

연구보고서(연차)

NIE-B-2025-45

냉동보존 세포를 활용한 멸종위기종 복원연구('25)

Research on restoration of endangered species using
cryopreserved cells('25)

NATIONAL
INSTITUTE OF ECOLOGY

연구진

연구책임자	문정찬	복원평가연구팀	책임연구원
연구참여자(내부)	박다솜	복원평가연구팀	전임연구원
	서동진	복원평가연구팀	차장
	임정은	복원평가연구팀	선임연구원
	박경민	복원평가연구팀	계장

본 연구진은 연구윤리를 준수하였음을 서약합니다.

<목 차>

요 약 문(Abstract)	i
I. 서 론	1
II. 연구 내용 및 결과	4
1. 산양 개체 식별 유전자 마커 개발	4
2. 유전자 연구를 통한 서식지의 표범 Melanism 분석	13
3. 멸종위기종 생식세포 확보 및 동결보존 안정성 기술 개발	16
III. 고찰 및 제언	25
IV. 활용 방안 및 기대 효과	27
V. 당해연도 추진 일정	28
참 고 문 헌	29

〈표 목차〉

〈표 1〉 산양 개체식별을 위한 초위성체 마커 프라이머 정보	4
〈표 2〉 산양 개체식별을 위한 초위성체 마커 다중증폭 세트 구성	5
〈표 3〉 산양 개체식별을 위한 초위성체 마커 다중증폭 세트 구성(최종)	8
〈표 4〉 강원권 산양 다중증폭 마커를 활용한 개체식별 분석 결과	11
〈표 5〉 강원권 산양 유전다양성 분석 결과	12
〈표 6〉 고리도릉농 및 맹꽂이 동결보존액 제조 농도	17

〈그림 목차〉

〈그림 1〉 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 1번)	6
〈그림 2〉 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 2번)	7
〈그림 3〉 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 3번)	7
〈그림 4〉 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 1번)	8
〈그림 5〉 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 2번)	9
〈그림 6〉 강원권 산양 폐사체 사진	10
〈그림 7〉 표범 ASIP 유전자 염기서열 분석 결과	15
〈그림 8〉 양서류 호르몬 주입 및 소변 유래 정자 수집	17
〈그림 9〉 양서류 소변과 동결보존제 혼합 및 straw에 밀봉	18
〈그림 10〉 양서류 정자 pre-freezing 및 액체질소 보존	18
〈그림 11〉 양서류 동결 정자 해동 및 정자 현탁액 희석	18
〈그림 12〉 고리도롱뇽, 맹꽁이 해동 정자 생존율 확인	19
〈그림 13〉 동결보존제에 따른 고리도롱뇽, 맹꽁이의 해동 정자 생존율 그래프 ..	19
〈그림 14〉 사자 난소 조직	20
〈그림 15〉 사자 난포액 유래 난자 체외성숙 및 Live/Dead 염색 결과 ...	21
〈그림 16〉 사자 난소 조직 유래 체세포 배양	21
〈그림 17〉 라쿤 정소 및 세정관 분리	22
〈그림 18〉 라쿤 세정관 세포 배양	22
〈그림 19〉 여우 정소 조직 및 세정관 분리	23
〈그림 20〉 여우 정소 조직 유래 체세포 분리 및 배양	23
〈그림 21〉 꽃사슴 정소·세정관 확보 및 배양	24
〈그림 22〉 다마사슴 정소·세정관 확보 및 배양	24

Abstract

This study set three main objectives for the restoration and conservation of endangered species.

First, a multiplex genetic marker for both sex determination and individual identification of the Long-tailed goral (*Naemorhedus caudatus*) was developed. The marker consists of one sex-determining marker and eight microsatellite markers. Using these markers, 46 Long-tailed goral carcasses from the Gangwon Province were analyzed, and the results showed that 19 individuals were female and 27 were male. The genetic diversity index (H_e) was found to be 0.653, which is consistent with previously reported genetic diversity in the species.

Second, to assess the hybrid status of two Amur leopards (*Panthera pardus orientalis*) at Seoul Grand Park with melanistic leopards, the ASIP gene variation was analyzed. Both individuals were identified as heterozygous, providing valuable insights into the genetic diversity and melanism in the leopard species.

Third, to support the collection of biological samples and the development of cryopreservation techniques for endangered species, various samples were collected, including endangered plants, goral tissues, sika deer carcasses, amphibian frozen sperm, and wildlife reproductive cells. A total of 270 individuals from 8 species and 1,298 samples were obtained. Among these, 259 individuals and 1,278 samples were from 5 species, including the goral, and 20 samples from 4 species, including the Japanese brown frog, were obtained as living cells.

