



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월16일
(11) 등록번호 10-1858844
(24) 등록일자 2018년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/073 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0604 (2013.01)
C12Y 207/1101 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0161480
(22) 출원일자 2016년11월30일
심사청구일자 2016년11월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR101107329 B1

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
공일근
경상남도 진주시 남강로477번길 7, 가동 602호(신안동, 한주빌라)
미살람 아이만
경상남도 진주시 호탄9번길 7, 406호 (골드룸)
박기훈
경상남도 진주시 초창로14번길 29, 205동 402호(조전동, 푸르지오)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 8 항

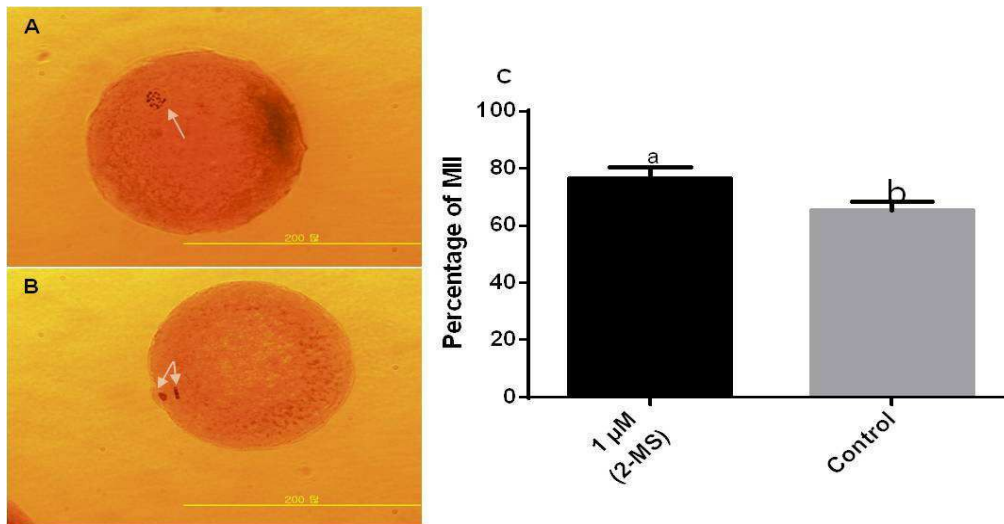
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 2-메톡시스티펜드론을 포함하는 배지 조성물 및 이를 이용한 체외수정란의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 2-메톡시스티펜드론(2-MS)을 포함하는 배지 조성물 및 이를 이용한 체외수정란의 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로 2-메톡시스티펜드론(2-MS)을 체외성숙 배지에 첨가하여 IκB β 발현 억제 조절에 의한 소 체외 수정란의 질적 수준을 개선하여 난자 직접 채취(Ovum Pick-Up) 유래 수정란의 생산 및 이식시 수태율을 향상시키는데 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-0838

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 [2세부]우수 유전자원 확보시스템 및 우수 종축 관리시스템 구축(2차년도)

기 여 율 1/1

주관기관 농림수산물기술기획평가원

연구기간 2016.08.14 ~ 2017.08.13

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

2-메톡시스티펜드론(2-Methoxystyrene, 2-MS)을 포함하는 포유동물 난모세포의 체외성숙용 배지(In-Vitro Maturation Medium, IVM) 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배지 조성물은 무기염류, 탄소원, 아미노산, 및 소 혈청 알부민으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 것을 추가로 포함하는 것인 배지 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 2-메톡시스티펜드론의 배지 내 농도는 0.1 내지 1.5 μM 인 것인 배지 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 포유동물은 돼지, 고양이, 개 및 소로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 배지 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 포유동물의 난모세포는 적세포 난모세포 복합체를 형성한 것인 배지 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 2-메톡시스티펜드론은 상기 난모세포가 수정하여 발달된 수정란 배반포의 세포사멸 억제 활성을 갖는 것인 배지 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 세포사멸 억제 활성은 I κ B 키나아제 β (I κ B β) 발현이 억제되는 것인 배지 조성물.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 포유동물 체외수정란의 대량 생산 방법:

- 1) 인간을 제외한 포유동물로부터 난포란을 채취하는 단계;
- 2) 단계 1에서 채취된 난포란에서 미성숙 난자를 회수하는 단계;
- 3) 상기 회수된 미성숙 난자를 제1항의 배지에서 체외 성숙시키는 단계;
- 4) 단계 3에서 성숙된 난자와 정자를 체외 수정시키는 단계; 및
- 5) 단계 4에서 제작된 체외수정란을 배지에서 배양하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)을 체외성숙 배지에 첨가하여 I κ B β 발현 억제 조절에 의한 소 체외수정란의 질적 수준을 개선하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 적세포 난모 세포 복합체 (Cumulus-oocyte-complex, COC)의 체외성숙 (*In vitro* maturation, IVM)은 수정란 발달 및 성공적인 수정을 위한 보조생식 기술 (assisted reproductive technology, ART)에 있어서 굉장히 중

요한 단계이다.

[0003] 특히, 성공적인 체외수정란 생산은 난모세포 핵의 성숙뿐만 아니라 세포질과도 밀접하게 관련되어 있다. 시험관에서 배양된 미성숙한 소의 다수의 난모세포는 포배단계로의 발달에 실패하는데, 이는 체외수정란 생성 동안 체외 배양 조건이 초기 배아의 발달 잠재성에 영향을 준다는 것을 나타낸다. 시험관 환경에서 높은 산소 농도는 높은 농도의 활성 산소종의 생성을 야기하고, 이는 배아 발달에 해로운 영향을 끼칠 수 있다. 예를 들어, 산화 스트레스는 세포예정사를 유발하는 핵 인자인 kappaB (NFB)와 같은 전사인자를 활성화 시킬 수 있다. 게다가, 높은 활성 산소종에 해한 쥐 난모세포의 노출은 1-세포 단계에서 접합자의 분열 및 분리를 완전히 억제한다. 산화 스트레스는 보조생식기술에 있어서 결함이 있는 배우자 또는 나쁘게 발달된 배아의 주요 원인 중 하나이다. 그러므로 염증, DNA 손상 및 세포예정사에 관련된 신호 전달을 억제하는 것은 체외수정란 생성 동안 해로운 활성 산소종을 제한할 수 있고 성공적인 보조생식기술을 촉진시킬 수 있다.

[0004] 성공적인 보조생식기술을 촉진하기 위해 다양한 연구들에도 불구하고 수정란의 체외배양환경을 최적화시켜 배반포 발달률을 증대시키는 미지의 발달 인자들이 완전하게 밝혀지지 않은 상태이다. 그러므로 보다 개선된 수정란 배양조건을 확립하여 배반포 발달률이 향상된 수정란을 대량생산하는 방법이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 (0001 KR 10-1107329)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 야생 호장근으로부터 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)을 정제하였고, 소의 난모세포 및 배아 발달 기능에 대하여 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)의 영향을 조사하였다. 다양한 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)의 농도 조건 시험을 통하여, 배아 발달에 대한 가장 유용한 농도가 1 μ M인 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)을 포함하는 포유동물 수정란의 체외 체외수정용 배지 (IVM) 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 상기 배지 조성물에서 포유동물 수정란을 배양하는 단계를 포함하는 수정란의 체외배양 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 나아가 본 발명의 목적은 상기 방법을 이용한 포유동물 체외수정란의 대량 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)을 포함하는 포유동물 수정란의 체외 체외수정용 배지 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 배지 조성물은 무기염류, 탄소원, 아미노산, 및 소 혈청 알부민으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)의 배지 내 농도는 0.1 내지 1.5 μ M인 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 포유동물은 돼지, 고양이, 개 및 소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 포유동물의 수정란은 체외수정란 또는 복제수정란인 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 2-메톡시스티펜드론은 수정란 배반포의 세포사멸 억제 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포사멸 억제 활성은 IkB 키나아제 β (IKK β) 발현이 억제되는 것일 수 있다.

