



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2008년11월24일  
 (11) 등록번호 10-0869933  
 (24) 등록일자 2008년11월17일

(51) Int. Cl.  
*C12N 5/08* (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)  
*C12N 5/02* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2007-0025280  
 (22) 출원일자 2007년03월15일  
 심사청구일자 2007년03월15일  
 (65) 공개번호 10-2008-0084101  
 (43) 공개일자 2008년09월19일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 논문-2007\*  
 US6555375 B1  
 KR100416519 B1  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 재단법인서울대학교산학협력재단  
 서울특별시 관악구 봉천7동 산4의 2번지  
 (72) 발명자  
 노상호  
 서울 관악구 봉천7동 산 4-2 서울대학교 교수아파트 122D동 102호  
 원철희  
 서울 중로구 연건동 서울대학교치과대학 치의학대학원 내  
 (74) 대리인  
 김순용

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 김경미

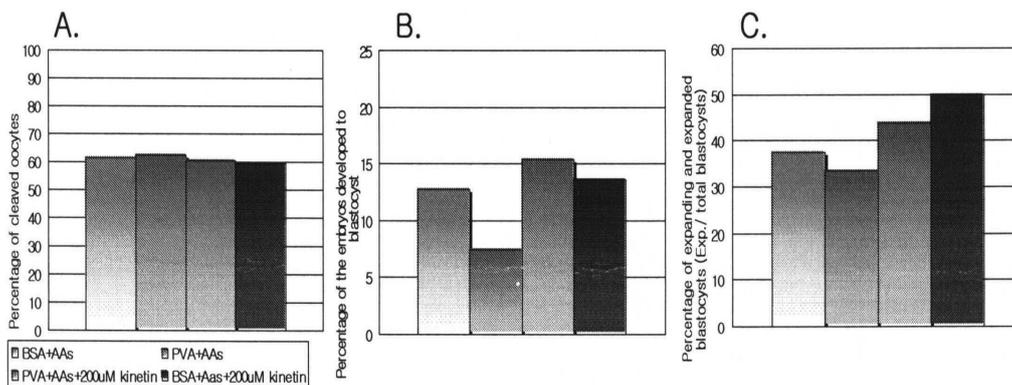
**(54) 키네틴을 이용한 포유동물의 임신초기 배아의 배양**

**(57) 요약**

본 발명은 키네틴을 이용한 포유동물의 임신초기 배아의 배양에 관한 것으로, 완전한정배양액 (NCSU-PVA) 내에서 포유동물의 단위발생란 및 핵이식란중 어느 하나를 발달시키는데 있어, 상기 완전한정배양액에는 키네틴이 특정 함량 포함되는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 의하면, 식물세포의 세포분열을 촉진시키는 시토키닌으로 알려진 식물 호르몬인 키네틴이 포유동물의 임신초기 배아의 배양시 첨가되면 확장 및 부화된 배반포 비율, 배반포의 성장속도 및 생존성을 증가시키는 등 배양에 효과적인 것을 확인할 수 있다.

**대표도 - 도2**



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

완전한정배양액 (NCSU-PVA)을 이용하여 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아를 배양시키는 방법에 있어서,

상기 완전한정배양액에 키네틴을 100 ~ 800  $\mu$ M/L 범위내로 첨가함으로써 단위발생란의 발달시 확장 및 부화된 배반포 비율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법.

**청구항 2**

완전한정배양액을 이용하여 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아를 배양시키는 방법에 있어서,

상기 완전한정배양액에 키네틴을 100 ~ 800  $\mu$ M/L 범위내로 첨가함으로써 핵이식란의 발달시 확장 및 부화된 배반포 비율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법.

**청구항 3**

완전한정배양액을 이용하여 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아를 배양시키는 방법에 있어서,

상기 완전한정배양액에 키네틴을 100 ~ 800  $\mu$ M/L 범위내로 첨가함으로써 단위발생란 발달시 배반포의 성장속도 및 생존성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법.

**청구항 4**

완전한정배양액을 이용하여 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아를 배양시키는 방법에 있어서,

상기 완전한정배양액에 키네틴을 100 ~ 800  $\mu$ M/L 범위내로 첨가함으로써 핵이식란 발달시 배반포의 성장속도 및 생존성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키네틴은 200  $\mu$ M/L 내외로 첨가하는 것을 특징으로 하는 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법.