This study contributes significantly to the development of genetic markers for individual identification and genetic diversity analysis, as well as advancements in cryopreservation techniques for reproductive cells, providing essential foundational data for future restoration and conservation efforts for endangered species.

Key words: Microsatellite marker, genetic diversity, Cryopreservation of Reproductive cells

초록

본 과제에서는 멸종위기종 복원과 보존을 위해 크게 세 가지를 주요 목표를 설정하고 수행하였다.

첫째, 산양(*Naemorhedus caudatus*) 성별 및 개체식별을 동시에 분석할 수 있는 다중중폭 유전자 마커를 개발하였다. 이 마커는 1개의 성판별 마커와 8개의 초위성체 마커를 포함하고 있다. 이를 통해 강원권 산양 폐사체 46개체를 분석한 결과, 19개체는 암컷, 27개체는 수컷으로 판별되었다. 유전적 다양성 지수(H_e)는 0.653으로 기존에 알려진 산양 유전다양성과 유사한 수치가 도출되었다.

둘째, 서울대공원에서 보유 중인 표범 두 개체의 흑표범과의 잡종 여부를 확인하기 위해 ASIP 유전자의 변이를 분석하였다. 그 결과, 두 개체 모두 보인자 개체로 확인되었다.

셋째, 멸종위기종의 생체시료 확보 및 동결보존 기술 개발을 위해, 멸종위기 식물, 산양, 소똥구리 사체 이관, 양서류 동결정자 및 야생동물 생식세포를 확보하여 총 8종 270개체 1,298개의 샘플을 확보하였다. 이 중 산양 등 5종 259개체 1,278샘플과 살아있는 세포인 고리도롱뇽 등 4종 11개체 20샘플을 확보하였다.

이 연구는 멸종위기종의 개체 식별과 유전적 다양성 분석을 위한 유전자 마커 개발과 생식세포 동결보존 기술의 발전에 기여하며, 향후 멸종위기종의 복원과 보전 연구에 중요한 기초 자료를 제공할 것이다.

키워드: 초위성체 마커, 유전다양성, 생식세포 동결보존

I. 서론

지구 온난화, 서식지 파괴 등 인간 활동으로 인해 멸종 위기에 처한 생물종이 급증하고 있습니다. 인류는 현재 6번째 대멸종에 직면해 있다고 말하고 있습니다. 이전에 일어났던 1~5번째 대멸종이 운석 충돌과 화산 폭발과 같은 자연재해에 의해 일어났다면 6번째 대멸종은 인간의 활동으로 발생하고 있습니다. 지난 50년 동안 야생동물 개체군의 크기가 69% 이상 줄었다는 보고가 있고, 2100년까지 전 세계 동물의 4분의 1이 멸종될 것이라는 예측도 있습니다. 이러한 심각한 상황 속에서 야생동식물의 멸종을 막기 위한 다양한 노력과 시도가 이루어지고 있습니다. 특히 멸종위기종의 생식세포 등을 초저온의 액체질소에 보존하여 미래에 복원하고자 하는 노력이 활발히 진행되고 있습니다. 바로 냉동방주(Frozen zoo) 프로젝트입니다.

냉동방주는 마치 노아의 방주처럼, 멸종위기의 동물 세포를 극저온 상태에서 보관하는 시설입니다. 혹시 모를 미래의 생태계 붕괴에 대비하여 지구의 생명 다양성을 보존하려는 인류의 노력이 담긴 거대한 프로젝트라고 할 수 있습니다.

멸종위기종복원센터에서는 2023년 국내 최초로 멸종위기종을 대상으로 하는 생체시료은행을 개소하였습니다. 멸종위기종 생체시료은행은 유전자 연구를 위한 유전자 시료와 미래 복원연구를 위한 생식세포 등을 지속 확보해 나갈 계획입니다.

