(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월23일
(11) 등록번호 10-2058338
(24) 등록일자 2019년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
C12N 5/0667 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0128146
(22) 출원일자 2019년10월16일
심사청구일자 2019년10월16일
(30) 우선권주장
1020190094812 2019년08월05일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020180119924 A*
KR1020140137753 A*
JP2018048115 A
JP2019004904 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
조종기
대전광역시 유성구 가정로 43, 103동 1201호(신성동, 한울아파트)
김민정
서울특별시 강남구 도곡로 404, 101동 305호(대치동, 롯데캐슬리베아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

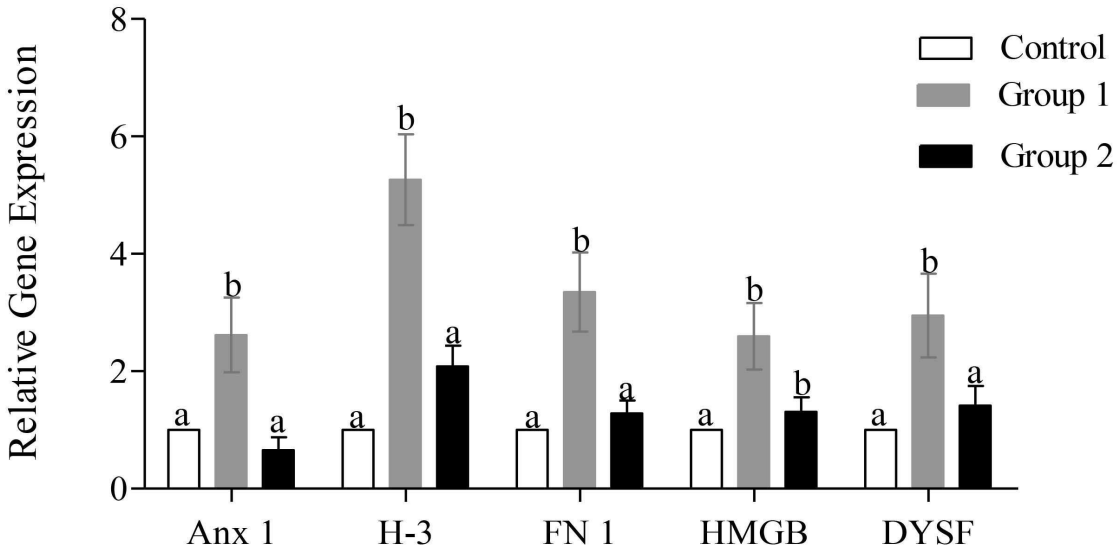
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 강신건

(54) 발명의 명칭 **중간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 개과 동물의 정액 동결보존용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 포함하는 개과(Canidae) 동물의 정액 동결보존용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 Ad-MSCs가 첨가된 동결보존제는 개 정자의 생존성 및 운동성 증진 효과가 우수하므로, 개과 동물의 정액을 동결보존하여 인공수정 등의 다양한 방법으로 활용하여 개과 동물의 육종 및 품종 개량에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

아마드 야르 카마르

대전광역시 유성구 농대로2번길 17, 102호(어은동)

방훈

대전광역시 유성구 궁동로18번길 9, 302호(궁동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395060336
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	반려동물산업활성화 핵심기반기술개발
연구과제명	지방줄기세포를 이용한 번식능 향상기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

개의 지방조직 유래 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 포함하는 개과(Canidae) 동물의 정액 동결보존용 조성물로서,

상기 개의 지방조직 유래 중간엽줄기세포는 동결보존용 조성물의 단위부피 ㎖ 당 2×10^6 내지 3×10^6개가 포함되는 것을 특징으로 하는 개과 동물의 정액 동결보존용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 개과 동물은 개, 늑대, 여우, 재칼, 코요테, 승냥이 및 너구리로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 개과 동물의 정액 동결보존용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 동결보존용 조성물은 트리스하이드록시메틸아미노메탄, 시트르산, 프럭토스, 황산카나마이신, 난황 및 글리세롤을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 개과 동물의 정액 동결보존용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 동결보존용 조성물은 개과 동물 정자의 운동성, 생존율 및 정자막 안정성을 향상시키는 것을 특징으로 하는 개과 동물의 정액 동결보존용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 개과 동물은 개인 것을 특징으로 하는 개과 동물의 정액 동결보존용 조성물.