- [0017] 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물에서 포유동물 수정란을 배양하는 단계를 포함하는 수정란의 체외배양방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 포유동물은 돼지, 고양이, 개 및 소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 포유동물 수정란은 2-메톡시스티판드론에 의해 세포사멸이 억제되는 것일 수 있다.
- [0020] 나아가 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 포유동물 체외수정란의 대량 생산 방법을 제공한다.
- [0021] 1) 인간을 제외한 포유동물로부터 난포란을 채취하는 단계;
- [0022] 2) 단계 1에서 채취된 난포란에서 미성숙 난자를 회수하는 단계;
- [0023] 3) 상기 회수된 미성숙 난자를 체외 성숙시키는 단계;
- [0024] 4) 단계 3에서 성숙된 난자와 정자를 체외 수정시키는 단계; 및
- [0025] 5) 단계 4에서 제작된 체외수정란을 제1항의 배지에서 배양하는 단계.

발명의 효과

- [0026] 본 발명의 2-메톡시스티판드론 (2-MS)을 포유동물 수정란의 체외 체외수정용 배지 조성물에 첨가하면 I κ B 키나아제 β (I κ K β) 발현을 억제하므로 난자 직접 채취 (Ovum Pick-Up) 유래 수정란의 생산 및 이식시 수태율을 향상시키는데 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 체외 성숙 (IVM) 에서 21시간 후에 난모세포에 아세트-올세인 염색하여 핵의 성숙 단계를 확인한 사진과 그래프이다:
- (A) 감수 제1분열 중기 (MI), (B) 감수 제2분열 중기 (MII) Scale bar 200 μ m. 흰색 화살표가 핵 성숙을 나타냄, (C) 2-메톡시스티판드론 (2-MS)(1 μ M)와 대조군(control)일때 MII에서 난모세포의 비율을 나타냄, 유의도 수준 (The level of statistical significance)은 p<0.05.
- 도 2는 8일 된 소 배아를 Hoechst 33342 염색하여 전체 세포수를 확인하였고, TUNEL 분석에 의해 사멸한 세포를 확인한 사진이다: (A-C) 2-메톡시스티판드론 (2-MS)(1 μ M), (A'-C') 대조군, Scale bar 200 μ m, 흰색 화살표는 사멸한 세포.
- 도 3은 8일 된 소 배아에서 전체 세포수와 사멸한 세포를 나타낸 그래프이다: (A) 전체 세포수는 Hoechst 33342 염색하여 확인함, (B) 사멸한 세포수는 TUNEL 분석으로 확인함, 유의도 수준 (The level of statistical significance)은 p<0.05.
- 도 4는 2-메톡시스티판드론 (2-MS)의 여부에서 RT-PCR로 배 반포에서 8개 유전자의 mRNA 발현 정도를 확인한 도이다:
- (A) NF κ B의 mRNA 발현, (B) I κ K β 의 mRNA 발현, (C) COX2의 mRNA 발현, (D) iNOS의 mRNA 발현, (E) BAX의 mRNA 발현, (F) caspase-3의 mRNA 발현, (G) JAK2의 mRNA 발현, (H) BCL2의 mRNA 발현, 유의도 수준 (The level of statistical significance)은 p<0.05.
- 도 5는 2-메톡시스티판드론 (2-MS)를 처리한 후에 NF κ B 단백질의 발현을 8일된 배반포의 형광영상을 나타낸 사진이다:
- (A-C) 2-메톡시스티판드론 (2-MS)(1 μ M), (A'-C') 대조군, Scale bar 50 μ m, (D) ImageJ software에 의해 측정된 통합적인 빛의 강도 확인함, 유의도 수준 (The level of statistical significance)은 p<0.05.
- 도 6은 2-메톡시스티판드론 (2-MS)를 처리한 후에 I κ K β 단백질의 발현을 8일 된 배반포의 형광영상을 나타낸 사진이다:
- (A-C) 2-메톡시스티판드론 (2-MS)(1 μ M), (A'-C') 대조군, Scale bar 50 μ m, (D) ImageJ software에 의해 측정된 통합적인 빛의 강도 확인함, 유의도 수준 (The level of statistical significance)은 p<0.05.
- 도 7은 2-메톡시스티판드론 (2-MS)를 처리한 후에 8-Oxoguanine (8-OXG) 단백질의 발현을 8일 된 배반포의 형광

영상을 나타낸 사진이다:

(A-C) 2-메톡시스티판드론 (2-MS)(1 μ M), (A'-C') 대조군, Scale bar 50 μ m, (D) ImageJ software에 의해 측정된 통합적인 빛의 강도 확인함, 유의도 수준 (The level of statistical significance)은 $p < 0.05$.

도 8은 2-메톡시스티판드론 (2-MS)를 처리한 후에 COX2 단백질의 발현을 8일 된 배반포의 형광영상을 나타낸 사진이다:

(A-C) 2-메톡시스티판드론 (2-MS)(1 μ M), (A'-C') 대조군, Scale bar 50 μ m, (D) ImageJ software에 의해 측정된 통합적인 빛의 강도 확인함, 유의도 수준 (The level of statistical significance)은 $p < 0.05$.