생물자원 특히, 야생 동·식물은 자연환경 건강성의 중요한 지표이며 경제적 자원입니다. 이런 동·식물은 생태계의 기본 구성요소로서 우리의 삶을 풍요롭게 해주고 자연 생태계의 특성을 나타내주는 고유의 가치를 지니고 있습니다. 다양한 먹이사슬과 구조로 형성된 생태계는 각자 기능적으로 연결되어 있으며 그 구성원 각각이 경제적 가치를 지니고 있습니다. 이러한 생물자원의 중요성은 여러 나라가 참여하는 생물다양성협약(Convention on biological diversity, CBD, 1992)이 채택되면서 생물유전자원을 포함한 자국 생물자원의 가치에 대한 인식이 높아졌습니다. 2010년 생물다양성 협약 당사국총회에서 “유전자원의 접근 및 이익 공유(Access to genetic resources and Benefit-Sharing, ABS)” 를 위한 나고야 의정서를 채택하고 2014년 10월 나고야의정서를 발효, 2017년 “유전자원 접근 및 이익 공유에 관한 법률” 제정, 2018년 이 법률을 전면 시행 하여 각 국가의 생물자원주권을 인정하고 실현하는 실질적 수단의 하나로서 자국의 생물자원에 대한 관리 및 규제를 제고 할 수 있는

법률을 제정 및 시행되고 있습니다.

우리나라는 1994년에 154번째 회원국으로 가입하며 멸종위기종을 포함한 야생동·식물의 보전·보호에 관심을 가지게 되고, 정부(환경부)의 주도하에 야생생물의 멸종 예방 및 생물 다양성 증진을 목적으로 2004년 야생동식물 보호법을 제정하였으며, 현재 우리나라 멸종위기 야생동식물은 I 급 68종, II 급 214종, 총 282종입니다. 환경부는 “멸종위기 야생생물 보전종합계획”을 2018년 추진하면서 멸종위기종 중 반달가슴곰, 산양, 여우, 수달 등이 포함된 64종을 복원대상종으로 선정하고 그 중 우선복원대상종(25종)을 향후 10년간 조사·연구·복원사업을 추진한다고 발표하였습니다.

분자 유전학적 분석을 기반으로 하는 집단 유전학 연구는 최근 분석 기법의 급속한 발전과 더불어 멸종위기종의 복원과 같은 분야에서도 많은 관심이 집중 되고 있는 연구 분야입니다. 이런 집단유전학에서 나온 결과들은 야생동물의 건강성을 체크하거나 멸종의 원인을 밝히고 멸종으로의 진행을 막기 위한 방안을 마련하여 생물 다양성을 제공하는 근거로 사용되는 보전유전학으로 발전 되어 왔습니다.

미토콘드리아 DNA는 재조합 과정이 없이 모계유전을 하기 때문에 한 개체에 한 종류의 미토콘드리아만 존재하며(Hauswith and Laipias, 1985), 핵 DNA에 비해 5~10배 높은 돌연변이율을 보이고, 핵 DNA에 비해 구조가 간단하기 때문에 분자계통학적 분석, 집단유전학에 기반을 둔 유전다양성 및 유전적 구조를 밝히는데 매우 유용하게 이용되고 있습니다(Irwin et al., 1991; Howard and Berlocher, 1998; Kocher and Stepien, 1997; DeWoody and Avise, 2000).

Microsatellite DNA는 특정 염기 서열이 반복되는 짧은 DNA 단편으로 핵 염색체 전역에 골고루 존재하며, 재현성이 높고, 극소량의 시료로도 분석이 용이하다는 장점이 있습니다(Liu and Cordes, 2004; Liu, 2011). 개체간 다형성이 아주 높아 개체를 식별할 수 있는 분석능력이 좋으며, Hardy-Weinberg 평형가설에 기초하기 때문에 집단의 유전다양성, 유전적 구조, 근교약세, 병목현상, 집단의 이동 등을 규명하는 연구에 널리 활용되고 있습니다(Tautz, 1989; Jarne and Lagoda, 1996). 또한 microsatellite maker는 멘델유전 법칙을 기반으로 하기 때문에 친자감별 연구에도 활용되고 있습니다(McConnell et al., 1995; Nelson et al., 1998; Smith et al., 1998; Beacham et al., 2000; Sunnucks, 2000).

본 과제는 환경부의 “멸종위기 야생생물 보전종합계획”에 따라 멸종위기종복원센터에서 수행하는 연구 과제로서 멸종위기종을 대상으로 유전자 연구를 위한 생체시료를 확보하고 나아가 멸종위기종의 절멸과 미래 복원기술의 발전에 대비하기 위해 생식세포와 세포주를 액체질소에 안정적으로 저장하는 것을 목적으로 두고 있다. 뿐만 아니라 미토콘드리아 DNA의 특성과 microsatellite DNA의 특성을 이용해 원종확인, 잡종판별, 유전다양성 분석 등을 위한 유전자 마커를 개발하고 이를 직접 활용함으로써 멸종위기종의 증식·복원·보전에 기여하고자 합니다.

