



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0047826
(43) 공개일자 2019년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6827 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2017-0142119

(22) 출원일자 2017년10월30일

심사청구일자 2017년10월30일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

공승표

부산광역시 해운대구 세실로 19, 105동 1602호(좌
동, 해운대대우1차아파트)

남윤권

부산광역시 남구 분포로 113, 223동 903호(
용호동, 엘지메트로시티)

류준형

울산광역시 동구 봉수로 250, 201동 2205호(전하
동, 울산전하푸르지오)

(74) 대리인

위병갑

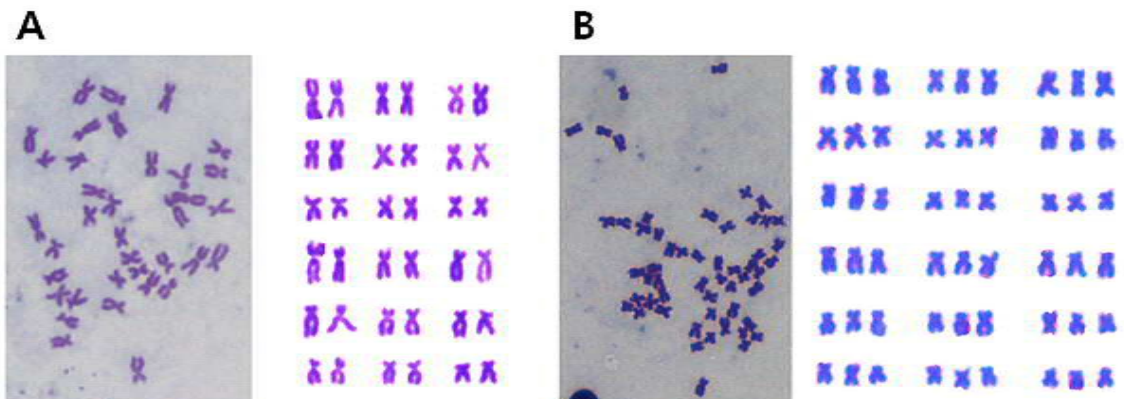
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 전복의 핵형 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 전복의 핵형(karyotype) 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명의 핵형 분석 방법을 이용 시, 최적의 전복 외투막 조직의 배양 기간, 외투막의 분석 부위 및 배양 배지 조성을 제공함으로써 전복을 희생시키지 않고도 효과적으로 2배체(diploid) 또는 3배체(triploid)를 분석하고, 2배체인 개체를 판별하여 이는 전복의 모패(parent shellfish)로서 이용 가능함을 확인하여, 관련 사업에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	213004-04-4-CG700
부처명	농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청
연구관리전문기관	농림식품기술기획평가원
연구사업명	Golden Seed 프로젝트(GSP 수산종자사업단)
연구과제명	수출용 육종 참전복 불임종자개발
기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교
연구기간	2013.07.25 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

전복(*Haliotis discus hannai*)의 외투막(mantle)을 배양하는 단계;를 포함하는 전복의 핵형(karyotype) 분석 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 외투막은 가장자리 구역(marginal zone), 반-가장자리구역(sub-marginal zone) 및 중앙 구역(central zone)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 전복의 핵형 분석 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배양은 레이보비츠 L-15배지, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimum Essential Media), RPMI 1640 배지 및 IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Media)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배지로 배양하는 것을 특징으로 하는, 전복의 핵형 분석 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 배지에 소 태아 혈청(FBS, fetal bovine serum), MEM 비필수 아미노산(NEAA, non-essential amino acid), 2-메르kapto에탄올(2- mercaptoethanol), 소듐 셀레나이트(SS, Sodium Selenite), 전복 혈림프, 재조합 인간 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF, Basic fibroblast growth factor), 재조합 인간 상피세포 성장 인자(EGF, Epidermal growth factor), 재조합 쥐 백혈병 억제 인자(LIF, leukemia inhibitory factor), 전복 배아추출물(AEE) 및 송사리 배아추출물(MEE)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 추가하는 것을 특징으로 하는, 전복의 핵형 분석 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 배양은 10 내지 30일 동안 배양하는 것을 특징으로 하는, 전복의 핵형 분석 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 배양은 15 내지 25도에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 전복의 핵형 분석 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 핵형 분석은 대상 전복을 2배체(diploid) 또는 3배체(triploid)로 분석하는 것을 특징으로 하는, 전복의 핵형 분석 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 핵형 분석은 대상 전복이 2배체일 때 전복의 모패(parent shellfish)로 이용하는 것을 특징으로 하는, 전복의 핵형 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전복의 핵형(karyotype) 분석 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 참전복(*Haliotis discus hannai*)을 포함한 전복류 생물은 상업적으로 중요한 생물군이며(Oakes and Ponte, 1996; Elliott, 2000), 이들의 잡종 교배, 배수체 생산 및 선발육종을 통한 종자 개발과 기초생물학적 연구를 위해 자주 사용되는 기술의 하나가 핵형 분석법이다(Gallardo-Escarate et al., 2004; Jee and Chang, 2012; Botwright, 2015; Wang et al., 2015). 포유류 및 어류를 비롯한 타 생물군의 경우, 일반적으로 직접법(direct method) 또는 유사 분열 촉진 물질을 사용하는 혈구세포배양법을 통해 핵형 분석이 이루어지며(Foresti et al., 1993; Moore and Best, 2001; Riegel, 2014), 조직 배양법 또한 활용되고 있다(Zhang et al., 1998; Ezaz et al., 2008).