도 9는 2-메톡시스티판드론 (2-MS)(1 μ M)을 체외성숙배양액에 첨가하여 난자 배양 후 이식 가능한 배반포기배의 질적 수준을 향상시키는 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 2-메톡시스티판드론 (2-MS)을 포함하는 포유동물 수정란의 체외 체외수정용 배지 조성물 및 이를 이용하여 포유동물 수정란을 배양하는 단계를 포함하는 수정란의 체외배양방법에 관한 것이다.
- [0031] 본 명세서에서 상기 2-메톡시스티판드론 (2-MS)은 호장근 (Fallopia japonica)의 조추출물을 분획물에서 분리한 것이다.
- [0032] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 2-메톡시스티판드론의 배지 내 농도는 0.1 내지 1.5 μ M인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 1.5 μ M, 가장 바람직하게는 1 μ M일 수 있다.
- [0033] 상기 호장근(Polygonum cuspidatum)은 마디풀과(polygonaceae) P. cuspidatum과에 속하는 약효식물이며 식품, 화장품 및 의약품분야에서 유용한 첨가물로서, 강력한 항산화 특징을 가지므로 노화 과정을 지연시킬 수 있다. 게다가, 호장근은 자유 라디칼 및 킬레이트 이가 양이온을 처리할 수 있기 때문에 넓은 범위의 생물학적 및 생리학적 특징을 보여준다.
- [0034] 상기 호장근의 조추출물을 분획 및 정제하여 얻은 2-methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone로 알려진 2-메톡시스티판드론 (2-methoxystypandrone, 2-MS)은 P. cuspidatum의 주요 활성 요소 및 강한 항산화제인데, 이것은 농도 의존적으로 tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)에 의해 유발된 세포독성에 대하여 효과적으로 갈색세포증 (PC12 cells) 및 세포사멸을 예방할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 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 배지 조성물은 이러한 체외배양에 최적화된 배지 조성물이다.
- [0036] 본 발명의 배지 조성물을 적용시킬 수 있는 포유동물 수정란은 인간을 제외한 포유동물의 수정란, 바람직하게는 가축, 더욱 바람직하게는 소의 수정란이다. 또한, 체외에서 배양될 수 있는 수정란이라면, 특별히 제한되지 않으나, 체외배양시 배발생정지현상을 보이는 수정란을 대상으로 할 수 있으며, 체외수정란 또는 복제수정란 모두에 적용이 가능하고, 바람직하게는 초기 성숙란을 수정시켜 만든 체외수정란을 대상으로 할 수 있다. 여기서 "체외 수정란"이란 난자와 정자를 채취하여 체외에서 수정시킨 것을 말하고, "복제 수정란"은 체세포 공여핵을 유전물질이 제거된 수핵 난자에 주입한 후 물리적 또는 화학적 방법으로 융합시킨 것을 의미한다.
- [0037] 발명의 배지 조성물은 2-메톡시스티판드론 (2-MS)을 통상적인 포유동물 수정란 배양에 이용되는 기본 배지에 첨가시켜 이용할 수 있다. 본 발명에서 "기본 배지"는 포유동물의 종에 따라 차이가 있으나 무기염류, 탄소원, 아미노산, 소 혈청 알부민(BSA) 및 보조인자 등을 기본적으로 포함하는 포유동물 초기 배아세포 배양용 배지로서, 당업자들에게 잘 알려진 일반적인 배지를 모두 포함할 수 있다. 특히 바람직하게, 상기 배지는 무기염류로서 NaCl, KCl 및 NaHCO₃ 등을 포함하고, 탄소원으로서 글루코즈, 나트륨 피루베이트 및 젖산갈습염 등을 포함하며, 아미노산으로서 글루타민을 비롯한 필수아미노산 및 비필수아미노산을 포함하며, 보조인자로서 기타 미량원소 및 완충액 등을 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 배지는 또한 항생제를 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 2-메톡시스티판드론 (2-MS)을 포함하는 포유동물 수정란의 체외배양용 배지 조성물은 수정란 배반포의 세포사멸 (apoptosis) 억제활성을 가지는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 세포사멸 억제활성은 I κ B 키나아제 β (I κ K β) 발현 유전자 발현 감소에 의해 달성될 수 있다 (도 9 참조).

- [0039] 본 발명에서 용어 "배반포"는 수정란이 난할을 거듭하여 자라는 과정에서 치밀화된 상실배 이후에 배반포강을 형성하여 태아로 분화할 내세포괴 (inner cell mass)와 태반으로 분화할 영양막세포 (trophectoderm)로 구분될 정도로 발육된 상태의 수정란을 의미한다.
- [0040] 체외수정란이 자궁에 착상하기 위해서는 배반포의 세포막인 영양막 세포에 존재하는 착상관련 단백질 효소가 필요한데, 통상적인 체외수정란이 난분열을 조기에 멈추게되어 착상이 어렵게 되므로, 수정란의 배반포 세포사멸을 억제시킴으로써 발달을 증대시키고, 세포 내 영양막 세포를 확보하면, 좀 더 용이하게 자궁 착상이 유도될 수 있게 된다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물에서 포유동물 수정란을 배양하는 단계를 포함하는 수정란의 체외배양방법을 제공하는 것이다.
- [0043] 본 발명의 수정란 체외배양방법은 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)을 포함하는 포유동물 수정란의 체외배양용 배지 조성물에서 포유동물의 수정란을 배양시켜 수정란의 배반포기 발달물을 증대시킴으로써, 수정란 이식이 용이하도록 개선되도록 할 수 있다. 본 발명의 체외배양방법을 통해 배양될 수 있는 포유동물 수정란은 체외에서 배양될 수 있는 수정란이라면, 특별히 제한되지 않으나, 체외배양시 배발생정지현상을 보이는 수정란을 대상으로 할 수 있으며, 체외수정란 또는 복제수정란 모두 가능하다. 또한, 이러한 체외배양방법은 특히 체외수정란의 대량 생산에 이용될 수 있다.
- [0045] 나아가 본 발명의 목적은 상기 방법을 이용한 포유동물 체외수정란의 대량 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [0046] 본 발명은 체외배양용 배지 조성물을 이용한 포유동물 체외수정란의 대량 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로 1) 인간을 제외한 포유동물로부터 난포란을 채취하는 단계; 2) 단계 1에서 채취된 난포란에서 미성숙 난자를 회수하는 단계; 3) 상기 회수된 미성숙 난자를 체외 성숙시키는 단계; 4) 단계 3에서 성숙된 난자와 정자를 체외 수정시키는 단계; 및 5) 단계 4에서 제작된 체외수정란을 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 포유동물 체외수정란의 대량 생산 방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 상기 체외수정란의 대량 생산 방법에서 사용되는 상기 배지는 상기에서 상술한 바와 같이, 상기 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)의 배지 내 농도는 0.1 내지 1.5 μM 인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 1.5 μM , 가장 바람직하게는 1 μM 일 수 있다.
- [0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] **<실시예 1> 실험 재료 및 방법**
- [0052] **<1-1> 배지 및약품**
- [0053] 모든 약품 및 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 실험용 동물의 사용 및 처리에 대하여, 경상대학교의 가이드라인에 따라 실험을 수행하였다.
- [0055] **<1-2> 2-메톡시스티펜드론의 분리**
- [0056] 순수한 2-메톡시스티펜드론 (2-MS) (MW, 260; purity, >97%; 경상대학교 응용생물과학과 제조)은 호장근 뿌리에 메탄올을 첨가하여 추출한 추출물로부터 분리하였다.
- [0057] 구체적으로, 호장근 메탄올 추출물은 클로로포름 및 에틸아세트산 분획물에서 수득하였다. 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)에서 농축된 에틸아세트산 분획물을 실리카 젤 관을 통하여 판크로마토그래피를 반복하였고, 헥세인 및 에틸아세트산에 녹여서 분리하였다(30:1 ~ 1:1). 그런 다음 얻어진 분획물을 MeOH-H₂O (85:15)을 사용한 Sephadex LH-20관을 통하여 크로마토그래피하여 25mg의 2-메톡시스티펜드론을 얻었다. 분광분석 데이터를 얻기 위하여 상기 물질을 2차원 핵종분석기 (2D NMR)를 통하여 구조분석을 실시하였다. 상기 물질은 노란 바늘모양이고, 분자식은 C₁₄H₁₂O₅이며, 고분해능 전자충돌 질량분석에 따른 값은 m/z 260.0688인 것을 확인하였다. 상기 물질의 순도는 고성능액체크로마토그래피 (HPLC)를 통하여 분석하였다. 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)를 다이메틸설폭사이드에 3.85 mM 농도로 용해한 다음 실험에 사용하였다.
- [0059] **<1-3> 난모세포(Oocyte) 수집**
- [0060] 지역 도살장에서 한우로부터 얻은 난소는 35℃의 생리적염류용액(0.9% [w/v] NaCl)에 두었고, 도살 후 2시간 내에 실험실로 운반하였다. 난소를 신선한 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)으로 세척한 후, 적세

포 난모 세포 복합체(Cumulus-oocyte-complex, COC)를 Deb 등 (2011)에 의해 설명된 방법으로 얻었다. 간단히 말하면, 지름 2~8 mm의 여포로부터 진공 펌프를 부착한 18-게이지 바늘을 사용하여 적세포 난모 세포 복합체를 얻었다. TL-HEPES 배지 (114 mM sodium chloride, 3.2 mM potassium chloride, 2 mM sodium bicarbonate, 0.34 mM sodium biphosphate, 10 mM sodium lactate, 0.5 mM magnesium chloride, 2 mM calcium chloride, 10 mM HEPES, 1 μ l/ml phenol red, 100 IU/ml penicillin 및 0.1 mg/ml streptomycin)를 함유하는 접시에서 흡입된 액체를 추출하고 입체 현미경으로 이미지화하였다. 3개 층 이상의 작은 난구세포 및 균질한 세포질을 갖는 오직 좋은 상태의 난모세포를 시험관 성숙을 위하여 수집하였다. 적세포 난모 세포 복합체를 TL-HEPES 배지에서 3번 세척하였다.