II. 연구 내용 및 결과

1. 산양 개체식별 유전자 마커 개발

가. 연구 내용 및 결과

1) 산양 표준 유전자(DNA) 확보

가) '멸종위기종 생체시료은행'에서 보유하고 있던 산양 근육 조직으로부터 genomic DNA 추출 Kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen Co., USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

2) 산양 다중증폭 초위성체 마커 구성 및 유전자 증폭 효율 검증

가) 산양 성·개체식별을 위해 성감별 마커 1개 및 초위성체(Microsatellite) 마커 23개의 프라이머 정보를 수집하였다(표 1). 각 마커 크기를 고려하여 4개의 다중증폭 세트를 구성하고, 각각의 마커 Forward Primer는 6-FAM, NED, VIC 중 하나로 형광 표지하였다(표 2).

표 1. 산양 개체식별을 위한 초위성체 마커 프라이머 정보

No.	Locus	Primer sequence (5' → 3')	Repeat motif	Size range(bp)	Reference
1	SY3A	F: 5' -ATTTCTCTGCTCCCTTGACTG-3' R: 5' -ATCTTCTGACTTTTCCTTACCCC-3'	(GT) ²¹	270-288	
2	SY3B	F: 5' -GAAATACATCATAAATCAGGAACCTT-3' R: 5' -GCCCTAAACAAAACGCTGC-3'	(GT) ²³	113-125	
3	SY12A	F: 5' -TTTCTGCTTCGCTGGACC-3' R: 5' -AACCCACTTCAGTATTCTTGCTTA-3'	(GT) ²²	187-209	
4	SY12B	F: 5' -TGACCCTTTGCTGTATCCTG-3' R: 5' -GGTGAGCCCAGAGAATCTTC-3'	(GT) ³ GC(GT) ³ GC(GT) ³ GC(GT) ¹⁷	127-131	
5	SY14 (DQ355011)	F: 5' -GGA ACC CTA CCA ATG CTC TG-3' R: 5' -CAA AGT GAA TCG CCC GTC-3'	(CA) ¹⁹	98-126	
6	SY17	F: 5' -GATCTCATAATAATCCCCAAACATA-3' R: 5' -AGAGAAGAATCTTGCTCATATGCT-3'	(CA) ²²	150-158	
7	SY22 (GQ120509)	F: 5' -GAGGAGAGGGTGTATTTTTCG-3' R: 5' -GAGAATGCTGGAGTGGGTTG-3'	(GT) ¹⁷	230-242	
8	SY48	F: 5' -TGGGGTCAGAAAGAGTCCG-3' R: 5' -CAACGCACAGAAAGAAAGGC-3'	(CA) ¹⁶	143-145	An et al, 2010
9	SY50	F: 5' -TTCATCATTATCGTTCCAGG-3' R: 5' -TTCCCAATCTTTCTCTCTGTC-3'	(GT) ²⁰	182-192	
10	SY58	F: 5' -CTATTGAACCTGTATCTCCCC-3' R: 5' -GCATTCTGGCTCTGGCAA-3'	(GT) ¹³	197-205	
11	SY71 (DQ355013)	F: 5' - TGGAGTTTAGGGCAGGA-3' R: 5' -CACAGTGAGTATTGTTTTGCTTATTA-3'	(GT) ² (GT) ²³	93-113	
12	SY76 (DQ355014)	F: 5' -AGGGTTTGCTTTTCAGGAC-3' R: 5' -CATCCATTACAGGAAGACTGC-3'	(GT) ¹⁴	105-171	
13	SY84	F: 5' -GAACTGAACTTGTTAGTATGTTGGG-3' R: 5' -TTGTTATGCTTGATGTTATTTGTTAC-3'	(CA) ¹⁹	156-190	
14	SY84B	F: 5' -GGTCTGTGACATTAGTTCCCTTCC-3' R: 5' -GGCATTATTTGGGGGAGAG-3'	(CA) ¹⁰ CG(CA) ⁹	182-194	
15	SY93	F: 5' -AATGAACAAAGAGGGTGTAC-3' R: 5' -CATCCTTTTCGTTGTC-3'	(GT) ²¹ GATATTT(TC) ⁹	102-132	
16	SY112 (DQ355015)	F: 5' -TCAATAATCAGGGCAGGTC-3' R: 5' -GTCCTGTGTAGTCTGTGTGGG-3'	(CA) ⁶ CNCT(CA) ¹⁰ C(CA) ⁵	192-202	