[0003] 그러나, 전복류를 비롯한 복족류 생물의 경우, 흔히 사용되는 유사 분열 촉진 물질들의 효과가 아직 명확히 밝혀져 있지 않고(Pila et al., 2016), 배양기술의 발달 또한 부진하다(Rinkevich, 2011; Yoshino et al., 2013).

[0004] 따라서, 복족류의 핵형 분석을 위해 세포 분열이 활발히 일어나는 발생 중의 배아나 유생(Page, 1978; Goldman et al., 1980; Gallardo-Escarate et al., 2004; Amar-Basulto et al., 2011; Wang et al., 2015) 또는 성체의 생식소 조직(Bantok CR and Cockayne, 1975; Giacomozzi et al., 1979; Thiriot-Quievreux and Ayraud, 1982; Choudhury and Pandit, 1997; Libertini et al., 2004; Odierna et al., 2006)이 주로 이용되어 왔으며, 연체동물 가운데 유일하게 세포주가 개발되어 있는 담수 달팽이(*Biomphalaria glabrata*)의 경우를 제외하면 개체를 희생시키지 않는 핵형 분석 방법은 현재 보고되어 있지 않다.

[0005] 이매패류에서는 진주담치(*Mytilus edulis*)의 발과 외투막(Cornet, 1993), 참굴(*Crassostrea gigas*)의 아가미(Cornet, 2000), 지중해담치(*Mytilus galloprovincialis*)의 외투막(Cornet, 2006) 조직배양을 통한 핵형 분석 사례가 보고되었으나, 모두 개체를 희생하는 방법을 사용하였다. 특히, 육종용 전복 모패 선발에 있어 핵형 분석을 통해 염색체 정상성을 검증하는 것은 매우 중요하나(Amar-Basulto et al., 2011; Jee and Chang, 2012), 이를 위해 개체를 희생시킬 수는 없으며, 3배체와 같이 생식소 발달이 부진한 개체의 경우 발생 중인 배아나 유생의 핵형 분석은 가능하나, 성체의 생식소 조직을 이용한 핵형 분석은 어렵다. 유세포분석법의 경우, 개체를 희생하지 않고도 배수성의 확인이 가능하나, 염색체 이상은 검출할 수 없으므로 활용 가치가 낮다.

[0006] 따라서 성체 전복에 있어 개체를 희생시키지 않는 핵형 분석법의 개발이 필요하며, 이를 위해 개체의 생존에 영향을 미치지 않는 소량의 조직 채취만으로 핵형 분석에 충분한 중기 염색체 상을 얻을 수 있는 방법의 개발이 요구된다.

[0007] 이에 본 발명자들은 전복을 희생시키지 않고 효과적으로 전복의 핵형을 분석하는 방법을 연구하던 중, 본 발명의 최적의 전복 외투막 조직의 배양 기간, 외투막의 분석 부위 및 배양 배지 조성을 확인하고, 상기 조건은 핵형 분석에 최적의 조건임을 확인하고 이를 이용하여 전복의 모패를 확인할 수 있어, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 전복의 핵형(karyotype) 분석 방법을 제공할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 전복(*Haliotis discus hannai*)의 외투막(mantle)을 배양하는 단계;를 포함하는 전복의 핵형(karyotype) 분석 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 핵형 분석 방법을 이용 시, 최적의 전복 외투막 조직의 배양 기간, 외투막의 분석 부위 및 배양 배지