[0062] <1-4> 시험관 내 성숙

[0063] 적세포 난모 세포 복합체를 IVM 배지(체외성숙용 배지)에서 배양하였다. 구체적으로, 적세포 난모 세포 복합체를 10% [v/v] 소태아혈청 (FBS, Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, USA; 배지는 56 °C의 항온수조에서 30분 동안 배양되었고, 10 ml의 표본으로 나누어, 사용할 때까지 -20 °C에서 보관됨)으로 보충된 IVM 배지 (TCM-199), 1 μ g/ml estradiol-17 β , 10 μ g/ml follicle-stimulating hormone (FSH), 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 0.6 mM cysteine, 0.2 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin 및 0.1 mg/ml 스트렙토마이신으로 3번 세척하였다. 약 50개의 적세포 난모 세포 복합체를 2-메톡시스티판드론 (2-MS)가 다양한 농도 (0, 0.1, 0.5, 1 및 1.5 μ M)로 처리된 500 μ l의 IVM 배지를 포함하는 4-웰플레이트 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 옮겼다.

[0065] <1-5> 시험관 내 수정 및 배양

[0066] 시험관 성숙 난모세포를 냉동-해동된 소의 정자와 수정시켰다. 한우의 냉동 정자를 38.5 °C의 항온수조에서 1분 동안 해동시킨 후, 실온에서 5분 동안 750 $\times$ g 조건의 원심분리기에서 운동성 있는 정자를 D-PBS로 얻어, IVF 배지 (6 mg/ml 소 혈청 알부민 [BSA], 22 μ g/ml 소듐피루브산, 100 IU/ml 페니실린 및 0.1 mg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 Tyrode 젖산 용액)에 재현탁시켰다. 그 후 정자를 $1\sim 2 \times 10^6$ sperm/ml의 최종농도로 적절한 부피의 IVF 배지에 희석하였다. 성숙한 적세포 난모 세포 복합체를 500 μ l의 IVF 배지에 정자가 들어있는 4-웰플레이트로 옮기고, 18~20 시간 동안 38.5 °C, 5% [v/v]CO₂의 습한 조건에서 배양하였다. 20시간 동안 정자와 배양한 후, 난구세포를 파이펫을 이용하여 제거하고, 약 50개의 추정접합체를 세척한 후 3일 동안 44 μ g/ml sodium pyruvate, 14.6 μ g/ml glutamine, 100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 3 mg/ml BSA 및 310 μ g/ml 글루타치온으로 보충된 500 μ l의 CR1-aa 배지(Rosenkrans et al., 1993)를 포함하는 4-웰플레이트로 옮긴다. 그 후 BSA를 10% [v/v]FBS에 놓아두는 것을 제외하면, 상기 추정접합체를 상기 배지와 동일한 조성의 배지에서 배발달기인 8일째 (day 8) 까지 배양한다(day 0 = day of IVF). Day-8 배반포를 TL-HEPES 에서 3시간 세척한 후, 고정액 (1 M PBS 처리된 4% [v/v] 파라포름알데하이드)에 옮기고, 세포 수 계산 및 면역세포화학 실험 전까지 4 °C에서 보관하였다. mRNA 추출 및 유전자 발현 분석을 위하여 Day-8 배반포를 1.5ml Eppendorf 튜브로 옮기고 (튜브당 5개의 배반포), 즉시 액체질소에서 냉동시켜 mRNA 추출 전까지 -80 °C에서 보관하였다.

[0068] <1-6> 아세트올세인 염색

[0069] 난모세포를 염색 및 핵의 성숙 단계를 평가하였다. 구체적으로, 난모세포를 유리슬라이드(슬라이드 당 5개 이하의 난모세포)에 올려 파라핀-마셀린 모서리로 지지된 커버슬라이드를 덮고 24시간 동안 에탄올:아세트산 [3:1, v/v] 으로 고정하였다. 그 후 난모세포를 20분 동안 45% [v/v]아세트산의 1% [w/v] 옥세인으로 염색한 후, 슬라이드와 커버슬라이드 사이에서 gently running differentiation solution (20% [v/v]글리세롤 및 증류수에 희석한 20%[v/v]아세트산)으로 분화시켰다. Olympus IX71 위상차 현미경 (Tokyo, Japan)으로 난모세포를 MI(제1중기) 또는 MII(난자가 제1, 제2 감수분열을 모두 끝난 단계)으로 평가 및 분류하였다.

[0071] <1-7> DNA 말단 표지법(TUNEL) 분석

[0072] TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)을 In Situ Cell Death Detection kit (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA)을 사용하여 제조사의 설명에 따라 수행하였다. 구체적으로, 고정된 배아를 1 M PBS (PVP-PBS)가 처리된 0.3% [w/v]폴리비닐피롤리돈으로 2번 세척한 후 30분 동안 실온에서 투과하였다 (0.5% [v/v]Triton X-100 및 0.1% [w/v]구연산나트륨). 투과 후, 배아를 PVP-PBS로 2번 세척하고 37 °C의 암실에서 1시간 동안 형광성의 컨주게이션된 말단 데옥시뉴클레오티드 전이효소 dUTP로 배양하였다. 그 후 TUNEL-염색된 배아를 PVP-PBS로 세척하고 10분 동안 10 μ g/ml Hoechst 33342가 포함된

PVP-PBS에서 배양하였다. PVP-PBS로 세척한 후, 배반포를 유리슬라이드에 올리고 핵의 구성을 분석하였다. 배반포 당 세포수는 수은등이 설치된 Olympus IX71 EPI형광현미경으로 Hoechst-염색된 세포의 수를 세어 결정하였다. TUNEL-양성 세포는 세포사멸이 발생한 것을 나타내는 선홍색으로 보였다.

[0074] <1-8> 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응 (qRT-PCR) 분석

[0075] 제조사의 설명서에 따라 Arcturus PicoPure RNA 분리 키트 (Arcturus, Foster, CA, USA)를 사용하여 Day-8 배반포의 four biological replicates로부터 모든 RNA를 추출하였다. RNA 농도 및 순도는 NANO DROP 2000c 기기 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 결정하였다. RNA 샘플은 즉시 사용하거나 또는 사용할 때까지 -80 °C에 보관하였다. 제조사의 설명에 따라 iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 RNA 샘플을 first-strand cDNA에서 역전사시켰다. cDNA 샘플은 RT-PCR에 사용될 때까지 -20 °C에서 보관하였다. Primer 3Plus software (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) 및 GenBank에서 이용할 수 있는 선택된 유전자의 mRNA 서열을 사용하여 실시간 PCR 프라이머를 디자인하였으며 하기 표 1에 나타내었다. CFX98 기기 (Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 cDNA 샘플의 정량적 분석을 수행하였다. 결과의 재현가능성을 향상시키기 위하여, 동일한 cDNA에서 얻은 샘플은 각각의 PCR 반응에 대하여 원본으로 수행하였다. 타겟 유전자는 CFX manager V1.1 software (Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 $\Delta\Delta c(t)$ 방법으로 정량하였다. 정규화는 참고 유전자로써 GAPDH를 사용하여 수행하였다.