17	SY128 (GQ120510)	F:5´ - TGA CCC TTT GCT GTA TCC TG-3´ R:5´ - GGTGAGCCCAGAGAATCTTC-3	(GT) ³ GC(GT) ³ GC(GT) ³ GC(GT) ¹⁷	140-142
18	SY129 (DQ355016)	F:5´ -GAA AAA GAA GCA CAC ACA CG-3´ R:5´ -AAG GTT TGT CCC CAC ATT C-3´	(CA) ¹³	134-142
19	SY141 (DQ355017)	F:5´ -CAT AGC CTT GAC TAA ACG GAC C-3´ R:5´ -CAC CTG CCA CAT TCG GG-3´	(CA) ¹⁹	252-268
20	SY242	F: 5´ -GTGAGAAATAATACCTCCCTGAAG-3´ R: 5´ -AACATCCAGACCAAAACTTGC-3´	(GT) ¹³ G(GT) ⁸	191-195
21	SY259	F: 5´ -GCACCACAACAAAGAGGAGC-3´ R: 5´ -TGAAGACATAAGGGCGAACAG-3´	(CA) ²⁰	210-218
22	SY434	F: 5´ -AAGTGTCTGGGTCTCTTTCTCTA-3´ R: 5´ -ATGTACAGTATGGGATGATGAATG-3´	(GT) ¹⁹	79-97
23	SY449	F: 5´ -ATCTCCTGCCAAGTCCCC-3´ R: 5´ -TAGTAACGGCCGCCAGTG-3´	(GT) ⁵ AT(GT) ¹⁴	197-199
24	DDX3 X/Y (NC_037357.1)	F: 5´ -AGGAAGCCAGGAAAGTAA-3 R: 5´ -CATCCACGTTCTAAGTCTC-3 NF ⁺ : 5´ -AGGAAGCCAGGAAaGTAAGT-3 NR1 ⁺ : 5´ -tCGGTATGAAAACACTACAAGCAA-3 NR2 ⁺ : 5´ -ACCACACAAGGAcGAATC-3		X: 203 Y: 184 X: 134, Y:110 X: 157, Y:134

* 본 연구에서 새로 제작한 프라이머

표 2. 산양 개체식별을 위한 초위성체 마커 다중증폭 세트 구성

다중증폭 세트	형광 표지	마커 이름 (사이즈)			
		세트 1번	FAM	XY 110-134bp	SY48 143-145bp
세트 2번	VIC	SY76 105-171bp	SY12A 187-209bp	SY3A 270-288bp	
세트 3번	NED	SY71 93-113bp	SY129 134-142bp	SY84B 182-194bp	
세트 4번	NED	SY12B 127-131bp	SY84B 182-194bp	SY22 230-242bp	

- 나) 유전자를 증폭하기 위한 PCR 반응에서 산양 근육 표준 DNA는 10ng을 사용하였다. 다중증폭 실험은 Qiagen Multiplex plus kit를 사용하여 수행하였다. DNA와 Primer를 혼합하여 총 50ul 용량으로 반응하였다. PCR 반응은 95°C(denaturation)에서 5분간 1 cycle 반응 후, 95°C(denaturation)에서 30초, 58°C(annealing)에서 90초, 72°C(extension)에서 30초를 32 cycle 반응 후 68°C(extension)에서 5분간 마무리 반응 후 8°C로 저장하였다. 유전자 증폭 실험 후 증폭된 유전자의 길이는 Genetic Analyzer 3500(Applied Biosystems) 기계를 이용하여 전기영동 하였으며 결과는 Gene mapper program을 이용하여 분석하였다.
- 다) 구성된 다중증폭 세트 1번부터 3번까지 증폭하여 유전자형을 분석한 결과, 각 마커별로 개별적으로 및 혼합했을 때 피크를 명확하게 확인할 수 있었다(그림 1,2,3).