**청구항 6**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 이외의 포유동물은 개, 고양이, 돼지, 소, 쥐로부터 선택된 것을 특징으로 하는 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발달 조건은 37-39 $^{\circ}$ C하에 5-7일간 유지시키는 것을 특징으로 하는 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 발달은 5% 이산화탄소 배양기내에서 유지시키는 것을 특징으로 하는 인간 이외의 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

<3> 본 발명은 키네틴을 이용한 포유동물의 임신초기 배아의 배양에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 완전한정배양액내에서 포유동물의 단위발생란 및 핵이식란 중 어느 하나를 발달시키는데 있어, 상기 완전한

정배양액에는 키네티틴이 포함되는 것을 특징으로 하는 포유동물의 임신초기 배아의 배양에 관한 것이다.

<4> 본 발명에서 사용하려는 키네티틴 (Kinetin)은 식물세포의 세포분열을 촉진시키는 시토키닌 (cytokinin)으로 알려진 식물 호르몬이다. 이같은 키네티틴이 DNA에 존재할 경우 repair 효소의 합성을 증가시키고 슈퍼옥사이드 디스무타제 (superoxide dismutase)를 촉진시키는 것으로도 알려져 있다.

<5> 또한, 노화 혹은 주름 방지제로도 사용되어 왔으며, 다수의 식물 배양에 사용되어온 예를 찾아볼 수 있었다.

<6> 그러나, 이같은 키네티틴을 포유동물의 임신초기 배아에 적용하여 배양시킨 예는 지금까지 찾아볼 수 없었다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

<7> 이에 본 발명의 목적은 키네티틴을 이용한 포유동물의 임신초기 배아의 배양을 제공하고자 하는 것이다. 더 구체적으로 본 발명은 완전한정배양액내에서 포유동물의 단위발생란 및 핵이식란중 어느 하나를 발달시키는데 있어, 상기 완전한정배양액에는 키네티틴이 포함되는 것을 특징으로 하는 포유동물의 임신초기 배아의 배양법을 제공하고자 한다.

**발명의 구성 및 작용**

<8> 본 발명의 제1견지에 의하면,

<9> 완전한정배양액을 이용하여 포유동물의 임신초기 배아를 배양시키는 방법에 있어서,

<10> 상기 완전한정배양액에 키네티틴을 100 ~ 800 μM/L 범위내로 첨가함으로써 단위발생란의 발달시 확장 및 부화된 배반포 비율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법이 제공된다.

<11> 본 발명의 제2견지에 의하면,

<12> 완전한정배양액을 이용하여 포유동물의 임신초기 배아를 배양시키는 방법에 있어서,

<13> 상기 완전한정배양액에 키네티틴을 100 ~ 800 μM/L 범위내로 첨가함으로써 핵이식란의 발달시 확장 및 부화된 배반포 비율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법이 제공된다.

<14> 본 발명의 제3견지에 의하면,

<15> 완전한정배양액을 이용하여 포유동물의 임신초기 배아를 배양시키는 방법에 있어서,

<16> 상기 완전한정배양액에 키네티틴을 100 ~ 800 μM/L 범위내로 첨가함으로써 단위발생란 발달시 배반포의 성장속도 및 생존성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법이 제공된다.

<17> 본 발명의 제4견지에 의하면,

<18> 완전한정배양액을 이용하여 포유동물의 임신초기 배아를 배양시키는 방법에 있어서,

<19> 상기 완전한정배양액에 키네티틴을 100 ~ 800 μM/L 범위내로 첨가함으로써 핵이식란 발달시 배반포의 성장속도 및 생존성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 포유동물의 임신초기 배아의 배양방법이 제공된다.

<20> 이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.

<21> 우선, 본 발명에서는 포유동물의 임신초기 배아의 배양에 있어 키네티틴이 첨가된 완전한정배양액(NCSU-PVA) 내에서 단위발생란 및 핵이식란중 어느 하나를 발달시킨다.