청구항 8

(1) 제1항, 제3항, 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 동결보존용 조성물에 개과 동물의 정액을 혼합하는 단계; 및

(2) 상기 혼합물을 동결 및 보존하는 단계를 포함하는, 개과 동물 정액의 동결보존방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 중간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 개과 동물의 정액 동결보존용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 정자의 동결과 저온 보관은 가축 등의 품종의 보존과 번식에 유용하며 생명공학 분야에서 활발히 연구되고 있는 분야이다. 동결보존시 정자는 세포 내 빙정 형성, 삼투압의 차이 그리고 저온 스트레스에 의해 손상을 받게 되는데, 이러한 손상을 감소시키는 물질이 동결보존제이며 대표적인 물질로는 글리세롤(glycerol)이 있다. 동결과정에 쓰이는 원정액은 농도가 높기 때문에 희석액을 사용하여 희석해야 하며, 희석과정 중에 동결보존제가 희석액과 함께 투여된다. 개의 경우에는 동결정액을 이용한 인공수정이 다른 산업동물에 비해 산업적으로 잘 이루어

지지 않고 있으며, 그 성공 효율도 매우 낮은 편이다. 이는 개에서 정자 채취시 동결정액의 제조를 위한 충분한 수의 정자가 채취되지 않고, 개 정자가 냉장 보관시에는 상대적으로 오래 생존하는 편이지만 동결에는 취약하기 때문이다.

[0003] 동결보존 기술(cryopreservative technique)은 실험관 수정, 복제, 형질전환과 같은 배아 기술(embryo technology)이 발달하면서 필요성이 대두되었다. 그러나 현재까지 개발된 다양한 동결보존 기술은 세포 내 기관의 붕괴, 세포 내 골격 손상, 세포사, 배아의 생존 능력 감소를 이끄는 심각한 형태학적, 생화학적인 변화를 유발시켰다. 특히, 동결-융해된 정자는 신선 정자(fresh sperm)와 같은 동일한 수정능을 가지지 못하는데, 이는 22℃에서 1℃로 냉각되는 동안 세포막 내 지질 및 단백질의 재배열이 유도되기 때문이다. 이에 본 발명에서는 기존의 화학 약품 및 난황을 이용한 정자의 동결보존 방법이 아닌, 다양한 세포의 유익한 성분을 배출하고 분화능이 뛰어난 개 유래 지방줄기세포를 이용하여 동결보존 효율이 높은 개 정액 동결보존용 조성물을 개발하였다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1821545호에는 '앙콜 소 정자 동결보존용 조성물 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1396925호에는 '루코스포리디움 속 미생물 유래 결빙 방지 단백질을 이용한 생식 세포 또는 생체 조직의 동결보존 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 중간엽줄기세포를 유효성분으로 포함하는 개과 동물의 정액 동결보존용 조성물에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 개의 지방 유래 중간엽줄기세포(Adipose tissue drived mesenchymal stem cell)가 함유된 정액 동결보존제를 사용하여 개의 정액을 동결시킨 후 다시 해동시킨 결과, 중간엽줄기세포를 포함하지 않는 동결보존제를 이용한 무처리 대조군에 비해 중간엽줄기세포를 포함하는 동결보존제를 이용한 실험군에서 동결-융해된 정자의 운동성과 생존율이 증가하고, 정자막 보존과 관련된 유전자의 발현량이 증가되어 정자막 보존성을 향상시킬 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 포함하는 개과(Canidae) 동물의 정액 동결보존용 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 본 발명의 동결보존용 조성물에 개과 동물의 정액을 혼합하는 단계; 및 (2) 상기 혼합물을 동결 및 보존하는 단계;를 포함하는, 개과 동물 정액의 동결보존방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 동결보존용 조성물은 개과 동물의 정액을 냉각 및 동결 보존한 후에도 정자의 운동성, 생존율 및 정자막 보존성을 향상시키는 효과가 우수하므로, 개과 동물의 종 개량 또는 혈통 보존 등을 위한 체외 번식기술에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 개 유래 지방줄기세포(Ad-MSCs)와 개 유래 섬유아세포(skin fibroblast)를 배양한 사진(50X 배율)이다.

도 2는 에오신-니그로신(eosin-nigrosin) 염색을 수행하여 생존한 정자(a)와 사멸한 정자를(b) 확인한 현미경 사진(1,000X 배율)이다. 하얀색 화살표: 생존한 정자, 하얀색의 화살촉 모양: 사멸한 정자.

도 3은 저삼투압 팽화검사법(Hypo-Osmotic Swelling Test)을 수행하여 정자 세포막의 완전성(integrity)을 확인한 현미경 사진(1,000X 배율)이다. 하얀색 화살표: 세포막이 온전한 정자, 하얀색의 화살촉 모양: 세포막이 손상된 정자.

도 4는 개 유래 Ad-MSCs 세포와 피부 섬유아세포에서 *ANX1*(annexin-I), H-3(histone H-3), *FN 1*(fibronectin 1), *HMGB*(high mobility group protein B) 및 *DYSF*(dysferlin) 유전자의 발현 수준을 정량화하여 나타낸 그래프이다.

도 5는 동결보존액 단위부피(㎖) 당 개 유래 Ad-MSCs를 2.5×10^6개(Group 1) 또는 5×10^6개(Group 2)로 각각 첨가한 동결보존액을 이용하여 동결-융해된 정자에서 정자막 생존 관련 유전자인 *ANX1*, H-3, *FN 1*, *HMGB* 및 *DYSF*

유전자의 발현 수준을 RT-qPCR로 확인한 결과이다.

