electro-Cell Manipulator 2001(BTX Inc., 미국)을 통해 생성되었다. 활성화된 난모세포는 TLH-PVA에서 세척하고 38.5°C(5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂)의 가습 대기에서 미네랄 오일을 덧씌운 porcine zygote medium-5 (PZM-5, Functional Peptides Research Institute Co. Ltd., 일본)의 마이크로드롭에서 7일간 배양하였다. 배반포(blastocyst)를 얻고 PBS에 세척한 후, 0.1%(w/v, in PBS) 프로나제(pronase)를 이용하여 투명대(zona pellucida)를 제거하여 zona-free 배아를 얻었다.

[0040] **배아 부착 모델(Embryo attachment model)**

[0041] 무 지지 세포(feeder-free) 배양 조건에서 배아 부착은 이전 방법(Saadeldin IM et al., Development, Growth & Differentiation (2015)57:362-8)에 약간의 수정으로 확립되었다. 매트릭셀 기반 막 매트릭스(BD Biosciences, 미국)의 50 μ l 마이크로 드롭을 4웰 접시(Nunc)에 올려놓고 38.5°C에서 30분간 배양했다. 매트릭셀을 제거하고 10% 소태아혈청, β -메르캅토에탄올(0.1 mM), 1% 비필수 아미노산(Invitrogen) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신)으로 보충된 DMEM/F-12 배지 50 μ l로 대체했다. 마이크로드롭은 미네랄 오일로 덮여 있고 배아를 배치하기 전에 30분 동안 배양되었다. 7일째에, 배아를 채취하고 38.5°C에서 1분 동안 프로나제를 처리하여 투명대를 제거했다. 배아는 매트릭셀 코팅 마이크로드롭에 넣기 전에 배양 배지로 세척하였다. 그 후, 배아는 38.5°C에서 5% CO₂의 가습된 대기에서 배양되었고 2-5일 동안 부착 및 성장 여부를 모니터링하였다.

[0043] **TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 어세이**

[0044] 제조사의 프로토콜에 따라 In Situ Cell Death Detection TUNEL assay Kit, Fluorescein(Roche Holding AG, 스위스)을 통해 DNA 가닥 절단의 라벨링 및 아포토틱 세포(apoptotic cell)를 검출하였다. 배아를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고 0.1% 트리톤X으로 투과시킨 후, 효소(TdT) 용액과 라벨(fluorescein-dUTP) 용액으로 38.5°C에서 1시간 동안 배양시켰다. 핵은 Vectashield antifade mounting 배지로 대조염색 하였으며, 녹색 형광 신호는 ImageJ 소프트웨어로 캡처, 카운팅 및 계산하였다.

[0046] **배아에서 감소된 글루타티온 및 활성산소종(ROS) 측정**

[0047] 활성산소종(ROS)의 세포 내 수준은 녹색 형광 강도로 표시된 H2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; Invitrogen Corporation, USA)를 사용하여 측정되었다. 청색 형광 염료 CMF2HC (4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin)를 함유한 CellTracker™ Blue를 사용하여 환원된 글루타티온(GSH)의 세포 내 수준을 측정하였다. TLH-PVA에서 각 처리 그룹의 5개의 배반포를 배양하여 어두운 곳에서 30분간 10 μ M H2DCFDA와 10 μ M CellTracker™ Blue를 보충하였다. 그 후, 배반포는 0.1%(w/v) PVA가 함유된 DPBS로 세척되었다. 자외선 필터(ROS의 경우 460 nm, GSH (glutathione)의 경우 370 nm)가 장착된 형광현미경(Epifluorescence microscope, Leica microsystems) 아래에서 10 μ l 방울의 배반포를 관찰하고 형광 강도를 측정하였다. 평가 후 형광 영상은 추가 분석을 위해 TIFF 형식의 그래픽 파일로 저장하였다. ImageJ (버전 1.41; National Institutes of Health, 미국)를 사용하여 형광 강도를 검출하였으며, 대조군의 형광 강도로 정규화하였다.