<22> 상기 완전한정배양액이란 미량원소 등의 확인이 완벽하게 어려운 혈청이나 혈청단백질 등이 첨가되지 않은, 배양액의 성분조성을 완전히 파악하고 있는 배양액을 의미한다. 영문 용어중 NCSU는 North Carolina State University-23 medium의 약어로서 돼지 수정란 배양에 특이적으로 사용되는 배양액을 의미하고, 용어중 PVA (폴리비닐 알코올)은 혈청단백질인 BSA 대신 배양액에 첨가하는 고분자로서 수정란이 플라스틱 접시에 달라붙거나 수정란끼리 서로 달라붙는 것을 방지하는 역할을 주로 하는 첨가물이다.

<23>

<24> 구체적으로, NCSU의 조성은 이에 한정하는 것은 아니나, 통상적으로 입수가 가능한 조성으로서 NaCl 108.73 mM, KCl 4.78 mM, CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 1.70, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.19 mM, MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 1.19 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.07 mM, 글루코오스

5.55 mM, L-글루타민 1.0 mM, 타우린 7.0 mM, Hypotaurine 5.0 mM 이면 충분하다. 여기에 0.1% (v/v) 필수 및 비필수아미노산과 0.1% (w/v) PVA를 첨가하면 충분하다.

- <25> 이때 포유동물로는 개, 고양이, 돼지, 소, 쥐 등을 포함한다.
- <26> 또한, 사용가능한 키네틴의 함량은 100~800 μM 범위내인 것이 바람직한데, 100 μM 미만에서는 배양에 영향을 미치는 키네틴의 함량이 충분하지 않고, 800 μM 를 초과하면 첨가되는 키네틴의 함량 대비 배아된 배아의 확장 및 부화된 배반포 비율 증가가 충분치 않기 때문이다. 보다 바람직한 키네틴의 함량은 200 μM 내외인 것이 좋다.
- <27> 특히 본 발명에서 사용하는 키네틴은 식물 호르몬인 관계로 배아의 배양에 적용하더라도 부작용 및 독성의 우려가 없다는 잇점을 갖는다.
- <28> 한편, 상기 발달 조건은 37-39℃ 하에 5-7일간 배양시키면 충분하다. 특히, 5% 탄산가스 배양기 내에서 배양시키는 것이 바람직하다.
- <29> 그 결과, 완전한정 배양액 내에서 배양된 배아의 확장 및 부화된 배반포 비율을 증가시킬 수 있었다. 나아가 포유동물의 임신초기 배아에 있어 배반포의 성장속도 및 생존성을 증가시키게 되는 것이다.
- <30> 이뿐 아니라, 본 발명에서는 포유동물의 임신초기 배아의 배양에 있어 키네틴이 첨가된 혈청원 첨가 체외배양체계 (NCSU-BSA)내에서도 단위발생란 및 핵이식란중 어느 하나를 발달시킬 수 있다.
- <31> 상기 혈청원 첨가 체외배양체계는 상술한 NCSU 조성에 통상적으로 수정란배양액에 대하여 사용되는 지방산이 제거된 소혈청단백질 지방산이 제거된 소 혈청 알부민 (BSA)을 4 mg/ml 정도 첨가하여 사용하면 충분하다.
- <32> 이때 포유동물로는 개, 고양이, 돼지, 소, 쥐 등을 포함한다.
- <33> 또한, 사용가능한 키네틴의 함량은 100-400 μM 범위내인 것이 바람직한데, 100 μM 미만에서는 배양에 영향을 미치는 키네틴의 함량이 충분하지 않고, 400 μM 를 초과하면 첨가되는 키네틴의 함량 대비 배아된 배아의 확장 및 부화된 배반포 비율 증가가 충분치 않기 때문이다. 보다 바람직한 키네틴의 함량은 100-200 μM 정도인 것이 좋다.
- <34> 한편, 상기 발달 조건은 37-39℃ 하에 5-7일간 배양시키면 충분하다. 특히, 5% 탄산가스 배양기 내에서 배양시키는 것이 바람직하다.
- <35> 그 결과, 혈청원 첨가 체외배양체계 내에서도 배양된 배아의 확장 및 부화된 배반포 비율을 증가시킬 수 있었다. 나아가 포유동물의 임신초기 배아에 있어 배반포의 성장속도 및 생존성을 증가시키게 되는 것이다.
- <36> 나아가, 본 발명에 있어 상기 기재한 유효성분으로서 키네틴 이외에 추가로 배양에서 허용 가능한 보조성분을 1종 이상 포함함으로써, 포유동물의 배아 배양용 조성물로서도 제공될 수 있다.
- <37> 본 발명의 조성물 제조시 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수 등을 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- <38> 이하 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- <39> **실시예 1: 완전한정 배양체계하 키네틴의 적정 첨가농도 결정**
- <40> 본 실시예는 완전한정 배양체계 하에서의 키네틴 첨가 농도를 적정화하기 위한 것이다.
- <41> 도축장에서 회수한 돼지의 난소로부터 미성숙난자를 채취하고 이를 체외에서 성숙배양하여 얻은 체외성숙난자를 전기융합기를 이용, 1.6 kV/cm DC의 자극으로 활성화시켜 획득한 단위발생란을 키네틴이 각각 100, 200, 및 800 μM/L씩 첨가된 완전한정 배양액 하에 발달시켰다.
- <42> 이때 완전한정 배양액으로는 NaCl 108.73 mM, KCl 4.78 mM, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 1.70, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.19 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.19 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.07 mM, 글루코오스 5.55 mM, L-글루타민 1.0 mM, 타우린 7.0 mM, Hypotaurine 5.0 mM, 0.1% (v/v) 필수 및 비필수아미노산, 과 0.1% (w/v) PVA로 된 조성을 사용하였으며, 발달 조건은 38.5℃, 5% 탄산가스 배양기 내에서 7일간 배양시켰다.
- <43> 한편, 대조군으로는, 필수 및 비필수아미노산 (AAs)이 첨가된 완전한정배양액을 사용하였으며, 구체적