표 1

유전자	서열	GenBank accession no.	증폭산물 크기(bp)
NF-kB1	F: TGGCGGAATTACCTTCCATAC(서열번호 1) R: CATCACTCTTGCCACAACCTTTC(서열번호 2)	DQ464067	110
IκBβ	F: TCCATGTACAGGAAGTTGG(서열번호 3) R: TTTTAGGCGGAATTAACCCA(서열번호 4)	NM_174353.2	128
COX2	F: CTGACCCATACAAGCAGCATAG(서열번호 5) R: TCGTAAAGAAGGAAGAGCAATTAGA(서열번호 6)	DQ347627.1	99
iNOS	F: CGAGCTTCTACCTCAAGCTATC(서열번호 7) R: CTGGCCAGATGTTCTCTATTT(서열번호 8)	DQ676956.1	84
BAX	F: CACCAAGAAGCTGAGCGAGTGT(서열번호 9) R: TCGGAAAAAGACCTCTCGGGGA(서열번호 10)	NM_173894	118
caspase-3	F: CCCAAGTGTGACCACTGAAC(서열번호 11) R: CCATTAGGCCACACTCACTG(서열번호 12)	NM_001077840	169
JAK2	F: CTAGCAGTTCGAGTTGATCA(서열번호 13) R: AACAAAAGTCCACAGCAATG(서열번호 14)	XM_015464499.1	124
BCL2	F: TGGATGACCGAGTACCTGAA(서열번호 15) R: CAGCCAGGAGAAATCAAACA(서열번호 16)	NM_001166486	120
GADPH	F: CCCAGATATCATCCCTGCT(서열번호 17) R: CTGCTTCACCACCTTCTTGA(서열번호 18)	NM_001034034	185

[0079] <1-9> 면역 형광 분석

[0080] 고정된 DAY-8 소의 배아를 10분 동안 PVP-PBS으로 2번 세척하였다. 배아를 5분 동안 37 °C에서 단백질 분해효소 K 용액에서 배양시켰다. PVP-PBS로 세척한 후, 배아를 1시간 동안 blocking 용액 solution (5% [v/v]비면역성 고우트 혈청 및 0.3% [v/v]Triton X-100을 포함하는 D-PBS) 에서 배양시킨다. 배아를 NFB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 단일클론 일차항체 ([v/v]D-PBS 1:100 희석), kappa-B kinase beta (IKβ; Santa Cruz Biotechnology), 8-oxoguanine (8-OxoG; Millipore, Santa Cruz Biotechnology) 및 orccyclooxygenase-2 (COX2; Millipore, Santa Cruz Biotechnology)와 하룻밤 배양시키고, 이어서 90분 동안 실온에서 플루오레세인이소티오시안산염 (FITC) 또는 테트라메틸로르다아민이소티오시안산염 (TRITC)이 컨쥬게이션된 이차 항체와 배양한다. 세포핵을 5분 동안 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, dilute:100[v/v]inD-PBS)와 염색하였다. 염색된 배아를 Prolong anti-fade 시약 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)과 함께 유리슬라이드에 올린 후, Olympus Fluoview FV1000 공초점형 레이저-스캐닝 현미경으로 측정하였다. 신호의 겹침 (bleed-through)을 피하기 위하여 모든 이미지를 순차적인 방식으로 얻었다. 각각의 틀을 4번 스캔한 후, 노이즈가 감소된 이미지를 얻기 위하여 스캔한 이미지를 평균화하였다. NFB, IKβ, 8-OxoG, 및 COX2 통합적인 광학

밀도는 ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <https://imagej.nih.gov/ij>)를 사용하여 결정하였다. 상기 소프트웨어는 평균적인 픽셀 강도를 계산한다. 각각의 영상에 대한 2개의 배경영역의 평균으로 데이터를 정상화하였다. 각각의 단백질에 대한 평균 강도를 통계적으로 분석하였다.

[0082] <1-10> 통계 분석

[0083] SPSS software v.18.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 통계분석을 수행하였다. 실험 그룹 사이에서 배아 발달 (분열 및 배반포율)의 차이는 일원분산분석 (one-way ANOVA)으로 분석하였다. 시험 처리구간 차이를 분석하기 위하여 Duncan의 중다범위검정 (Duncan's multiple range test)을 사용하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차 (SEM)로 나타내었다. 유의도 수준 (The level of statistical significance)은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

[0085] <실시예 2> 2-메톡시스티판드론 (2-MS)을 체외성숙 배지에 첨가한 소 체외수정란의 질적 수준 개선 분석

[0086] <2-1> 체외 성숙(IVM) 동안 핵의 성숙에 대한 2-메톡시스티판드론 (2-MS)의 효과 분석

[0087] 잠재적인 항산화제인 2-메톡시스티판드론 (2-MS)가 난모세포의 체외 성숙에 미치는 영향을 분석하였다.

[0088] 구체적으로, 414개의 적세포 난모 세포 복합체를 수집하여 다양한 배양 조건 하에서 수행된 시험관 성숙 실험에 대하여 사용하였다. 아세트-올세인 염색을 사용하여 첫 번째 돌출된 극체의 존재에 의해 난모세포 핵의 성숙 여부를 측정하였다.

[0089] 그 결과, 대조군과 비교하여, 1 μ M 2-메톡시스티판드론 (2-MS)이 처리된 체외 성숙 배지에서 난모세포는 상당히 높은 비율로 성숙 난자(MII) 단계로 진전되는 것을 확인하였다 (각각, $76.48 \pm 0.90\%$ vs. $65.38 \pm 1.0\%$) (도 1).

[0091] <2-2> 착상 전 동안 배의 발달에 대한 2-메톡시스티판드론 (2-MS)의 효과 분석

[0092] Day3 및 Day8 각각에 대하여 조기 분열 및 배반포 발달율과 같은 착상 전 발달에 대해 2-MS의 효과를 분석하였다.

[0093] 그 결과, 2-메톡시스티판드론 (2-MS) 처리군 및 대조군 사이에서 배아가 조기 분열하는 비율에 대해서는 차이가 없었다 (각각, $77.33 \pm 1.59\%$ vs. $73.49 \pm 1.77\%$). 그러나 성숙 전 1 μ M 2-메톡시스티판드론 (2-MS) 처리된 배아의 배반포 단계에 대한 발달은 $32.21 \pm 1.29\%$ (대조군)에서 $45.29 \pm 2.10\%$ ($p < 0.05$)와 같이 상당히 증가한 것을 확인하였고 하기 표 2에 구체적인 결과를 나타내었다.

표 2

2-MS 농도 (μ M)	전체 난모세포의 수*	접합체	난할 배아의 수 (% $\pm$ SEM)	전체 배반포의 수 (% $\pm$ SEM)**
1.5	458	413	307 (74.17 ± 2.06) ^a	133 (32.60 ± 1.59) ^b
1.0	493	449	347 (77.33 ± 1.59) ^a	201 (45.29 ± 2.10) ^a
0.5	468	437	333 (76.52 ± 1.85) ^a	157 (36.21 ± 1.90) ^b
0.1	470	428	321 (74.91 ± 1.62) ^a	150 (35.02 ± 0.78) ^b
0(대조군)	475	418	306 (73.49 ± 1.77) ^a	135 (32.21 ± 1.29) ^b

[0096] ^{a, b} 다른 위첨자의 수치는 유의하다. ($P < 0.05$).

[0097] *전체 난모세포의 수: 본 실험은 8번 반복하였다.

[0098] **전체 배반포의 수: 배반포의 비율은 접합체에 비례한다.