도 6은 동결보존액 단위부피(㎖) 당 개 유래 Ad-MSCs를 2.5×10^6개(Group 1)동결보존액을 이용하여 동결-융해된 정자에서 정자막 생존 관련 유전자인 *ANX1*, H-3, *FN 1*, *HMGB* 및 *DYSF*의 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)를 유효성분으로 포함하는 개과(Canidae) 동물의 정액 동결보존용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서, 용어 '줄기세포'는 증식(자기-재생) 및 분화(가소성)할 수 있는 능력을 갖는 어떠한 미분화 세포 또는 부분적 미분화 세포를 포함한다. 이러한 줄기세포는 발생 과정 중 종점(endpoint) 단계의 세포인 특정 세포 리니지(lineage)의 성숙세포를 대체한다. 또한, 줄기세포는 무제한 자기-재생능 및 전분화능 가소성을 갖는 줄기세포 및, 다분화능 또는 단분화능 가소성을 갖는 전구세포를 포함한다.

[0012] 본 발명에서, 용어 '중간엽줄기세포'는 줄기세포능(stemness)과 자기재생능(self renewal)을 유지하고 다양한 간엽조직으로 분화할 수 있는 능력(plasticity)이 있는 세포를 의미한다. 본 발명의 중간엽줄기세포는 지방조직, 뇌, 간, 폐, 제대혈, 태아혈, 신장, 태반 또는 골수로부터 유래한 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 지방 조직 유래 중간엽줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 본 발명에서, 용어 '정액'은 수컷 동물의 생식 기관을 통해 배출된 액체를 의미하는 것으로, 정자를 비롯하여 정자의 운동성을 위한 영양물질과 완충물질을 포함하고 있다.

[0014] 본 발명에서, 용어 '동결보존'은 세포(난자, 정자, 배아)를 초저온 상태에서 보관하여 생명활동을 일시적으로 중단시킨 후 필요할 때 해동하여 사용할 수 있도록하는 방법을 의미한다.

[0015] 본 발명의 동결보존용 조성물에 있어서, 상기 개과 동물은 개, 늑대, 여우, 재칼, 코요테, 승냥이 또는 너구리일 수 있고, 바람직하게는 개일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명의 동결보존용 조성물은 중간엽줄기세포를 동결보존용 조성물의 단위부피(㎖) 당 2×10^5 내지 6×10^7개 농도로 포함할 수 있고, 바람직하게는 2×10^6 내지 5.5×10^6개 농도로 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 2×10^6 내지 3×10^6개 농도로 포함할 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 2.5×10^6개 농도로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 동결보존용 조성물은 트리스하이드록시메틸아미노메탄, 시트르산, 프럭토스, 황산카나마이신, 난황 및 글리세롤로 이루어진 희석액을 추가로 포함할 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않고, 당류, 유기산, 난황, 항생제 등을 포함하는 희석액(완충액)을 사용할 수 있다. 예를 들어, 글루코스, 프럭토스, 수크로스, 덱스트란 등의 당류; 시트르산, 아세트산, 부티르산, 팔미트산, 옥살산, 타타르산 등의 유기산; 스트렙토마이신, 페니실린, 앰피실린, 카나마이신 등의 항생제; 및 난황을 포함하는 희석액(완충액)을 사용할 수 있으며, 이들 각 성분은 당업자가 필요에 따라 조합하여 사용할 수 있다. 상기 희석액은 원 정액의 농도를 저하시키고 동결보존시 정자간의 충돌로 인하여 발생할 수도 있는 손상을 방지하기 위해 사용된다.

[0018] 본 발명에 따른 동결보존용 조성물은 개과 동물의 정액을 동결하는 과정에서 발생하는 정자세포의 손상을 최소화함으로써, 동결 및 융해된 정액 내 정자의 운동성, 생존율 및 정자막 안정성을 향상시키는 효과가 있다.

[0019] 본 발명은 또한,

[0020] (1) 상기 동결보존용 조성물에 개과 동물의 정액을 혼합하는 단계; 및 (2) 상기 혼합물을 동결 및 보존하는 단계를 포함하는, 개과 동물 정액의 동결보존방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 동결보존용 조성물은 전술한 것과 같다.

[0022] 또한, 상기 동결보존용 조성물에 포함되는 개과 동물의 정자 농도는 동결보존용 조성물의 단위부피(㎖) 당 0.8×10^8 내지 1.2×10^8개일 수 있고, 바람직하게는 1×10^8 개일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 개과 동물 정액의 동결보존방법은 구체적으로는,

[0024] 개과 동물의 정액을 채취하는 단계; 상기 채취된 정액을 원심분리하여 상층액을 제거하고 1차 희석제를 첨가한 후 다시 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 수득하는 단계; 상기 침전물에 1차 희석액을 첨가하여 정자의 수가 1차 희석액 단위부피(㎖) 당 1.8×10^8 내지 2.2×10^8개가 되도록 희석하고 침전물을 재부유(resuspension)시키는 단계; 상기 재부유된 침전물에 개의 지방 유래 중간엽줄기세포(Ad-MCSs)가 함유된 2차 희석액을 첨가하여 정자의 수가 1차 및 2차 희석액 단위부피(㎖) 당 0.8×10^8 내지 1.2×10^8개가 되도록 희석한 후 냉각하여 동결된 정액을 수득하는 단계;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 동결 및 보존은 정액을 동결보존할 수 있는 한 공지된 모든 수단에 의해 수행될 수 있으며, 바람직하게는 액체질소를 사용하여 초저온에서 동결 및 보존될 수 있고, 상기 동결된 정액은 반영구적으로 보존될 수 있다. 상기 동결보존된 개과 동물의 정액을 융해시키는 방법은 동결보존된 정액을 정상상태로 회복시킬 수 있다면 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다.