[0049] **실시간 PCR (polymerase chain reaction)**

[0050] 총 RNA는 RNeasy Micro Kit(Kiagen GmbH, 독일)을 사용하여 배아(n=5, 4 반복)에서 추출되었다. 추출된 RNA의 품질을 결정하기 위해 NanoDrop 2000(Thermo Scientific)을 사용하였으며, cDNA는 2X RT Pre-Mix of QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen)를 사용하여 총 부피 20 μ l(총 RNA 1 μ g, 5×RT 버퍼 4 μ l, 전사효소 1 μ l, oligo dT 프라이머(for mRNAs) 또는 범용 stem-loop 프라이머(for miRNAs) 1 μ l 및 RNase가 없는 증류수)의 반응물로 합성하였다. 상대적인 정량(relative quantitative) PCR은 CFX Connect Real-Time PCR System(Bio-Rad)과 SYBR 2X Real-Time PCR Pre-Mix(BioFACT)를 사용하여 수행하였다. 대상 유전자, 하우스키핑

mRNA 및 snRNA, 프라이머 및 증폭산물 크기에 대한 자세한 내용은 표 1에 나타내었다. 반응 혼합물(20 μ l)은 SYBR Premix(2 $\times$), cDNA(100 ng), 순방향 및 역방향 프라이머(10 μ M), 증류수 6 μ l로 구성하였다.

표 1

[0051]

본 발명에 사용된 프라이머 정보

Name	Sequence 5'→3'		Product size	Accession No.
	Forward	Reverse		
U6	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT (서열번호 1)	CGCTTCACGAATTGCGTGCAT (서열번호 2)	89	NR_004394.1
Bax	ACTTCCTTCGAGATCGGC (서열번호 3)	GGCCACGAAGATGGTCAC (서열번호 4)	110	XM_013998624.2
Bcl2	TTCTCTCGTCGCTACCGC (서열번호 5)	CCAGTTCACCCCATCCCT (서열번호 6)	123	NM_214285.1
ACTB	CCCTGGAGAAGAGCTACGAG (서열번호 7)	GGTGCCACCCGACAGCAC (서열번호 8)	206	XM_021086047.1
SOD1	ACCTGGGCAATGTGACTG (서열번호 9)	CATTTCACCTCTGCCCA (서열번호 10)	147	NM_001190422
MGLL	TATGAGGTGCCTACCAC (서열번호 11)	GTCCTTTGGGAGACCCAT (서열번호 12)	92	NM_001143718.1
LIPE	TGACTCAGACCAGAAGGC (서열번호 13)	CAGCTCCAGGAAGGAGTT (서열번호 14)	115	NM_214315.3
U6: RNU6-1 RNA, U6 small nuclear 1 (house-keeping snRNA; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26827); Bax: BCL2 associated X, apoptosis regulator (causes apoptosis; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/396633); Bcl2: BCL2 apoptosis regulator (antiapoptotic; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100049703); SOD1, superoxide dismutase 1; MGLL, monoglyceride lipase; LIPE, lipase E, hormone-sensitive type				

[0052]

증폭 반응 조건은 95℃(1분)에 이어 95℃(5초, DNA 변성), 60℃(30초, 프라이머 어닐링), 72℃(30초, 확장)의 40 사이클이었다. 프라이머의 특이성은 65 내지 95℃ 범위의 용융곡선 프로토콜에 의해 결정되었다. 표적 유전자의 전사체를 하우스키핑 유전자(ACTB-mRNA 및 U6-snRNA)의 전사체와 비교하였다.

[0054]

LC-MS/MS에 의한 VVs 단백질 분획, 인겔 소화 및 단백질 분석 준비

[0055]