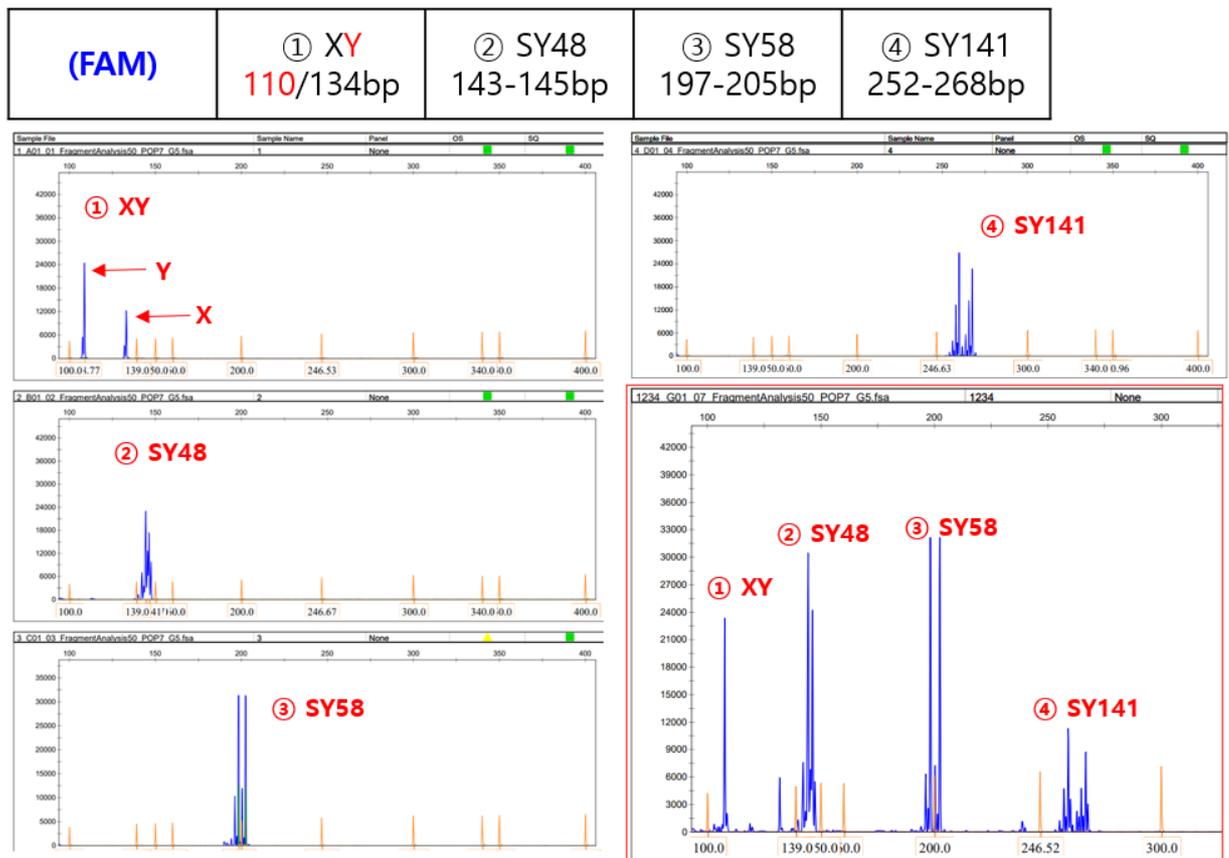


그림 1. 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 1번)

2번 세트 (VIC)	⑤ SY76 105-171bp	⑥ SY12A 187-209bp	⑦ SY3A 270-288bp
------------------------	---------------------	----------------------	---------------------