[0026] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0027] **재료 및 방법**

[0028] **1. 개 지방줄기세포 배양**

[0029] Ad-MSCs(adipose tissue derived mesenchymal stem cells)와 상기 줄기세포 배양용 배지(AMSC 배지)는 ㈜네이처셀로부터 공급받아 사용하였다. 동결된 Ad-MSCs를 37℃의 항온수조 안에서 해동시킨 후 AMSC 배지에서 재부유시키고 워싱을 실시하였다. 워싱 끝난 후 Ad-MSCs의 증식이 80~90% 정도까지 도달할 때까지 37℃, 5% CO_2 조건하에서 배양하였다(도 1). 3계대에서 Ad-MSCs는 0.05% 트립신-EDTA를 사용하여 단일세포로 분리하여 정액 동결보존액으로 사용하였다.

[0030] **2. 정액 채취 및 준비**

[0031] 비글(Beagle) 품종에서 수지마찰법을 이용하여 주 2회 빈도로 정액을 채취하였다. ㎖ 당 1억 개 이상의 정자가 포함되어 있으면서 70% 이상의 운동능과 80% 이상의 생존능을 가지고 정상적인 형태를 가진 정자가 포함되어 있는 정액만 모아서 실험에 사용하였다. 모은 정액을 상온에서 100xg로 1분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 1차 버퍼[4 g/L Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 14 g/L citric acid, 8 g/L of fructose 및 0.15 g/L kanamycin sulfate in distilled water(pH 6.6, 290 mOsm)]를 상기 정액과 동일한 양으로 정액에 첨가 후 700g로 5분간 원심분리를 실시하였다. 상층액을 버린 후 ㎖ 당 정자의 수가 2억 개(2×10^8)가 되도록 1차 버퍼를 첨가하였고, 2차 버퍼(54% (v/v) first buffer, 40% (v/v) egg yolk and 6% glycerol)를 동량으로 첨가하여 ㎖ 당 정자의 수가 1억 개(1×10^8)가 되도록 하여 펠렛을 풀어주었다. 이때, 2차 버퍼에 Ad-MSCs를 첨가하지 않은 군을 대조군, 2차 버퍼에 2.5×10^6 Ad-MSCs/㎖이 첨가된 군은 실험군 1, 5×10^6 Ad-MSCs/㎖이 첨가된 군은 실험군 2로 설정하였다. 2차 버퍼는 30초 간격으로 최종 볼륨의 14%, 19%, 27%, 40%의 양으로 나누어 첨가하였다. 실험군별 배지는 정액 채취 직전에 준비하여 이산화탄소가 공급되는 37℃ 인큐베이터 내에서 45~60분 동안 정치하였다.

[0032] **3. 정액 동결 및 융해**

[0033] 상기 대조군, 실험군 1 및 실험군 2를 동결 보존용기인 straw 0.25㎖에 각각 로딩한 후 straw를 4℃에서 1시간 동안 정치시키고, 액체질소 위 2cm 지점에서 15분 동안 정치시켜서 평형상태를 만든 후 액체질소에 넣어서 보관하였다. 일주일 후 동결 정액을 37℃의 항온수조기에 30초 동안 넣어 융해하였다. 1차 버퍼로 1:5로 희석하였는데, 이 때 1차 버퍼는 총 14%, 19%, 27%, 40%의 양으로 나누어 첨가하였다.

[0034] **4. 융해된 정액에서 정자의 분리**

[0035] 융해된 정액에서 정자의 분리는 퍼콜 밀도구배(percoll density gradient) 방법을 통해 수행되었다. 15㎖ 튜브에 퍼콜을 45%와 90% 층으로 나누어 담고, 그 위에 동결-융해 정액을 가볍게 도포한 후 상온에서 400xg로 20분 동안 원심분리를 실시한 다음 정자가 많은 중간층에 해당하는 부분을 회수하였다.

[0036] **5. 정자 운동능 분석**

[0037] 회수한 정자 10㎕를 따뜻한 정액 분석용 유리 챔버에 올리고 유리 덮개로 덮었다. 유리 챔버를 컴퓨터와 연결된

현미경에 올린 후 정액자동분석기(sperm analysis imaging system; FSA2011 premium edition version 2011)를 사용하여 5개의 영역에서 200개의 움직이는 정자를 스크리닝하는 방법으로 운동능을 분석하였다.