인 조성은 0.1% (v/v) 필수 및 비필수아미노산을 포함하였다.

<44>

<45> 그런 다음 7일째 세포 분화율, 배반포 발달율, 그리고 총 배반포 중 확장 및 부화된 배반포율을 조사하고 그 결과를 하기표 1에 정리하였다.

**표 1**

<46> 완전한정 배양액에 키네틴 첨가시 돼지 단위발생란에 미치는 키네틴의 농도별 영향

분류	총합	난할(%)	배반포 발육 수 (%)	확장 및 부화된 배반포수(%)	확장 및 부화된 배반포 발육 수(%)
대조군 1 (PVA+AAs)	268	195 (72.76)	102(38.06)	40(14.93)	40/102(39.22)
실험군 1 (PVA+AAs+100 μ M 키네틴)	498	398(79.92)	199(39.96)	85(17.07)	<b>85/199(42.71)</b>
실험군 2 (PVA+AAs+200 μ M 키네틴)	195	153(78.46)	79(40.51)	39(20.00)	<b>39/79(49.37)</b>
실험군 3 (PVA+AAs+800 μ M 키네틴)	146	116(78.38)	60(40.54)	26(17.57)	<b>26/60(43.33)</b>

<47> 상기 표 1에서 보듯이, 완전한정배양체계 하에서 키네틴 첨가시, 돼지 단위발생란에서 배반포 발육률은 별다른 차이를 보이지 않았지만, 배반포중 확장 및 부화된 배반포의 비율은 실험군 2(200 μ M의 키네틴 첨가)의 경우 49.37%로서 대조군 1(PVA+AAs)의 39.22%에 비하여 높게 나타났다.

<48> 이는 키네틴이 돼지의 초기 배아의 발달 속도를 증가시키며, 초기 배아 발달에 있어 키네틴이 세포 독성 혹은 유해한 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주는 결과인 것으로 추론된다.

<49> **실시예 2: 혈청원 첨가 체외배양체계하 키네틴의 돼지 단위 발생란의 발달에 미치는 영향**

<50> 본 실시예는 혈청원 첨가 체외배양체계 하에서 키네틴이 돼지 단위발생란의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위한 것이다.

<51> 상기 실시예 1에서 완전한정배양체계에서 가장 효과적인 첨가량인 것으로 확인된 키네틴 200 μ M를 혈청원 첨가 배양액 중 PVA 대신 BSA를 4 mg/ml 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 1에서와 동일한 실험을 반복하였다.

<52> 역시 7일째 세포 분화율, 배반포 발달율, 그리고 총 배반포 중 확장 및 부화된 배반포율을 조사하고 그 결과를 하기 표 2에 정리하였다.