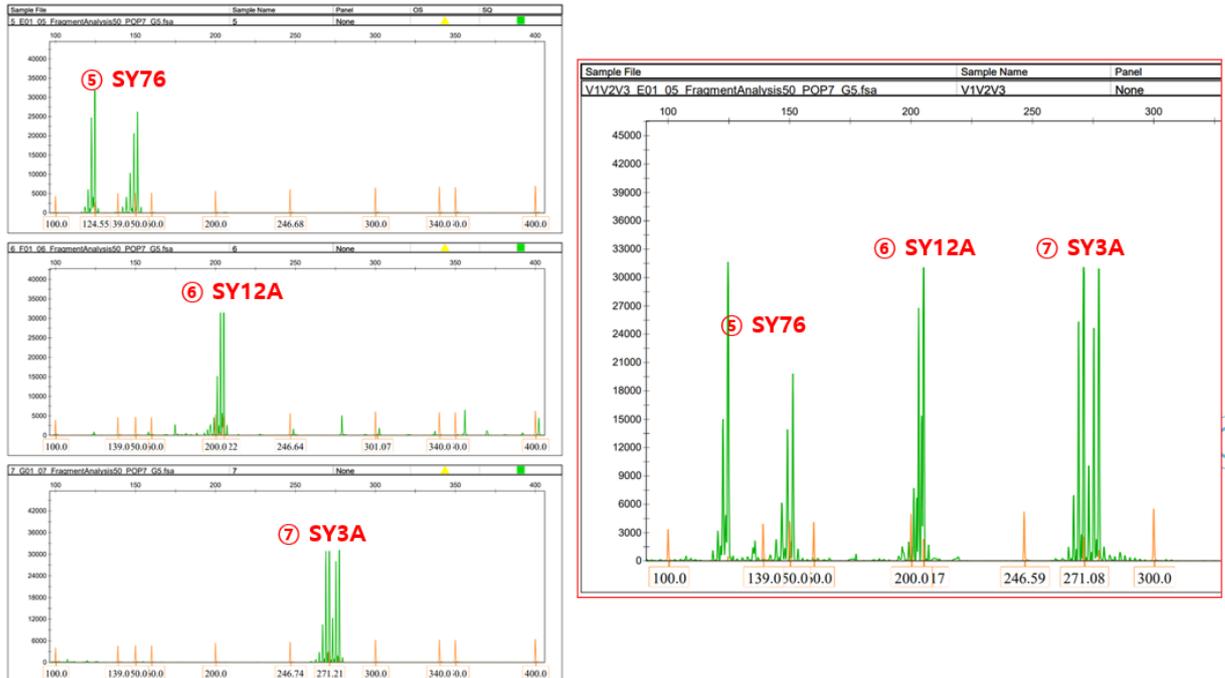


그림 2. 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 2번)

3번 세트 (NED)	⑧ SY71 93-113bp	⑨ SY129 134-142bp	⑩ SY84B 182-194bp
------------------------	--------------------	----------------------	----------------------

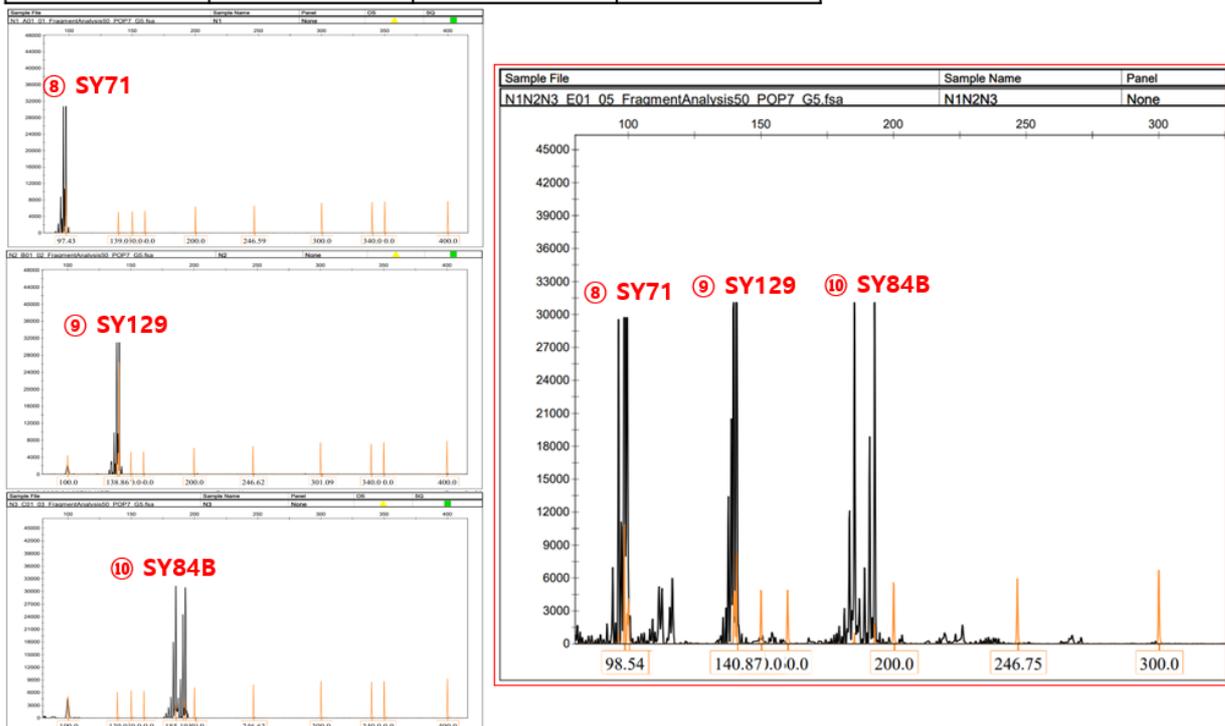


그림 3. 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 3번)

라) 실험 횟수를 줄이기 위해 각 세트를 혼합하여 최종적으로 성판별 마커 1개와 초위성체 마커 8개로 구성된 2개의 세트로 재구성하였다(표 3).