[0038] **6. 정자 생존능 분석**

[0039] 따뜻한 슬라이드 글라스 위에서 5~10㎕의 회수한 정자와 동량의 에오신-니그로신(eosin-nigrosin) 염색 시약을 혼합하고 상기 혼합물을 새로운 슬라이드 글라스에 얇게 펴서 공기 중에서 건조시킨 후 슬라이드 글라스마다 200개의 정자를 세어 정자막이 온전한 정자(도 2a)와 정자막이 온전하지 않은 정자(도 2b)로 분류하였다.

[0040] **7. 정자의 세포막 완전성(integrity) 분석**

[0041] 회수한 정액 50㎕를 500㎕의 저삼투성 팽창(hypo-osmotic swelling) 용액(190 mOsmol/kg)과 혼합하고 37℃에서 30분간 정치시켰으며, 그 중 5㎕를 위상차현미경(phase-contrast microscope)을 사용하여 200개의 정자를 세었고, 세포막이 온전하고 꼬리가 말린 정자(도 3a)와 그렇지 않은 정자(도 3b)로 분류하였다. 살아있는 정자의 경우 삼투압 현상으로 인해 저장액이 정자 안으로 많이 들어가 꼬리 끝이 curling되어 있는 것을 확인할 수 있으며, 사멸한 정자는 삼투압 현상이 나타나지 않으므로 정자 꼬리에 변화가 없다.

[0042] **8. 정자 염색질 분석**

[0043] 워싱한 정자는 슬라이드 글라스 위에 얇게 펴서 건조시킨 후 Carnoy's 용액(3:1, methanol: glacial acetic acid)으로 하룻밤 동안 고정시켰다. 슬라이드 글라스를 상온에서 0.1M 시트르산 용액(pH 2.5)에 5분간 정치시키고 정제수로 워싱한 다음 아크리딘 오렌지 용액(acridine orange solution, 0.2mg/mℓ water)에 5분간 정치시키고 증류수로 워싱하였다. 이 후, 슬라이드 글라스를 Zeiss 현미경으로 관찰하였다. 정자 200개를 센 후 정상 염색질을 가진 정자는 정자 머리를 녹색(bicatenary DNA)으로, 비정상 염색질을 가진 정자는 정자 머리를 빨간색(monicatenary DNA)으로 분류하였다.

[0044] **9. 유전자 발현 분석**

[0045] 동결-융해된 정자에 Trizol reagent를 사용하여 RNA를 추출하였고, Maxime RT PreMix를 사용하여 cDNA를 합성하였다. RT-qPCR(Real-time quantitative polymerase chain reaction)은 액틴(*ACTB*) 유전자 대비 세포막 회복 관련 유전자(*ANX1*, *FN1* 및 *DYSF*)와 염색질 회복 관련 유전자(histone *H-3* 및 *HMGB*)의 발현을 Step One Plus Real-Time PCR System을 사용하여 분석하였다. 상기 유전자들의 프라이머 서열 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0046] 프라이머 서열 정보

프라이머 명칭	프라이머 서열(5'→3') (서열번호)	크기(bp)	NCBI accession NO.
ANX1	F: GAAGCTCTGAAGAAAGCCC (1)	128	NC_006583.3
	R: GTGTCTTCATCAGTTCCAAGG (2)		
Histone H-3	F: CGGTGACTGACACGCGAC (3)	136	NC_006599.3
	R: GTTGGAGCAGGCCTTGAACC (4)		
FN1	F: ATAGCTGGCTGTTACGAC (5)	74	NC_006619.3
	R: GCATTTCCCAGGTAGGTG (6)		
HMGB	F: ATATTGCTGCGTACCGAG (7)	64	NC_006607.3
	R: TCAGCCTTGACAACTCCC (8)		
DYSF	F: TGGATCAGAGTGGCGTCC (9)	127	NC_006599.3
	R: GACAGCAGCTTTCTGGCT (10)		

[0047] **10. 웨스턴 블롯팅(Western blotting)**

[0048] 대조군과 최적 농도의 MSC가 함유된 실험군 1에서 동결-융해된 정자를 사용하여 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하였다. 정자에서 단백질은 단백질 추출 용액을 사용하여 추출하였고, 상기 추출된 단백질 25ug을 2X Laemmli 샘플 버퍼에 1:2로 섞은 후 100℃에서 10분간 반응시켰다. 샘플을 10%(w/v) 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하여 90V로 2시간 동안 전기영동을 실시하였으며, Precision Plus Protein™ Standards Dual Color를 마커로 사용하였다. 분리된 단백질은 메탄올로 활성화된 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인으로 트랜스퍼되었고, 5%(w/v) 탈지유를 이용하여 상온에서 90분 동안 블로킹하였다. 멤브레인은 4℃ 조건에서 1차 항체

[primary goat polyclonal anti-annexin A1(Abcam, 영국), rabbit polyclonal anti-acetyl-histone H3(Millipore, 미국), rabbit polyclonal anti-fibronectin 1(Abcam), mouse monoclonal anti HMG-1(Sigma, 미국) rabbit polyclonal anti-dysferlin 및 mouse monoclonal anti-beta actin(Abcam)]에서 밤새도록 반응시키고 워싱한 후 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated goat anti goat, rabbit or mouse antibodies; Abcam)를 사용하여 4℃ 조건에서 2시간 동안 반응시켰다. 멤브레인을 Clarity™ Western ECL에 5분간 반응시킨 다음 Chemiluminescence imaging-Fusion SOLO 소프트웨어(Vilber Lourmat, 프랑스)를 사용하여 chemiluminescence signals을 분석하였다. 이 후, 밴드는 Image J 소프트웨어를 사용하여 정량하였다.