조성을 제공함으로써 전복을 희생시키지 않고도 효과적으로 2배체(diploid) 또는 3배체(triploid)를 분석하고, 2배체인 개체를 판별하여 이는 전복의 모패(parent shellfish)로서 이용 가능성을 확인하여, 관련 사업에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 전복 외투막 조직의 배양일에 따른 중기 염색체 출현 빈도 및 염색체 정상성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 전복 외투막 조직 배양 시 개체 크기 및 배수성에 따른 중기 염색체 출현 빈도를 나타낸 도이다.
- 도 3는 전복 외투막 조직의 영역, 영역별 배양에 따른 세포증식, 중기 염색체 출현 빈도 및 염색체 정상성을 나타낸 도이다.
- 도 4는 전복 외투막 조직 배양시 배지 구성에 따른 중기 염색체 출현 빈도와 염색체 정상성을 나타낸 도이다.
- 도 5는 2배체 및 3배체 전복의 핵형 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 전복(*Haliotis discus hannai*)의 외투막(mantle)을 배양하는 단계;를 포함하는 전복의 핵형(karyotype) 분석 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 용어, "외투막(mantle)"은 전복을 포함한 복족류에서는 내장낭 표면으로부터 발의 바깥쪽에 걸쳐 원통상으로 나와 신장하는 근육질의 막을 의미한다.
- [0014] 상기 외투막은 가장자리 구역(marginal zone), 반-가장자리구역(sub-marginal zone) 및 중앙 구역(central zone)으로 이루어진 군에서 선택된 1종이나, 바람직하게는 가장자리 구역의 세포를 이용하여 핵형 분석을 수행하나 염색체 확보의 목적 달성을 위해서라면, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 상기 배양은 레이보비츠 L-15배지, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimum Essential Media), RPMI 1640 배지 및 IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Media)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하고, 바람직하게는 레이보비츠 L-15배지이나, 본 발명의 전복 외투막을 제대로 배양 시켜 핵형 분석에 이용할 수 있는 목적을 달성하기 위한 것이라면, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 상기 배지에 소 태아 혈청(FBS, fetal bovine serum), MEM 비필수 아미노산(NEAA, non-essential amino acid), 2-메르캅토에탄올(2-mercaptoethanol), 소듐 셀레나이트(SS, Sodium Selenite), 전복 혈림프, 재조합 인간 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF, Basic fibroblast growth factor), 재조합 인간 상피세포 성장 인자(EGF, Epidermal growth factor), 재조합 쥐 백혈병 억제 인자(LIF, leukemia inhibitory factor), 전복 배아추출물(AEE) 및 송사리 배아추출물(MEE)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 추가할 수 있고, 바람직하게는 소 태아 혈청을 포함하나, 전복 외투막을 배양시켜 핵형 분석에 이용할 수 있는 목적을 달성하기 위한 것이라면, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 상기 배양은 10 내지 30일 동안 배양할 수 있고, 바람직하게는 12 내지 18일 동안, 더욱 바람직하게는 14 내지 22일동안 배양하는 것이나, 핵형 분석을 위한 염색체 확보를 위해서라면, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 상기 배양은 15 내지 25도에서 배양하고, 바람직하게는 16 내지 20도에서 배양하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에서 용어 "배양"은 전복 또는 전복 외투막을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다.
- [0020] 상기 전복의 외투막은 통상의 배지에서 생육 가능하며, 일 예로 레이보비츠 L-15 배지에서 배양할 수 있다. 상기 배지는 전복 특히 외투막을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 전복 외투막이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다. 전복의 외투막은 통상의 배양방법에 따라 배양할 수 있다.
- [0021] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 전복 외투막 배양 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로스의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰

로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 옥류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[0022] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어, "핵형 분석(karyotype analysis)"은 염색체의 수나 모양으로 표현되는 염색체조의 특성을 분석하는 일로, 분열 중기의 염색체를 사진이나 그림으로 나타내어 상동쌍(相同雙)을 구하여 크기의 순서로 배열하면 그 개체나 종의 핵형의 특징을 알 수 있으며, 근연종의 유연관계를 알 수 있고, 또 정상 핵형과 비교하여 어느 염색체에 이상이 생겼는가를 알 수도 있는 분석 방법이다.

[0024] 상기 핵형 분석은 대상 전복을 2배체(diploid) 또는 3배체(triploid)로 분석할 수 있다. 상기 판별은 대상 전복이 2배체일 때 전복의 모패로 이용 가능한 개체로 판별할 수 있다.

[0025] 본 발명의 용어, "2배체(diploid)"는 생활 주기 중에서 상동염색체 짝을 2개 가지는 시기의 세포 또는 개체로, 배수성(polyploidy)의 수 개념이다. 고등 동식물의 정상적인 체세포는 이배체이고 배우자체(gametophyte, 난자나 정자)는 일배체(monoploid)이다.

[0026] 본 발명의 용어, "3배체(triploid)"는 염색체의 수가 기본수의 3배인 세포 또는 개체를 의미하며, 3개의 상동염색체가 있어 $3n$ 으로 나타내며 2배체와 4배체의 교배로 제작되는 배수체의 일종이다. 3배체에서는 감수분열할 때에 염색체 분리가 이상이 되어 불임성이 되는 경우가 많다.