프로토콜은 이전의 보고(Lee H et al., Veterinary Microbiology. (2021) 259:109165)에 따라 수행되었다. 간단하게, VVs 펠릿을 현탁시킨 후 10배 부피의 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 투석하였다(분자 질량 컷오프: 10,000 Da). Bicinchoninic acid 방법을 통해 단백질 농도를 추정 한 후 SDS-PAGE에 의해 단백질을 분획화하였다. Coomassie Brilliant Blue 염색을 위해 겔을 아세토니트릴 50% 및 10 mM 중탄산암모늄 용액으로 탈수한 후 증류수와 100% 아세토니트릴로 2회 행군 후 진공 농축기로 건조하였다. 그 후 겔을 100 mM 아이오도아세트아미드(iodoacetamide)로 처리하여 알킬레이트 S-S 브릿지를 최소화한 후 56℃에서 10 mM DTT (dithiothreitol)와 100 mM 중탄산암모늄의 혼합물을 처리하였다. 그 후, 3배 부피의 증류수로 세척하고 진공 농축기로 건조시켰다. 겔을 50 mM 중탄산암모늄과 10 ng/ml 트립신에서 37℃, 12-16 시간 동안 배양하여 트립신 소화를 진행하였다. 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)이 5% 함유된 50 mM 중탄산암모늄과 50% 아세토니트릴로 처리한 후 트립신 분해 펩티드를 회수하였다. 펩티드 추출물은 추가 분석이 이루어질 때까지 동결건조되어 4℃에서 저장되었다. 트립신 분해 펩티드 추출물을 0.5% 트리플루오로아세트산에 현탁하고 각 시료에서 10 μ l를 MGU30-C18 trapping column (LC packing)에 적재하여 펩티드를 농축하고 잔여 화학물질을 제거하였다. 컬럼으로부터 용출된 농축된 트립신 분해 펩티드는 유속(300 nL/min)이 조정된 10 cm $\times$ 75 μ m I.D. C18 reverse-phase column (PROXEON, 덴마크)에 적재되었다. 그 후 펩티드는 80분 동안 0-65%의 아세토니트릴 농도구배로 회수되었다. MS와 MS/MS 스펙트럼은 LTQ-Velos ESI 이온트랩 질량분석기(Thermo Scientific)를 이용하여 획득하였으며, MASCOT 2.4를 사용하여 MS/MS 데이터를 컷오프 값으로서 FDR(False Discovery Rate) 1%로 분석하였다. 단백질량은 emPAI (exponentially modified protein abundance index)를 통해 추정하였으며, 몰%로 표현하였다. 세 번의 기술적 반복실험이 수행되었으며, 기능 분석 및 유전자 온톨로지(gene ontology)는 DAVID Bioinformatics Resources(NIAID/NIH; <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)을 통해 수행되었다.

[0057] 통계분석

[0058] 분산의 균일성과 분포의 정규성을 확인하기 위해 Lieven의 검정과 Kolmogorov-Smirnov 검정을 각각 사용하였다. 데이터는 평균±표준 오차(SEM)로 표현되었고, unpaired Student t-test 또는 ANOVA를 사용한 후 Tukey의 다중 비교 검정을 통해 조사되었다. 통계적 유의성은 $P<0.05$ 또는 $P<0.01$ 에서 고려되었으며, 통계 분석에는 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., 미국)를 사용하였다.

[0060] 실시예 1. 난황 유래 소포체(VVs)의 분리, 특성 및 카고(cargo) 내용물

[0061] 산란 4시간 이내의 10개의 계란으로부터 난황을 분리한 후 PBS와 1:1의 부피비로 혼합한 후 찌꺼기 제거를 위해 4°C , 20,000 xg, 20분의 조건으로 원심분리를 수행한 후 상층액을 $0.2\ \mu\text{m}$ 필터로 여과한 후 4°C , 100,000 xg에서 3시간 동안 초원심분리하여 펠릿을 얻었다. 펠릿의 나노사이트 분석 결과 분리된 펠릿에서 평균 입자크기 $158.6\pm 20.5\ \text{nm}$ 의 1.6×10^{10} 입자/ml의 소포체 존재가 확인되었다(도 1A). 또한, 크라이오-TEM 이미지는 EV의 외관을 특징짓는 지질 이중층 소포체의 존재를 밝혔다(도 1B 및 1C).