[0049] **11. 통계 분석**

[0050] 모든 값은 mean±SEM으로 표기하였고, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다. ANOVA(One-way analysis of variance)와 Tukey's Multiple Comparison Test를 사용하여 대조군과 실험군을 비교하였다. One sample *t*-test를 사용하여 대조군과 적합 농도 처리군 간의 단백질 발현 분석을 비교하였다. 모든 결과는 SPSS 21.0 소프트웨어(SPSS Inc., 미국)를 사용하여 분석하였다.

[0051] **실시예 1. RT-qPCR(Real-time quantitative polymerase chain reaction) 수행 결과**

[0052] Ad-MSCs와 피부 섬유아세포를 대상으로 정자막 보존과 관련된 *ANX1*(annexin-I), *H-3*(histone H-3), *FN 1*(fibronectin 1), *HMGB*(high mobility group protein B) 및 *DYSF*(dysferlin) 유전자의 발현 수준을 RT-qPCR로 분석하였다(도 4). 그 결과, 피부 섬유아세포 대비 Ad-MSCs에서 ANX1, H-3, HMGB 유전자 발현이 유의적으로 증가하였으며, 이를 통해, Ad-MSCs로부터 정자막 보존과 관련된 단백질의 분비가 증가할 것으로 사료되었다.

[0053] **실시예 2. 개 정자의 동결보존을 위한 최적의 Ad-MSCs 농도 확인**

[0054] 동결-융해된 개 정자의 운동성 및 생존성을 향상시기 위한 최적의 Ad-MSCs 농도를 확인하기 위해, 동결보존제의 단위부피(mℓ) 당 개 유래 Ad-MSCs를 2.5×10^6개 또는 5×10^6개로 각각 첨가하여 개 정자를 동결시키고 다시 융해한 후 정자의 motility(%), linearity(%), straightness(%), ALM(amplitude of lateral head displacement, ㎛), live sperm(%), membrane integrity(%), normal acrosome(%) 및 normal chromatin(%)를 측정하였다. 그 결과, 동결보존제에 Ad-MSCs가 첨가되지 않은 무처리 대조군에 비해 동결보존제의 mℓ 당 개 유래 Ad-MSCs를 2.5×10^6개 또는 5×10^6개로 첨가한 군에서 동결-융해된 정자의 운동성 및 생존성이 증가한 것을 확인하였으며, 특히 동결보존제의 mℓ 당 Ad-MSCs를 2.5×10^6개로 첨가하였을 때 정자의 운동성 및 생존성이 가장 우수함을 확인하였다(표 2).

표 2

개 유래 Ad-MSCs의 농도에 따른 정자의 운동성 및 생존성 분석

Groups	Motility (%)	Linearity (%)	Straightness (%)	ALM (μm)	Live sperm (%)	Membrane Integrity (%)	Normal acrosome (%)	Normal Chromatin (%)
Control	43.3 ± 1.2^a	23.9 ± 1.0^a	45.1 ± 0.9^a	3.9 ± 0.1^a	44.0 ± 0.9^a	45.4 ± 0.6^a	44.3 ± 0.4^a	65.4 ± 0.5^a
2.5×10^6 cells	55.7 ± 1.0^c	26.9 ± 0.9^b	49.6 ± 1.0^b	2.7 ± 0.1^b	52.9 ± 0.4^b	54.6 ± 0.5^c	53.1 ± 0.4^c	73.1 ± 0.4^c
5×10^6 cells	48.8 ± 1.4^b	23.3 ± 0.6^a	49.4 ± 1.1^b	3.0 ± 0.1^b	42.0 ± 1.2^a	49.1 ± 0.9^b	49.9 ± 0.8^b	68.9 ± 0.6^b

[0055] ^{a,b}Values with different transcripts differ significantly ($P<0.05$).