[0028] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0030] 실시예 1. 실험 준비 및 실험 방법

[0031] 1-1. 외투막 조직 배양

[0032] 참전복(*Haliotis discus hannai*)의 표면을 70% 에탄올(한국 안산시 소재의 덕산)을 적신 거즈로 닦은 후, 멸균된 해부도구를 사용해 외투막을 잘라냈다. 잘라낸 외투막 조직은 미생물에 의한 오염을 방지하기 위해 4%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신(P/S; 미국 뉴욕주 소재의 킵코), 250 μ g/mL 겐타마이신(미국 미주리주 소재의 시그마), 2 μ g/mL 암포테리신 B(미국 버지니아주 소재의 메디아테크) 및 10 μ g/mL 페놀레드(미국 오하이오주 소재의 암레스코)를 증류수에 첨가한 후, 인공 해수염(미국 텍사스주 소재의 레드씨)과 NaOH(덕산)를 사용해 염분 35 psu, pH 7.4로 조정된 오염 방지액에 옮겨 18 인큐베이터에 두었다. 이후 20분마다 오염 방지액을 교체하는 것을 3회 반복한 후, 18에서 1일간 두었다. 다음날, 외투막 조직을 1%(v/v) P/S를 첨가한 0.2 μ m 여과해수로 2회 씻은 후, 60 mm 페트리디쉬(한국 포천시 소재의 에스피엘 라이프사이언스)에 옮기고, 멸균한 해부도구를 사용해 약 4 mm²의 크기로 절단하였다.

[0033] 4개의 외투막 조직절편을 본 발명자들의 이전 연구 결과(Kim et al., 2014; Ryu et al., 2015)에 따라 1%(v/v) P/S, 1%(v/v) MEM 비필수 아미노산(NEAA; 킵코), 100 μ M 2-메르캅토에탄올(β -mer; 킵코), 2 nM 소듐 셀레나이트(SS; 시그마), 15%(v/v) 소 태아 혈청(FBS; 킵코), 15%(v/v) 전복 혈림프(Hemo; 자체 생산), 10 ng/mL 재조합 인간 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF; 킵코), 25 ng/mL 재조합 인간 상피세포 성장 인자(EGF;

시그마), 1000 U/mL 재조합 쥐 백혈병 억제 인자(LIF; 미국 메사추세츠주 소재의 밀리포어), 50 μ g/mL 전복 배아추출물(AEE; 자체 생산), 50 μ g/mL 송사리 배아추출물(MEE; 자체 생산)을 레이보비즈 L-15배지(L15; 김코)에 첨가한 후, 인공해수염과 NaOH를 사용해 염분 35 psu, pH 7.4로 조정한 전복 조직배양배지 3 mL이 담긴 16 mL 배양튜브(미국 뉴저지주 소재의 BD 팔콘)로 옮겼다. 18 인큐베이터에서 배양하였고, 6일마다 배지의 50%를 교체하였다.

[0035] 1-2. 염색체 슬라이드 제작

[0036] 배양 14일째에 유사분열 억제제를 위해 최종농도가 0.05%(w/v)로 되도록 콜히친(시그마)을 첨가하고, 4시간 동안 18에 두었다. 조직절편과 조직배양배지를 모두 15 mL 원심분리 튜브(팔콘)로 옮기고, 1500 rpm 및 4분간 원심분리한 뒤, 상층액을 제거하였다. 저장성 용액 처리를 위해 상온의 0.075M KCl(덕산) 용액을 첨가하여 45분간 상온에 두었다. 이어서 메탄올(덕산)과 아세트산(덕산)을 3:1로 혼합한 4도 고정액을 KCl 용액과 동일한 양만큼 첨가하고, 튜브를 아래위로 조심스럽게 뒤집어 혼합한 후, 얼음 위에 10분간 두었다. 이후 1500 rpm 및 4분간 원심분리하고 상층액을 제거한 뒤, 고정액을 5 mL 첨가하여 조심스럽게 피펫팅하여 섞었다. 30분 간격으로 고정액을 2번 더 교체하여 고정을 완료하고, 고정된 시료는 분석 전까지 -20도 에서 보관하였다.

[0037] 염색체 슬라이드의 준비를 위해 보관된 시료를 1500 rpm 및 4분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 메탄올과 아세트산을 1:1로 혼합한 용액을 첨가하였다. 이어서 끝을 자른 팁을 사용해 피펫팅하여 외투막 조직으로부터 세포를 분리한 뒤, 분리된 세포를 포함한 고정액을 새 원심분리 튜브에 옮기고, 다시 피펫팅하여 세포를 분리하였다. 메탄올과 아세트산의 비율이 다시 3:1로 되도록 튜브에 4도 메탄올을 첨가하여 섞은 후, 1500 rpm 및 4분간 원심분리하고 상층액을 약 30 μ L만큼 남기고 제거하였다. 피펫팅하여 세포 덩어리를 푼 후, 잘 닦은 슬라이드글라스(독일 바텐뷔르템베르크주 소재의 마리엔펠트)에 세포현탁액을 10 μ L씩 2-3번 떨어뜨렸다. 슬라이드글라스는 60 건조오븐에서 1시간동안 건조하였고, 10% 김자(시그마) 용액에서 7분 동안 염색한 후, 세포가 떨어지지 않도록 조심스럽게 증류수로 씻어 보관하였다.