[0100] 또한, 2-MS 처리에 의해 더 높은 배반포로의 발달이 배반포 단계의 배아에 질적으로 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 배반포에서 총 세포의 숫자 및 사멸한 핵의 빈도를 측정하였다. Hoechst 33342 염색 및 TUNEL 분석에 의해 총 세포의 숫자 및 사멸한 핵을 각각 측정하였다.

[0101] 그 결과, 대조군과 비교하여 2-메톡시스티판드론 (2-MS) 처리된 그룹에서 총 세포의 수의 상당한 증가 및 사멸

한 핵의 비율의 감소하는 것을 확인하였다 (각각, 191.40 ± 1.42 vs 145.47 ± 1.52 및 3.0 ± 0.22 vs 5.27 ± 0.23 ; $p < 0.05$) (도 2 및 3).

[0103] <2-3> 타겟 유전자의 mRNA 발현 분석

[0104] BCL2-associated X protein (BAX), caspase-3 및 Janus kinase 2 (JAK2)와 같이 세포사멸을 유도하는 유전자 및 gene B-cell lymphoma 2 (BCL2)와 같이 세포사멸을 억제하는 유전자뿐만 아니라, NFkB, Ikk β , COX2, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 같이 산화 스트레스와 관련된 유전자의 mRNA 발현 정도를 정량하기 위하여 qRT-PCR을 수행하였다. 상기 유전자의 발현 정도는 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)인 GAPDH로 정상화하였다.

[0105] 그 결과, 대조군과 비교하여 배지에 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)를 1 μ M 첨가한 경우 세포사멸을 억제하는 유전자인 BCL2의 mRNA 발현 정도는 상당히 높았으나 ($p < 0.05$), 대조군과 비교하여 2-MS를 처리한 경우 NFkB, Ikk β , COX2, 및 iNOS 뿐만 아니라, 세포사멸을 유도하는 유전자인 BAX, caspase-3, 및 JAK2의 mRNA 발현 정도는 상당히 감소한 것을 확인하였다($p < 0.05$) (도 4).

[0107] <2-4> NFkB, Ikk β , 8-oxoguanine 및 COX2에 대한 면역형광검사

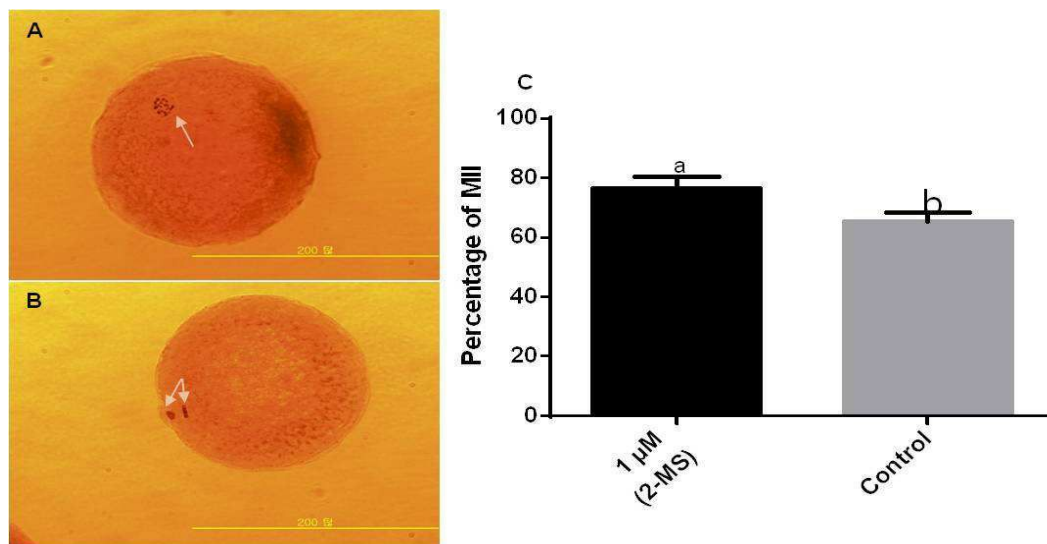
[0108] NFkB, Ikk β , 8-oxoguanine (8-OXG) 및 COX2의 단백질을 발현을 정량하기 위하여 단일특이적 항체를 사용하여 면역형광검사를 수행하였다.

[0109] 그 결과, 대조군과 비교하여 1 μ M의 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)를 처리한 배아의 NFkB에 있어서, ImageJ software에 의해 측정된 통합적인 빛의 강도는 상당히 감소하는 것을 확인하였다 ($p < 0.05$) (도 5).

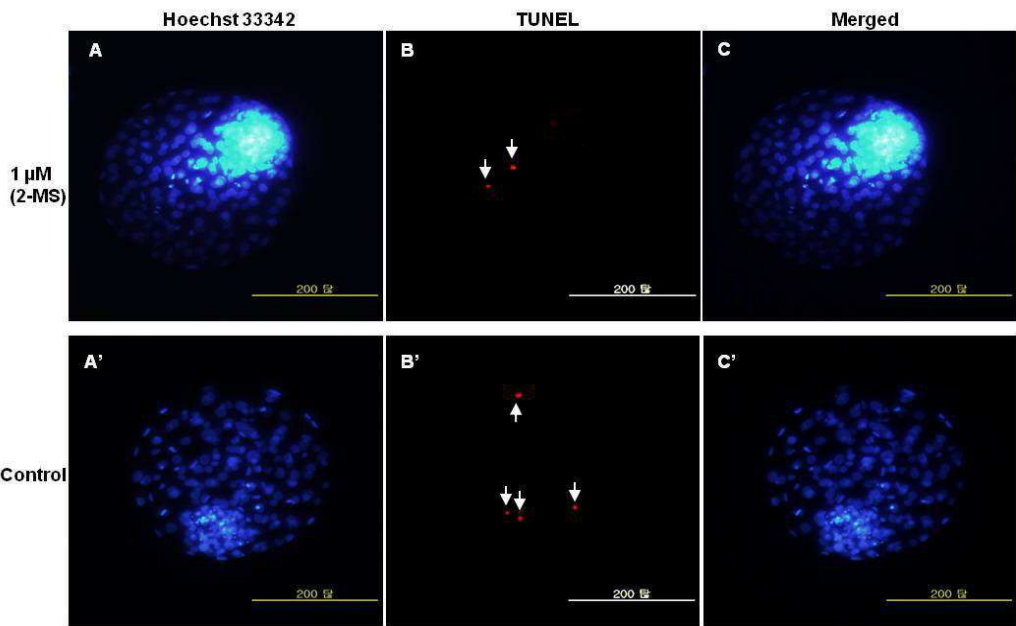
[0110] 또한, 대조군과 비교하여 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)를 처리한 경우에 Ikk β 의 발현 정도는 상당히 낮았다 ($p < 0.05$) (도 6). 활성산소종으로 인하여 주로 염기를 산화시키는 8-oxoguanine (8-OXG)의 발현 정도는 대조군과 비교하여 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)를 처리한 경우에 상당히 감소하는 것을 확인하였다 ($p < 0.05$) (도 7). 게다가, COX2의 발현 정도는 대조군과 비교하여 2-메톡시스티펜드론 (2-MS)를 처리한 배아의 경우에 상당히 감소한 것을 확인하였다 (도 8).