**표 2**

<53> 혈청원 첨가 배양액내에서 키네틴이 돼지 단위발생란의 발육에 미치는 영향

분류	총합	난할(%)	배반포 발육 수 (%)	확장 및 부화된 배반포수(%)	확장 및 부화된 배반포 발육 수(%)
대조군 2 (BSA+AAs)	238	201 (84.45)	140 (58.82)	78 (32.77)	78/140 (55.71)
실험군 5 (BSA+AAs+200 μ M 키네틴)	98	78 (79.59)	40 (40.82)	28 (28.57)	<b>28/40(70.00)</b>

<54> 상기 표 2에서 보듯이, 대조군 2(BSA+AAs)에 비해 실험군(200 μ M의 키네틴 첨가시)의 경우 배반포의 발달율은 58.82%에서 40.82%로 감소하였지만, 배반포중 확장 및 부화된 배반포의 비율은 55.71%에서 70.00%로 증

가하였다.

<55> 이로부터, 키네틴이 배반포의 발육속도 또는 생존성에는 부분적으로 긍정적인 효과가 있으나 BSA와 함께 첨가되었을 때 배반포 형성자체에는 부정적인 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

<56> **실시예 3: 키네틴이 돼지 초기배아 발달중 배반포 발달에 미치는 영향**

<57> 본 실시예는 키네틴이 돼지 초기배아 발달단계중 배반포의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위한 것이다.

<58> 상기 실시예 1 및 2의 결과들을 토대로 하여 키네틴 첨가시 돼지 초기 배아 발달단계의 compaction 이후 단계부터 5일, 6일 및 7일째에 배반포의 발달단계를 조사 및 분석하고 그 결과를 도 1에 그래프로 정리하였다.

<59> 도 1에 있어서, BK 200은 BSA+AAs+200 μM 키네틴을 의미하며, PK200은 PVA+AAs+200 μM 키네틴을 의미한다.

<60> 결과적으로, 완전한정 배양체계 (PVA 첨가시)와 혈청원 첨가 배양체계 (BSA 첨가시)에 각각 200 μM의 키네틴을 첨가할 경우, 배반포 성장속도 측면에서 볼 때 확장 또는 부화 배반포 비율이 상대적으로 높은 것을 확인할 수 있었다.

<61> 또한, BSA 첨가 배양체계에서는 상술한 표 2에서도 확인할 수 있듯이, 키네틴 첨가시 배반포 형성비율은 저하된 반면 총 배반포 가운데 부화된 배반포의 비율은 200 μM의 키네틴 첨가시 0.95%에서 10.00%로 증가하여 키네틴이 배반포의 품질 향상시키는 인자임을 확인할 수 있었다.

<62> **실시예 4: 키네틴이 돼지 핵이식란에 미치는 영향**

<63> 본 실시예는 키네틴이 돼지 핵이식란에 미치는 영향을 조사하기 위한 것이다.

<64> 상술한 실시예 1 내지 3의 단위발생란에서 얻은 결과들을 토대로 하여 돼지 핵이식란에서 완전한정 배양액 및 체외배양액에 키네틴을 첨가시, 세포 분열 및 배반포의 발달율과 배반포중 확장 및 부화배반포 비율 및 부화 배반포의 비율을 조사하고 그 결과를 도 2에 그래프로 정리하였다.

<65> 참고로, 상기 도면 중 B의 배반포 생성율은 생존성과 연관있으며, C의 확장 및 부화 배반포 비율은 성장속도와 연관된다.

<66> 도 2에서 보듯이, 핵이식란에 있어서 완전한정배양체계에 200 μM의 키네틴을 첨가할 경우, 배반포 발육율이 7.50%에서 15.38%로 증가하였으며, 이는 BSA 첨가 배양체계하에 배양한 핵이식란의 배반포 발달율 12.80%와 비교될만한 것이었다.

<67> 또한, BSA 첨가 배양체계와 PVA 첨가 배양체계에 키네틴을 첨가하였을 때 생산된 배반포의 확장 및 부화 배반포로의 발달율은 각각 37.50% 및 33.33%에서 50.00% 및 43.75%로 증가하여 핵이식란의 발육에 있어 키네틴을 BSA의 존재 유무에 관계없이 배반포의 발육 및 생존성에 있어 효과가 있는 것으로 판명되었다.