[0062] 펠릿의 단백질 내용물은 트립신으로 처리하여 트립신 분해 펩티드를 얻었으며, MS 및 MS/MS를 통해 추가로 분석하였다. 프로테오믹스를 통해 밝혀진 VVs의 단백질 화물(cargo) 함량 상위에는 알부민(33%), 아포비텔레닌-1(apovitellenin-1, 16.7%), 오보트랜스페린(12%), 아포지질단백질 A-I(5.3%), 아포지질단백질 B(4.5%) 및 비텔로제닌-2(vitellogenin-2, 2%) 등이 포함되어 있었다. 또한, VVs에서 450개의 단백질을 판독할 수 있었으며, VVs의 총 단백질의 약 83.5%를 구성하는 상위 20개 단백질이 서로 다른 세포 기능과 관련된 단백질을 확인할 수 있었다(표 2).

표 2

[0063] VVs의 상위 20개 단백질

UniProt accession	Description	Mol %
P19121	Albumin	33.0337
P02659	Apovitellenin-1	16.6952
P02789	Ovotransferrin	12.0171
P08250	Apolipoprotein A-I	5.3313
A0A3Q2UDA5	Ig-like domain-containing protein	4.7452
F1NV02	Apolipoprotein B	4.4373
P02845	Vitellogenin-2	2.2916
A0A3Q2U347	Vitellogenin-3	0.9761
A0A1D5NUW2	Vitellogenin-1	0.6375
P01012	Ovalbumin	0.5628
R9PXM5	Immunoglobulin lambda like polypeptide 1	0.5059
F1NUL9	Fibrinogen beta chain	0.409
P00698	Lysozyme C	0.3652
F1NDH2	Angiotensinogen	0.3324
A0A1D5PEY8	Lipoic acid cytosolic FA-bd domain-containing protein	0.3239
E1BV78	Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	0.2927
E1C7C1	Complement component C8 beta chain	0.2195
P10184	Ovoinhibitor	0.1798
F1NI07	Insulin-like growth factor binding protein acid labile subunit	0.172
A0A1L1RWRO	Transthyretin	0.1538

[0065] 실시예 2. 돼지 단위생식 배아 부착 및 발달에 미치는 VVs의 영향

[0066] VVs (1.6×10^8 /ml)를 7일째의 부화한 단위생식 배반포(n=160, 각 대조군과 VVs-보충 그룹에서 10개의 배반포

를 사용, 8 반복)의 시험관내 배양 배지에 보충하였다. 배반포 배양 2일 후, 대조군 배아(21.4 ± 4.6)와 비교하여 VVs 처리 배아(62.2 ± 5.3)에서 총 세포 수가 유의하게 증가하였다(도 2). 특히, VVs 처리 배아는 난황 처리(EY 10% 또는 EY 5%) 배아에 비해서도 총 세포 수가 유의하게 증가되었음을 알 수 있었다.

[0067] VVs가 배아 세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 TUNEL 검정을 수행한 결과, VVs 처리군($2.4 \pm 0.9\%$)과 비교하여 대조군($23.1 \pm 3.8\%$)에서 아포토시스 세포가 증가한 것으로 나타났다(도 3). 또한, 매트릭셀 기저막 매트릭스에서 배아를 배양한 결과에서 VVs 처리군은 대조군과 비교했을 때 배아 부착(attachment)과 배아 줄기세포의 성장을 크게 향상시킨 것으로 확인되었다(도 4). 이를 통해 VVs가 배아 세포의 세포 사멸을 효과적으로 억제할 수 있으며, 배반포의 착상 잠재력을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