[0039] 1-3. 염색체 슬라이드 검경 및 핵형 분석

[0040] 제작된 염색체 슬라이드는 모틱 이미지 플러스 2.0 프로그램(중국 저장성 소재의 모틱)을 사용하여 슬라이드 당 30개의 위치에서 200배율로 촬영하였고, 이중 무작위로 선별한 5개 위치의 총 세포수를 세었다. 이로부터 추정된 30개 위치 내의 총 세포수로 30개의 위치에 존재하는 중기 염색체 세포의 수를 나누어 중기 염색체 세포의 출현 빈도를 계산하였다. 실험 결과 간의 유의성 검정은 에스피에스에스 통계프로그램(미국 일리노이주 소재의 에스피에스에스)에 의한 독립표본 T-검정, 일원배치분산분석 및 던컨의 다중검정을 통해 실시되었고, $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다. 염색체의 계수 및 배수성 판정을 위해 염색체 계수가 가능한 중기 염색체 세포를 모틱 이미지 플러스 2.0 프로그램을 사용하여 1000 배율로 촬영한 후 염색체의 수를 세었으며, 그 수가 36개인 것을 이배체($2n=36$), 54개인 것을 삼배체($3n=54$)인 것으로 판정하였다.

[0042] 실시예 2. 전복 외투막 조직의 배양 기간에 따른 영향 분석

[0043] 상기 실시예 1-1에서 준비한 외투막 조직 배양을 통한 중기 염색체 확보 방법에 있어, 배양기간에 따른 영향을 조사하기 위하여, 2, 6, 10, 14, 18 및 22일 동안 외투막 조직을 배양하였고, 각 배양 기간 별 중기 염색체의 비율(%) 및 염색체(chromosome)의 수를 확인하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0044] 도 1A에 나타난 바와 같이, 2 일 및 6일 배양 실험군에서는 중기 염색체가 전혀 관찰되지 않았고, 10일 배양 실험군에서는 1개의 반복구에서 중기 염색체가 관찰되었다. 14일, 18일, 22일 배양 실험군에서는 다수의 반복구에서 중기 염색체가 관찰되었고, 2-10일 배양 구간과 14-22일 배양 구간 간의 중기 염색체 출현 빈도를 비교해본 결과, 14-22일 배양 구간에서 유의적으로 높은 출현 빈도가 관찰됨을 확인하였다.

[0045] 또한, 도 1B에 나타난 바와 같이, 14일, 18일, 22일 배양 실험군에서 확인된 중기 염색체 수의 정상성을 비교한 결과, 14일 63.3%, 18일 66.7%, 22일 56.7%로 유의적인 차이가 나타나지 않음을 확인하였다.

[0046] 또한, 도 1C에 나타난 바와 같이, 외투막 조직을 배양접시에서 배양하면서 실제 세포가 분열하여 배양 조직으로부터 뺏어 나오는 모습을 배양일 별로 관찰한 결과, 배양 14일째부터 급격한 세포 분열이 관찰되었다.

[0047] 따라서, 외투막 조직의 배양으로부터 중기 염색체를 확보하기 위해서는 14일 이상의 배양 기간이 요구된다는 것을 확인하였다.

[0049] 실시예 3. 전복의 크기 및 배수성에 따른 영향 분석

[0050] 외투막 조직 배양을 통한 중기 염색체 확보 방법에 있어 전복 크기 및 배수성에 따른 중기 염색체 출현 빈도를 조사하였다. 구체적으로, 3-5 g의 작은 크기의 2배체 및 3배체 전복과 70-90 g의 큰 크기의 2배체 전복을 대상으로 외투막 조직 절편을 14일간 배양하고 염색체 출현 빈도를 중기 염색체의 비율(%) 및 염색체(chromosome)의 수를 통하여 조사하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0051] 도 2에 나타난 바와 같이, 실험군 간 중기 염색체 출현 빈도에 유의적인 차이가 나타나지 않음을 확인하였다.

[0053] 실시예 3. 외투막 부위 영역에 따른 영향 분석

[0054] 외투막 조직 배양을 통한 중기 염색체 확보 방법에 있어 외투막 조직의 영역별 배양에 따른 영향을 조사하였다. 구체적으로, 큰 크기의 전복 외투막 조직을 central zone(CZ), sub-marginal zone(SMZ) 및 marginal zone(MZ) 세 개의 영역(도 3A)으로 나누어 14일간 배양하여 염색체 출현 빈도를 조사하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0055] 도 3에 나타난 바와 같이, marginal zone이 central zone과 sub-marginal zone에 비해 중기 염색체가 확인되는 시도 횟수가 유의적으로 높게 나타났고, 전반적인 중기 염색체 출현 빈도의 경우도 marginal zone이 central zone과 sub-marginal zone에 비해 높게 나타났다(도 3B, 3C). 또한, Central zone, sub-marginal zone 및 marginal zone을 배양하여 확보한 중기 염색체 수의 정상성은 40%-50%의 범위임을 확인하였다(도 3D).