도면

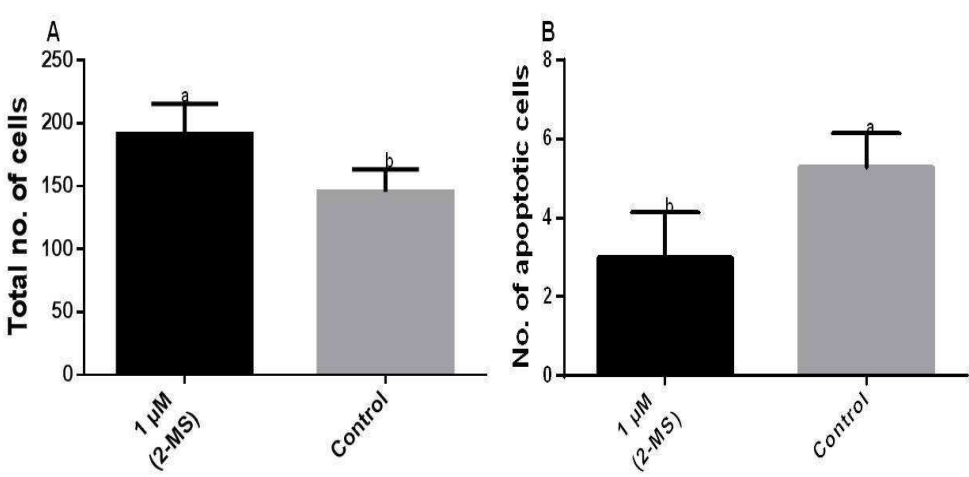
도면1



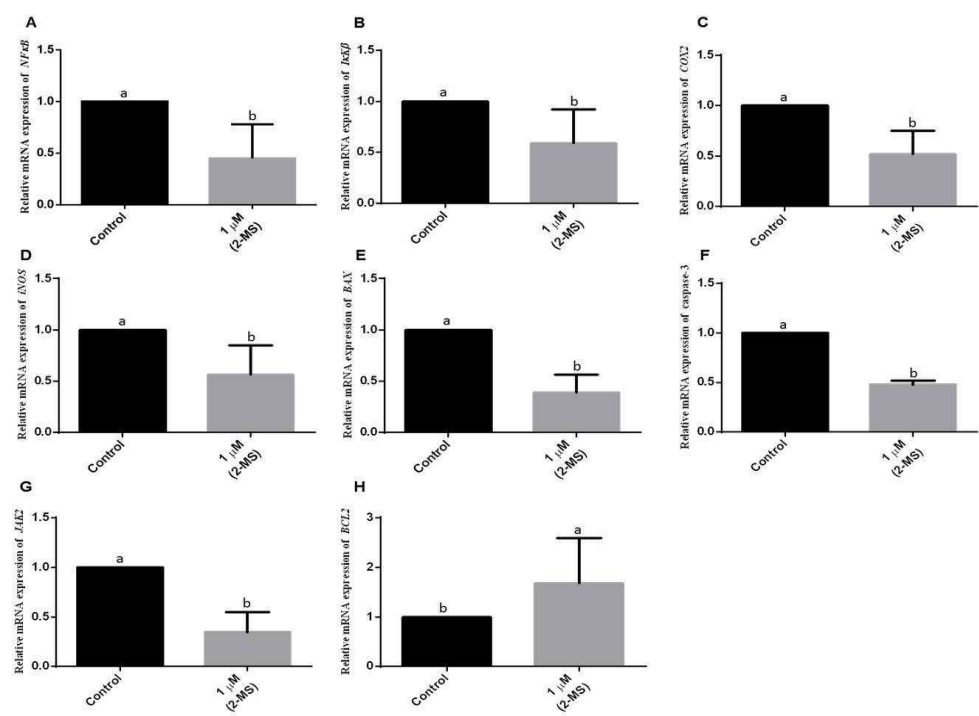
도면2



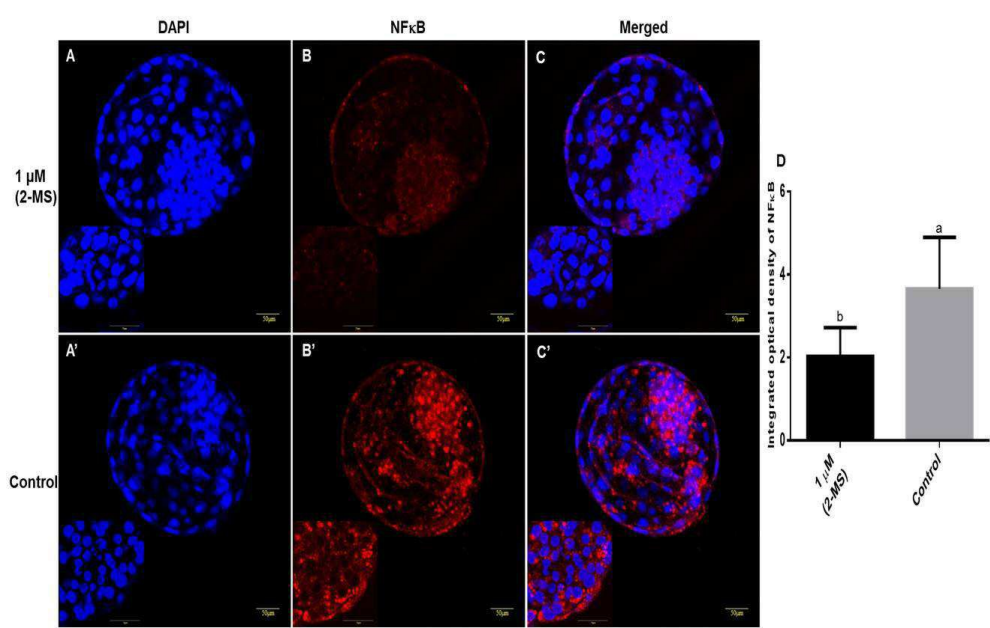
도면3



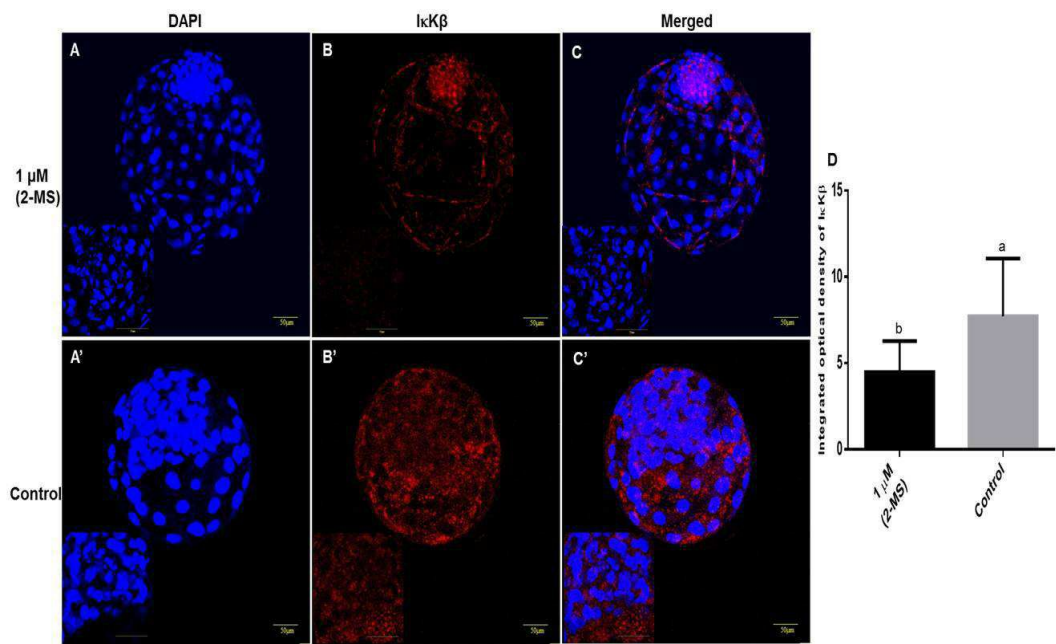
도면4



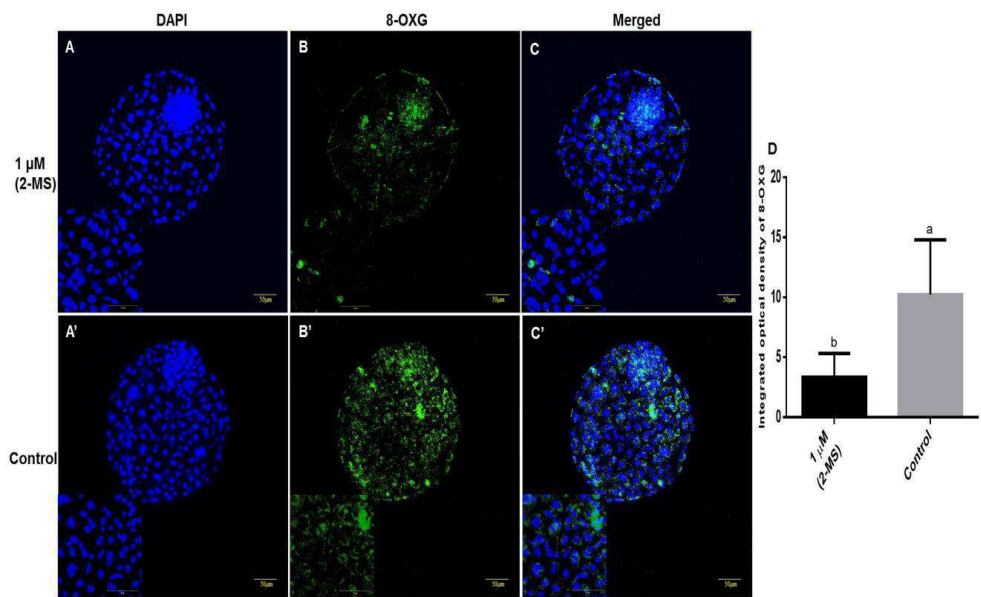
도면5



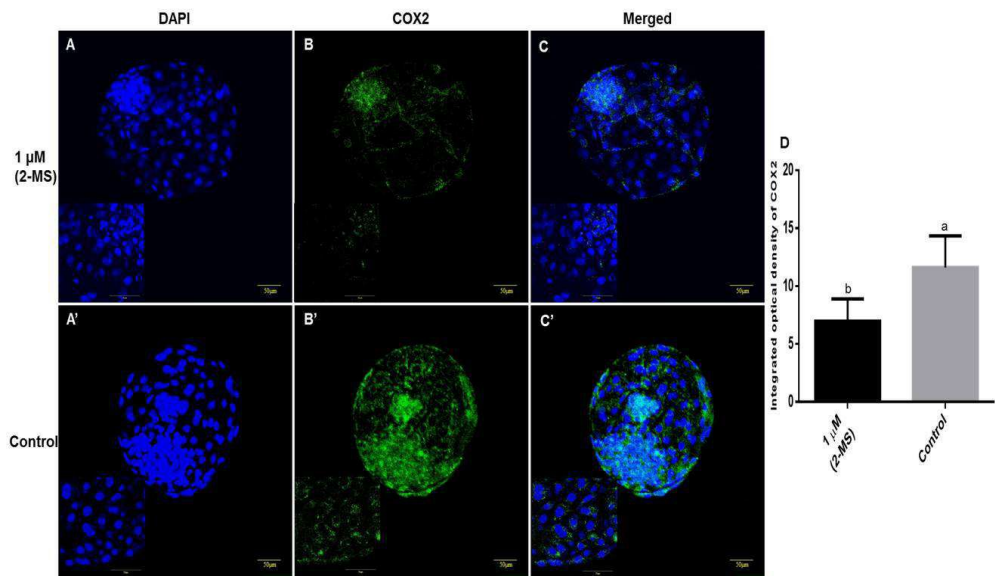
도면6



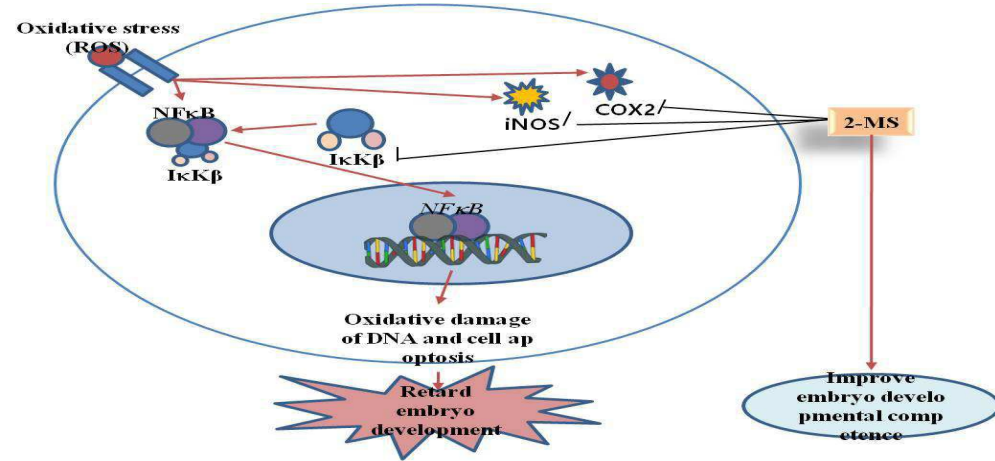
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Composition for Culturing vitro-produced embryo containing 2-Methoxystypandrone and Method of Culturing vitro-produced embryo Using Thereof
- <130> PN1610-381
- <160> 18
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> NF-kB1 forward primer

<400> 1

tggcggaatt accttcata c 21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NF-kB1 reverse primer

<400> 2

catcactctt gccacaactt tc 22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IkKb forward primer

<400> 3

tccatgtaca ggaagtttgg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IkKb reverse primer

<400> 4

ttttaggcgg aattaaccca 20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX2 forward primer

<400> 5

ctgaccata caagcacgat ag 22

<210> 6

<211> 25

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COX2 reverse primer	
<400>	6	
	tcgtaaagaa ggaagagcaa ttaga	25
<210>	7	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	iNOS forward primer	
<400>	7	
	cgagcttcta cctcaageta tc	22
<210>	8	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	iNOS reverse primer	
<400>	8	
	ctggccagat gttcctctat tt	22
<210>	9	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	BAX forward primer	
<400>	9	
	caccaagaag ctgagcgagt gt	22
<210>	10	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	BAX reverse primer	
<400>	10	
	tcggaaaaag acctctcggg ga	22

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> caspase-3 forward primer
 <400> 11
 cccaagtgtg accactgaac 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> caspase-3 reverse primer
 <400> 12
 ccattaggcc aactcactg 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JAK2 forward primer
 <400> 13
 ctagcagttc gattgatca 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JAK2 reverse primer
 <400> 14
 aacaaaagtc cacagcaatg 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BCL2 forward primer

<400>	15	
tggatgaccg agtacctgaa		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	BCL2 reverse primer	
<400>	16	
cagccaggag aaatcaaaca		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GADPH forward primer	
<400>	17	
cccagaatat catccctgct		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GADPH reverse primer	
<400>	18	
ctgcttcacc accttcttga		20