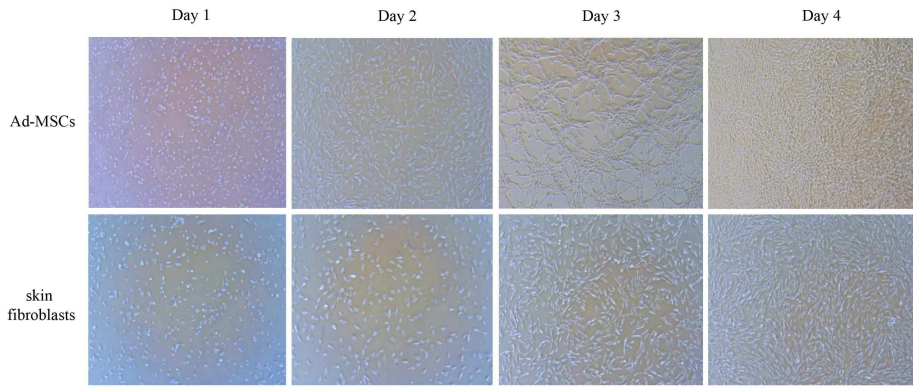
[0056] 또한, 개 정자의 동결-융해 후 *ANX1*, *H-3*, *FN 1*, *HMGB* 및 *DYSF* 유전자의 발현 수준을 RT-qPCR로 확인한 결과, 동결보존제의 mℓ 당 개 유래 Ad-MSCs를 2.5×10^6개로 첨가한 군이 Ad-MSCs 무처리 대조군과 5×10^6개의 Ad-MSCs를 첨가한 군에 비해 *ANX1*, *H-3*, *FN 1*, *HMGB* 및 *DYSF*의 발현 수준이 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 5). 이를 통해, 개 정자의 동결보존 시 동결보존액에 동결보존액 단위부피(mℓ) 당 개 유래 Ad-MSCs를 2.5×10^6개로 첨가하는 것이 정자막의 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라 정자의 생존성 및 운동성도 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0057] **실시예 3. 동결-융해된 정자의 세포막과 염색 회복에 관한 기전 분석**

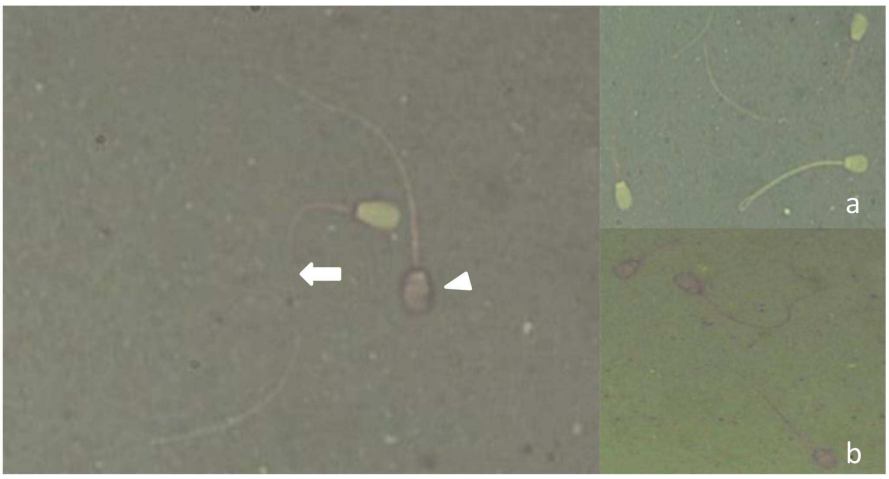
[0058] 최적 농도의 개 유래 Ad-MSCs가 첨가된 동결보호제를 사용하여 동결-융해된 정자의 세포막과 염색 회복에 관한 기전 분석을 분석하기 위해, 동결보존제에 Ad-MSCs가 첨가되지 않은 무처리 대조군과 동결보존제 ㎖ 당 2.5×10^6개의 Ad-MSCs를 처리한 군에서 ANX1, H-3, FN 1, HMGB 및 DYSF의 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과, Ad-MSCs 처리군은 대조군에 비해 ANX1, H-3 및 FN 1 단백질의 발현량이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 다만, HMGB과 DYSF 단백질은 Ad-MSCs 처리군과 대조군에서 모두 발현되지 않았다(도 6).