[0056] 따라서, 외투막 조직의 marginal zone의 배양으로부터 중기 염색체 확보를 시도하는 것이 조직 내 다른 영역을 대상으로 하는 것보다 효율적임을 확인하였다.

[0058] 실시예 4. 조직 배양 배지의 조성에 따른 영향 분석

[0059] 외투막 조직 배양을 통한 중기 염색체 확보 방법에 있어 배양 배지 조성에 따른 영향을 조사하였다. 구체적으로, 큰 크기의 전복 외투막 조직으로부터 marginal zone을 회수하여 서로 다른 조성의 배지에서 14일간 배양하고 염색체 출현 빈도를 조사하였다. 실험구에 따라 세포증식 촉진을 위해 첨가된 조성물은 표 1과 같으며, 기본적으로 레이보비츠(Leibovitz) L15 배지에 다른 배지 조성물을 첨가하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

표 1

실험구	세포증식 촉진을 위해 첨가된 조성물
L15	-
L15F	15% FBS
L15H	15% Hemo
L15FH	15% FBS, 15% Hemo
L15FHBNS	15% FBS, 15% Hemo, 100 μ M β -mer, 1% NEAA, 2 nM SS
L15 complete	15% FBS, 15% Hemo, 100 μ M β -mer, 1% NEAA, 2 nM SS, 10 ng/mL bFGF, 25 ng/mL EGF, 1000 U/mL LIF, 50 μ g/mL AEE, 50 μ g/mL MEE

[0062] 도 4에 나타난 바와 같이, 중기 염색체 출현 빈도와 중기 염색체가 확인되는 시도 횟수가 FBS(소 태아 혈청)이 첨가된 배양 배지를 사용한 실험군에서 높게 나타났다(도 4A, 4B). 중기 염색체 출현 빈도가 높은 3개의 실험군인 L15F, L15FHBNS 및 L15 complete의 염색체 수의 정상성은 43.3-60.0%의 범위였다(도 4C).

[0063] 따라서, 기본 배지인 L15에 15%의 FBS(소 태아 혈청)을 첨가한 배양 배지를 사용하여 외투막 조직을 배양하는 것이 중기 염색체 확보에 있어 효율적인 것으로 나타남을 확인하여, 다수의 첨가물을 포함하는 L15FHBNS 및 L15

완전(complete) 배지에 비해 경제적인 면에서도 효과적임을 확인하였다.

[0065] 실시예 5. 2배체 및 3배체 전복의 핵형 분석

[0066] 상기 실시예 1-3의 방법을 이용하여, 외투막 조직 배양을 통해 2배체 및 3배체 전복의 핵형을 분석 하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

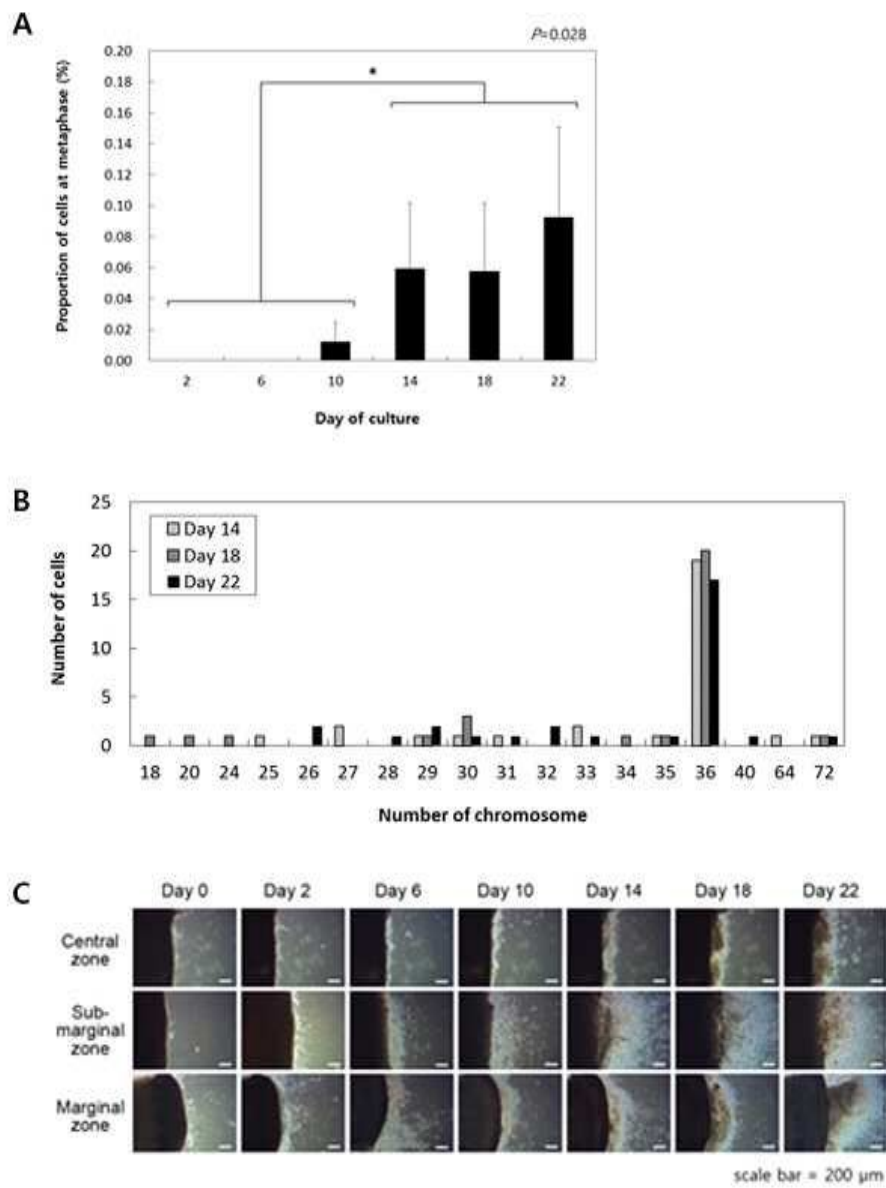
[0067] 도 5에 나타난 바와 같이, 2배체 전복은 36개(중부 동원체형 염색체쌍 9개, 차중부 동원체형 염색체쌍 9개), 3배체 전복은 54개(중부 동원체형 염색체쌍 9개, 차중부 동원체형 염색체쌍 9개)의 염색체를 가지고 있음을 확인 하였다.