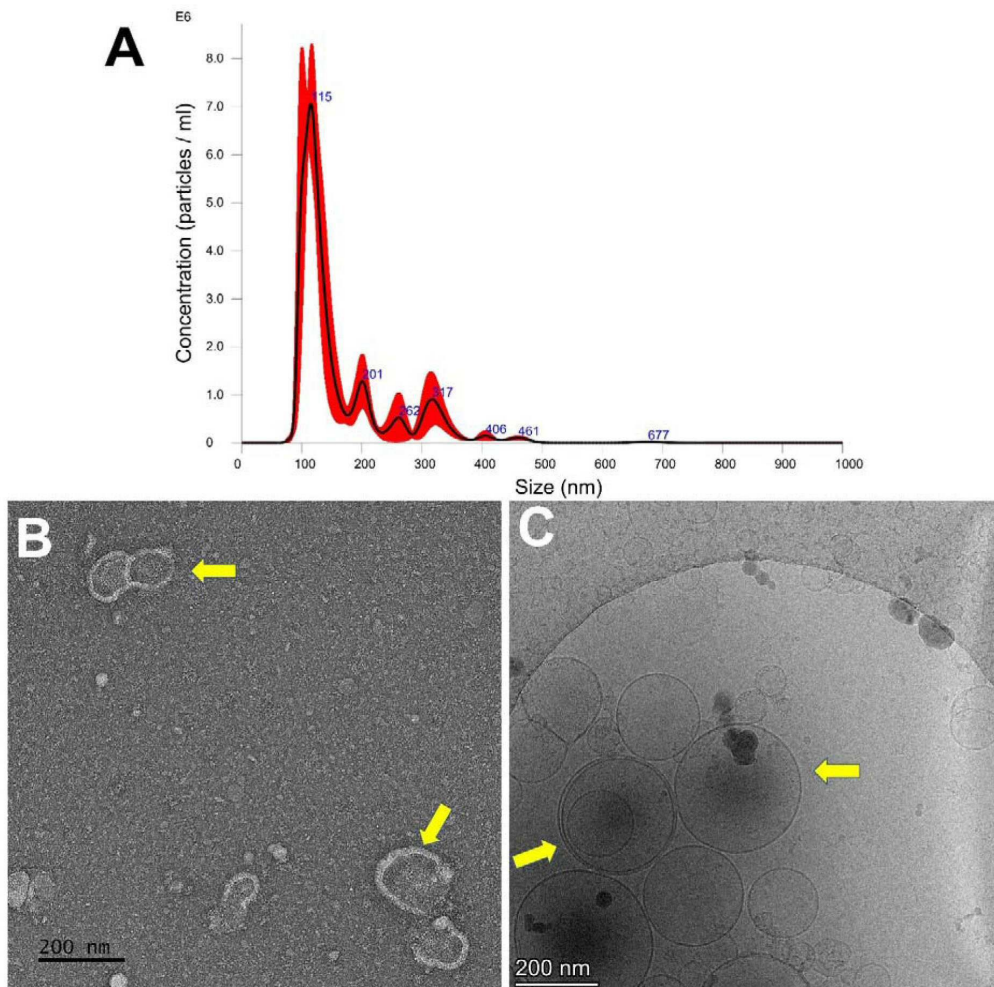
[0068] 또한, 환원된 글루타티온은 VVs 처리군에서 2.5배, 활성산소종(ROS)은 대조군에서 5.3배 높게 확인되어(도 5), VVs이 우수한 항산화 활성을 가지고 있음을 시사하였다.

[0069] qPCR 분석 결과 VVs는 지질대사 관련 유전자(*MGLL* 및 *LIPE*), 항-아포토시스 유전자(*BCL2*) 및 슈퍼옥사이드 효소(*SOD-1*)의 발현을 유의하게 증가시킨 반면, 아포토시스 유전자(*BAX*)의 발현은 유의하게 감소시켰다(도 6).