**발명의 효과**

<68> 본 발명은 특정한 실시예에 관련하여 도시하고 설명하였지만, 이하의 특허청구범위에 의해 마련되는 본 발명의 정신이나 분야를 벗어나지 않는 한도 내에서 본 발명이 다양하게 개조 및 변화될 수 있다는 것을 당업계에서 통상의 지식을 가진 자는 용이하게 알 수 있음을 밝혀두고자 한다.

<69> 본 발명에 의하면, 식물세포의 세포분열을 촉진시키는 시토키닌으로 알려진 식물 호르몬인 키네틴이 포유동물의 임신초기 배아에 있어 확장 및 부화된 배반포 비율, 배반포의 성장속도 및 생존성을 증가시키는 등 배양에 효과적인 것을 확인할 수 있다.

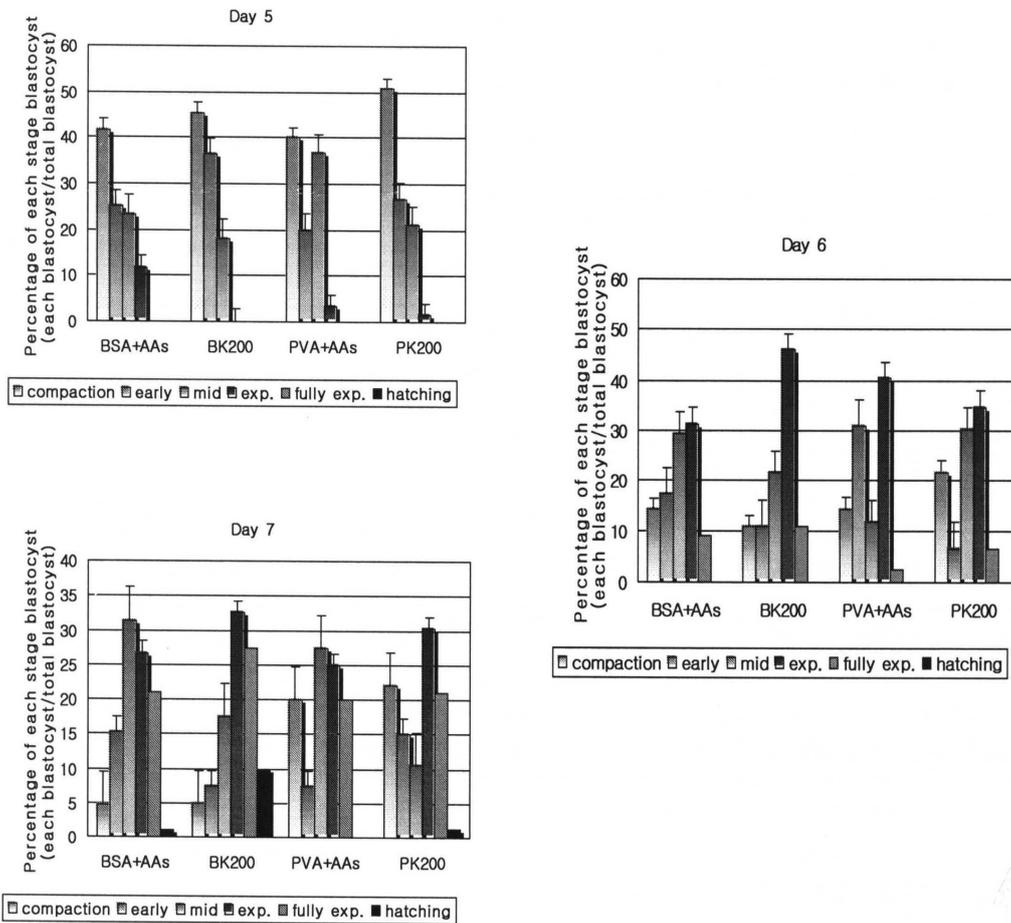
**도면의 간단한 설명**

<1> 도 1은 키네틴의 농도에 따른 돼지 단위발생란의 발달단계 분포를 5일, 6일, 7일째 측정된 그래프이고,

<2> 도 2는 돼지 핵이식란에서 완전한정 배양액 (NCSU-PVA) 및 체외배양액(NCSU-BSA)에 키네틴을 첨가시 세포분열 및 배반포의 발달율과 배반포 중 확장 및 부화 배반포 그리고 부화 배반포의 비율을 측정된 그래프이다.

도면

도면1



도면2