도면

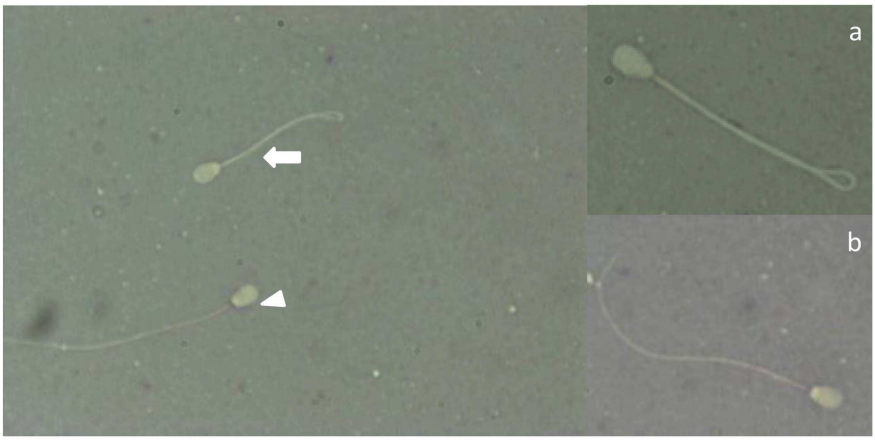
도면1



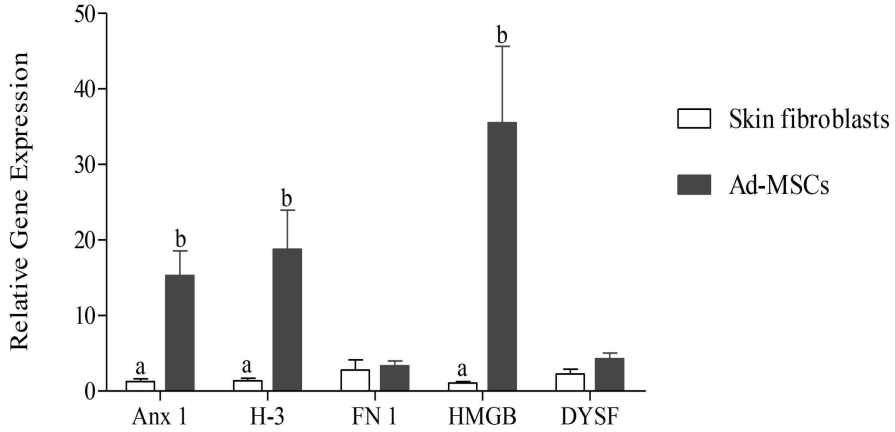
도면2



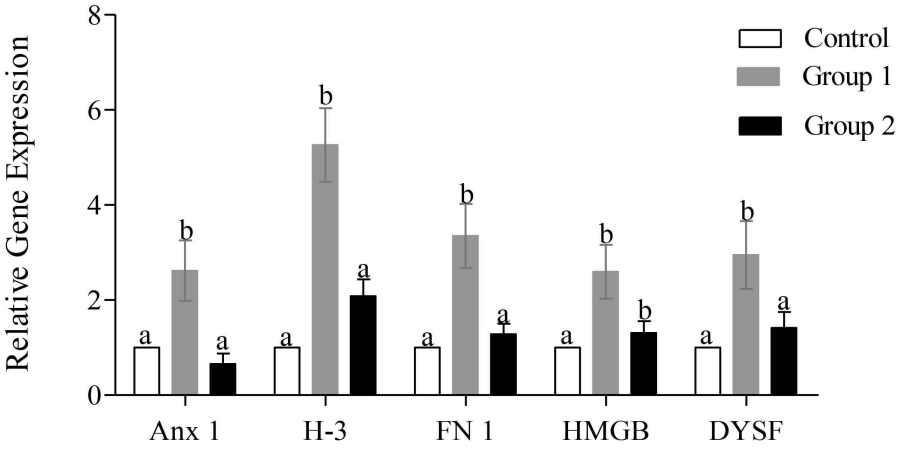
도면3


a
b

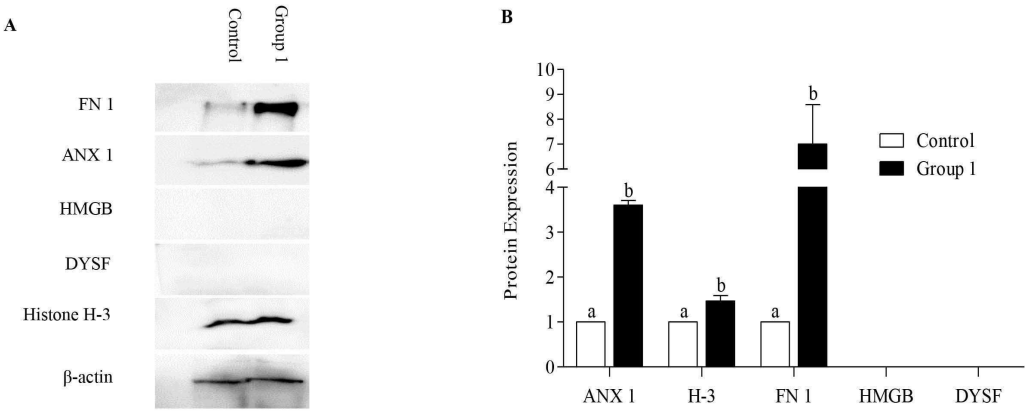
도면4


Relative Gene Expression
50
40
30
20
10
0
Anx 1
H-3
FN 1
HMGB
DYSF
Skin fibroblasts
Ad-MSCs

도면5


Relative Gene Expression
8
6
4
2
0
Anx 1
H-3
FN 1
HMGB
DYSF
Control
Group 1
Group 2

도면6



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Composition for cryopreservation of Canidae sperm comprising mesenchymal stem cell as effective component

<130> PN19349

<160> 10

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gaagctctga agaaagccc 19

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

gtgtcttcat cagttccaag g 21

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

cggtgactga cacgcgac 18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gttggagcag gccttgaacc 20

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

atagctggct gttacgac 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gcatttccca ggtaggtg 18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

atattgctgc gtaccgag 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

tcagccttga caactccc 18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

tggatcagag tggcgtcc 18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gacagcagct ttctggct 18