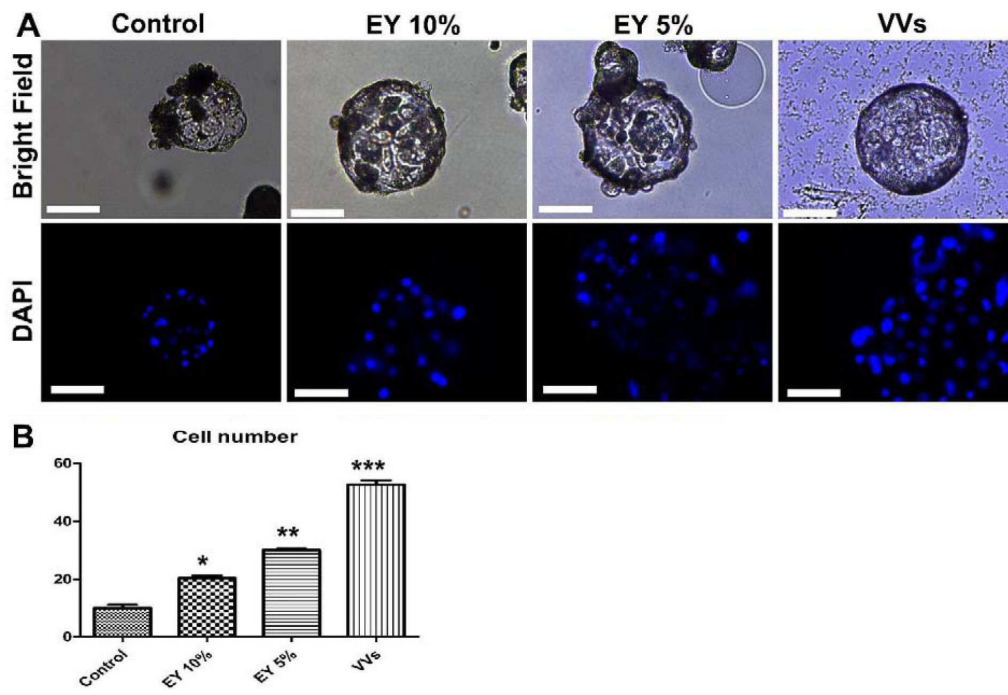
[0070] 이상의 결과를 통해 난황 유래 소포체가 포유동물의 배아 발달을 지원할 수 있는 새로운 체외 배양 배지의 형성에 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