[0068] 따라서, 외투막 조직 배양을 통해 배수성에 따른 중기 염색체 상을 확보하였고, 2배체 및 3배체 전복을 판별하였다.

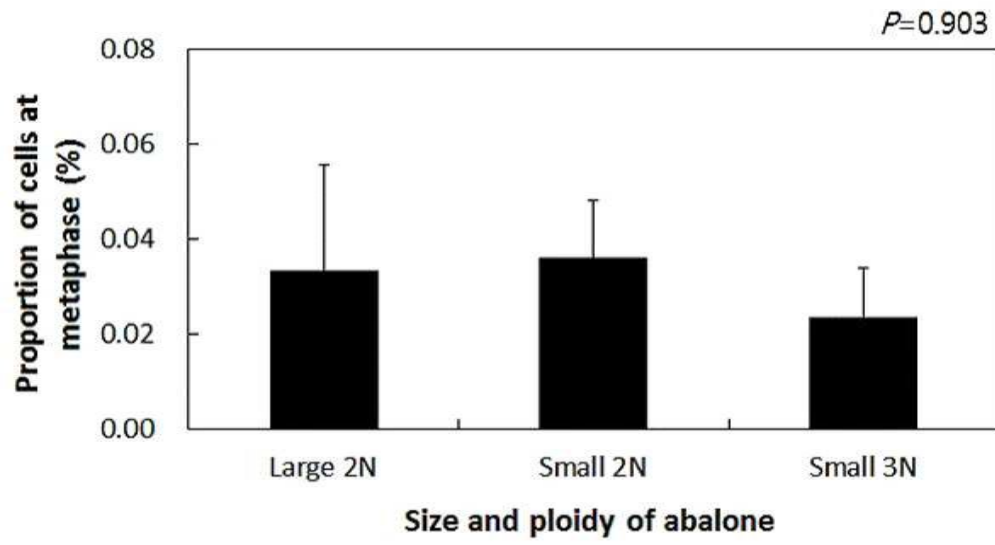
[0069] 상기의 일련의 결과를 통하여, 외투막 가장자리 부위를 소량 채취하고 이를 소 태아 혈청을 첨가한 레이보비즈 L-15 배지를 이용해 18에서 14일 이상 배양하면, 성체 전복을 희생시키지 않고도 효과적으로 핵형 분석을 수행 할 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1