도면

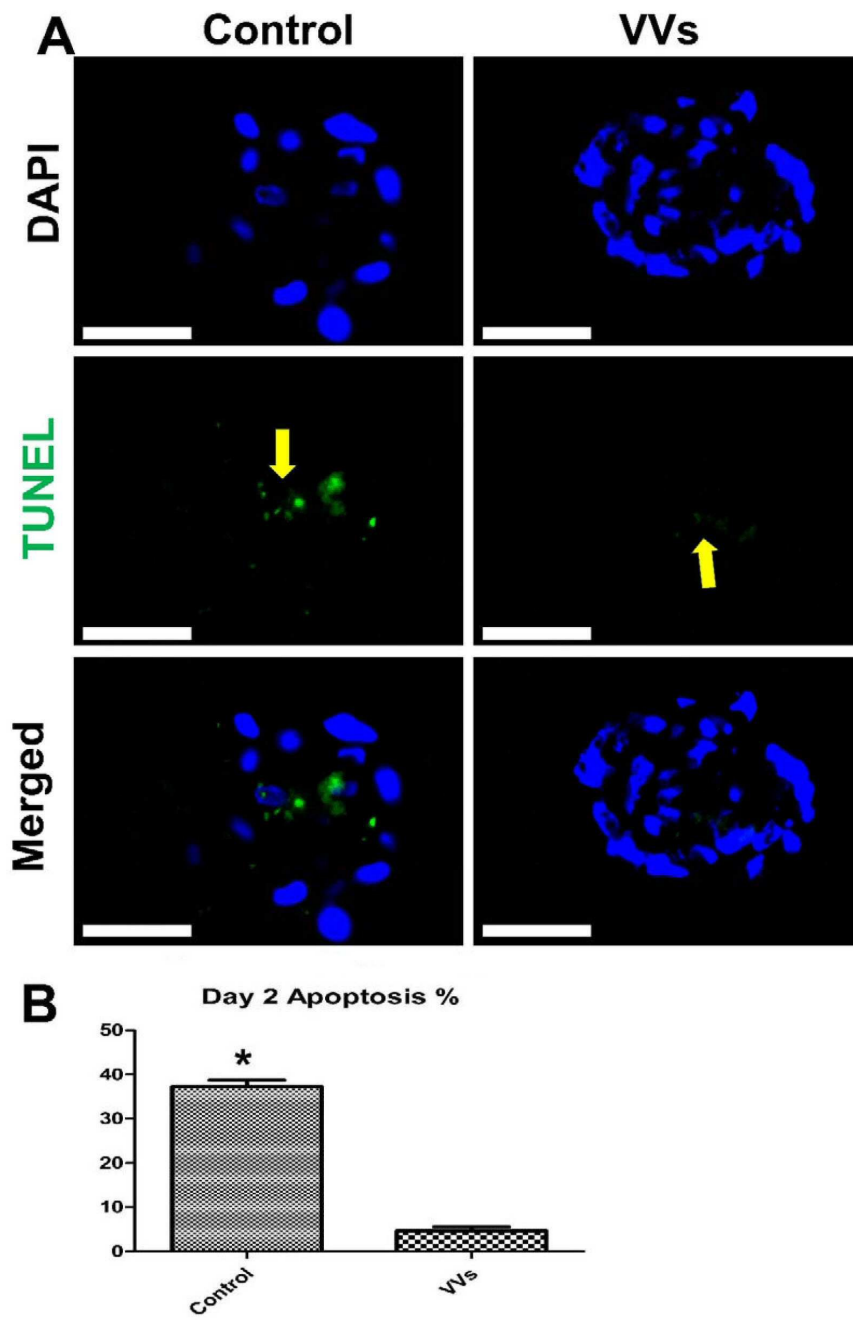
도면1



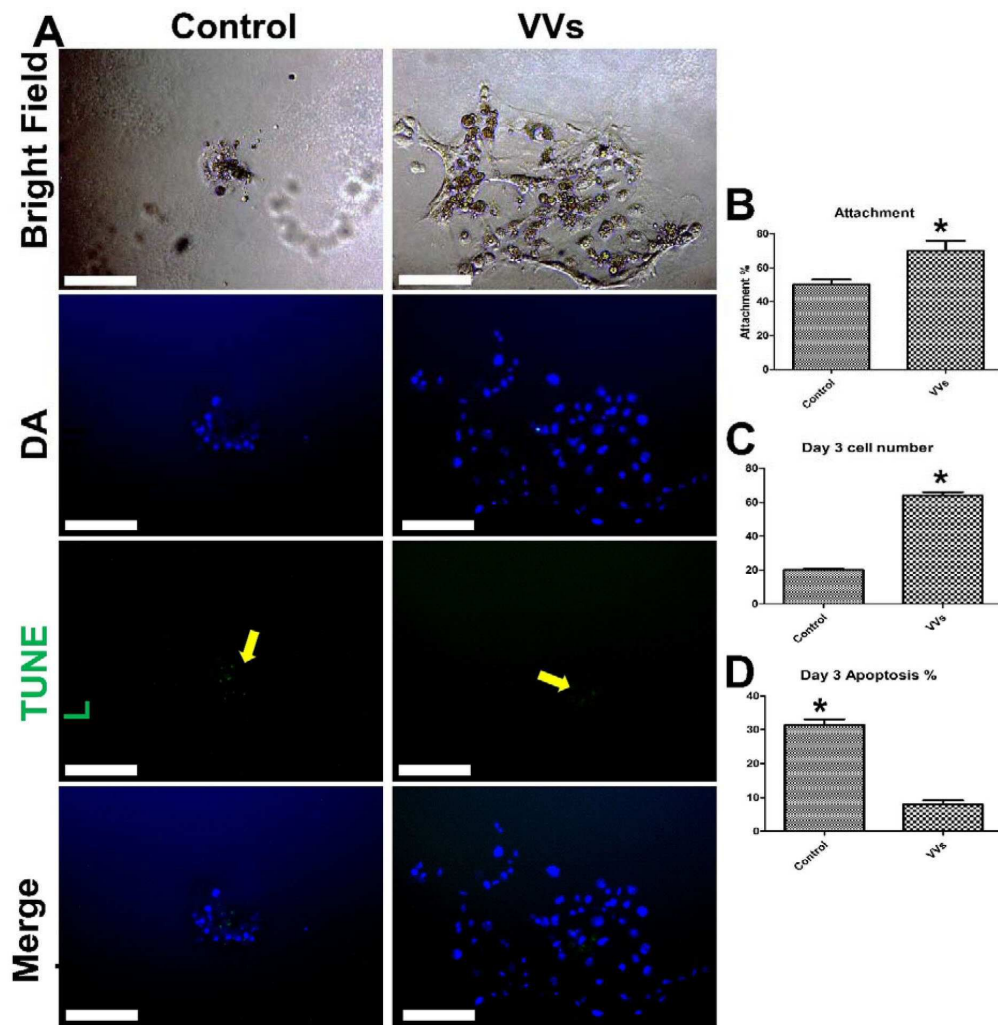
도면2



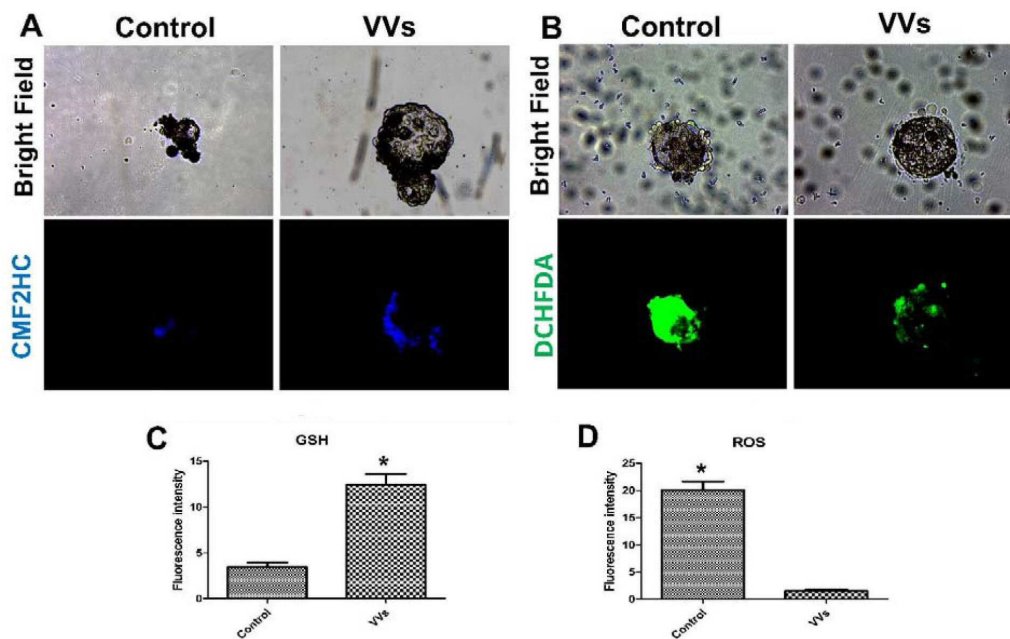