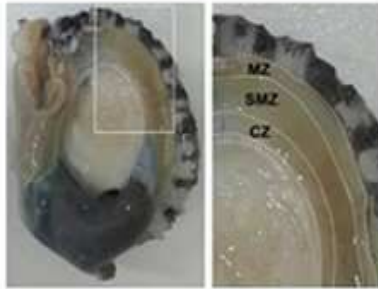


도면2



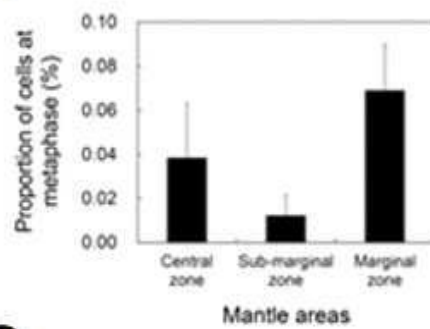
도면3

A

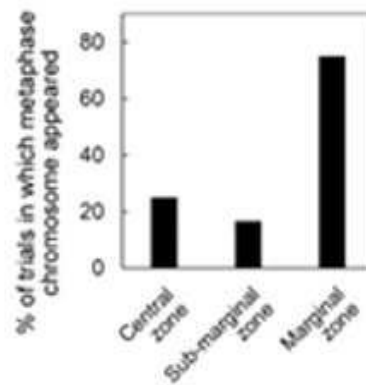


CZ: central zone, MZ: marginal zone, SMZ: sub-marginal zone

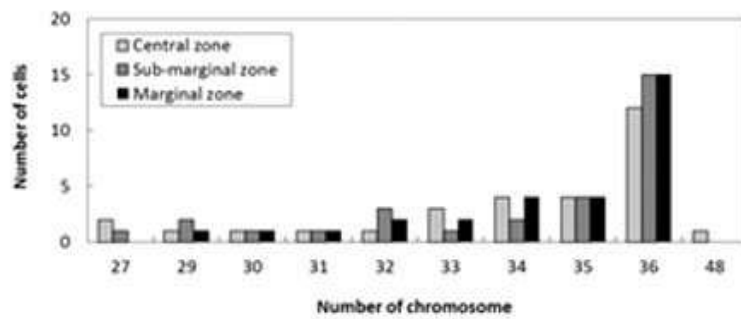
B



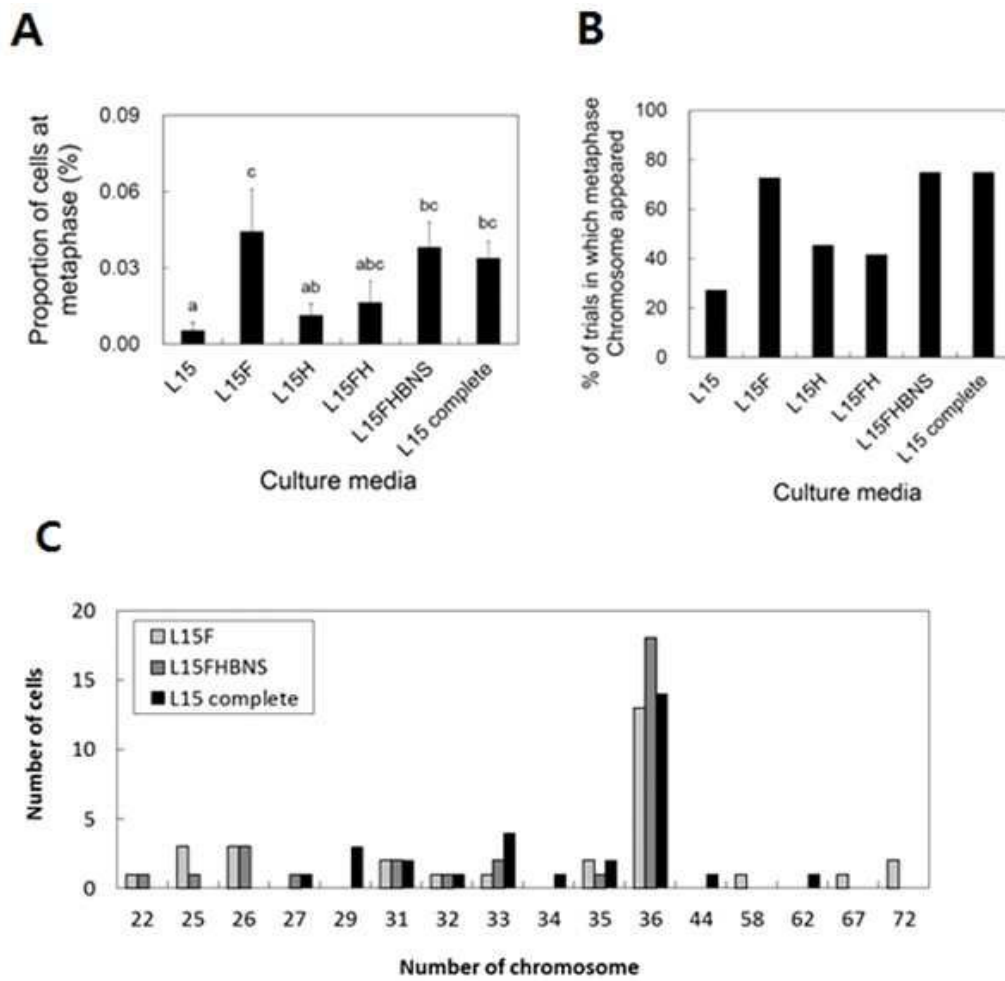
C



D



도면4



도면5