도면3



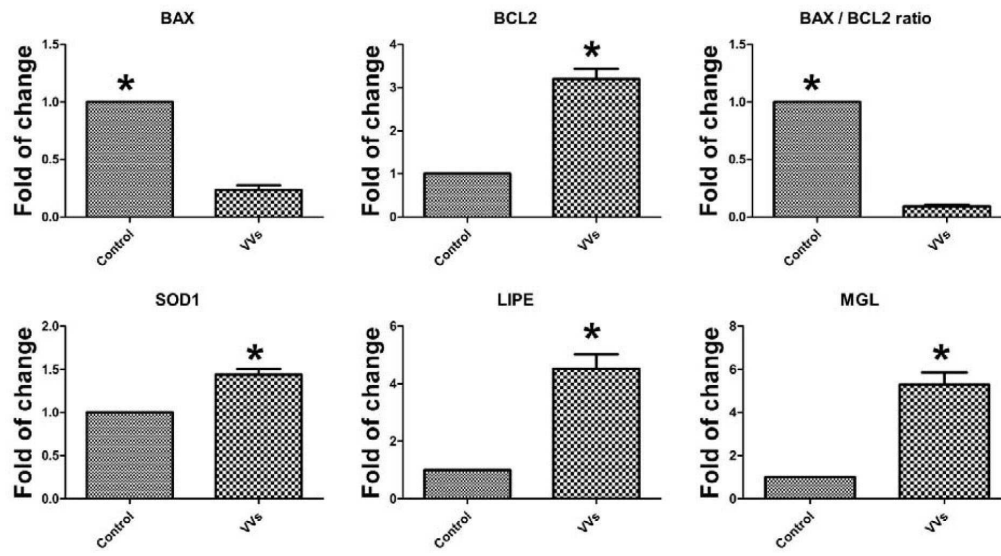
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.