표 3. 산양 개체식별을 위한 초위성체 마커 다중증폭 세트 구성(최종)

형광 표지	세트 1번		세트 2번
FAM	XY 110-134bp	SY58 197-205bp	SY48 143-145bp
VIC	SY12A 187-209bp		SY76 105-171bp SY3A 270-288bp
NED	SY12B 127-131bp	SY84B 182-194bp	SY71 93-113bp

다) 최종적으로 구성한 세트 2개도 다중증폭하여 유전자형을 분석한 결과, 각각의 마커의 피크가 명확히 확인되었다(그림 4.5).

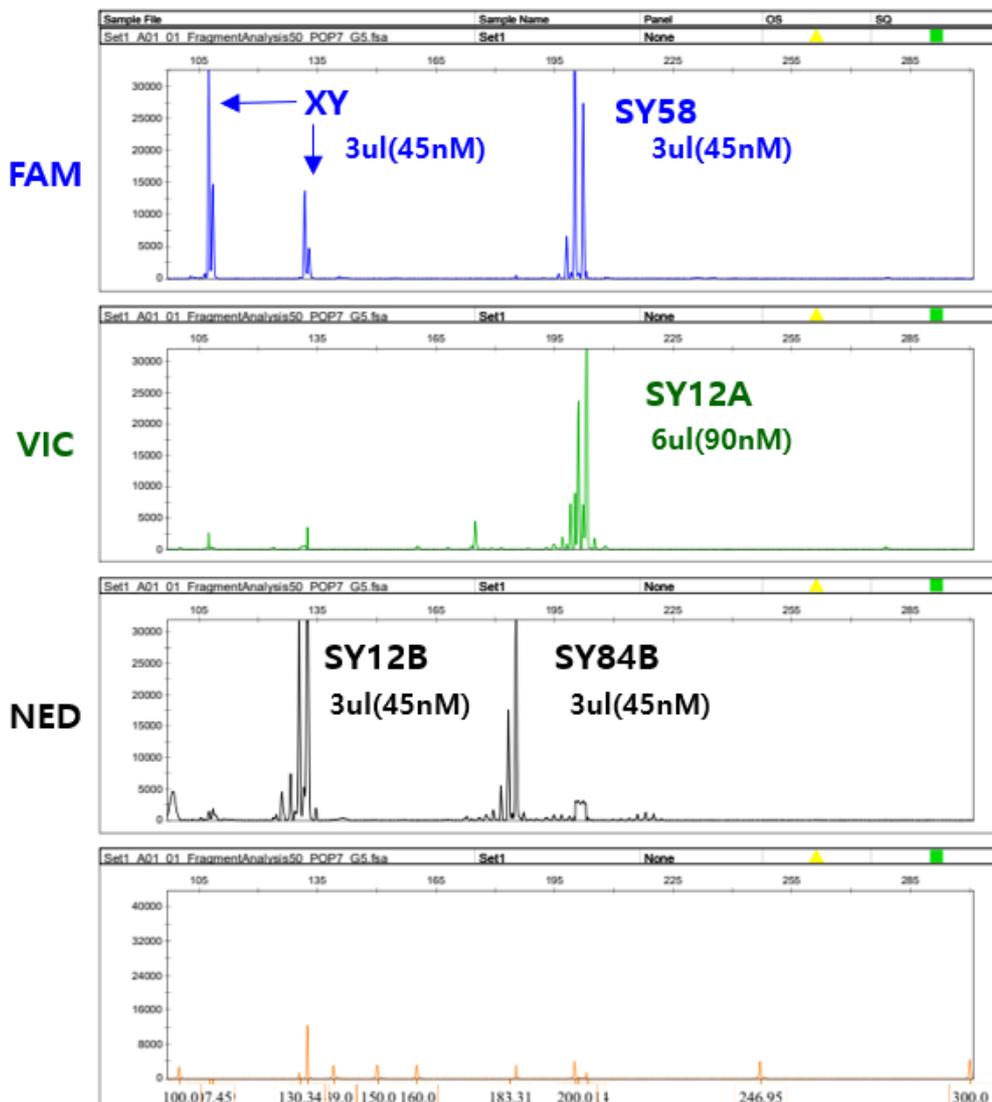


그림 4. 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 1번)

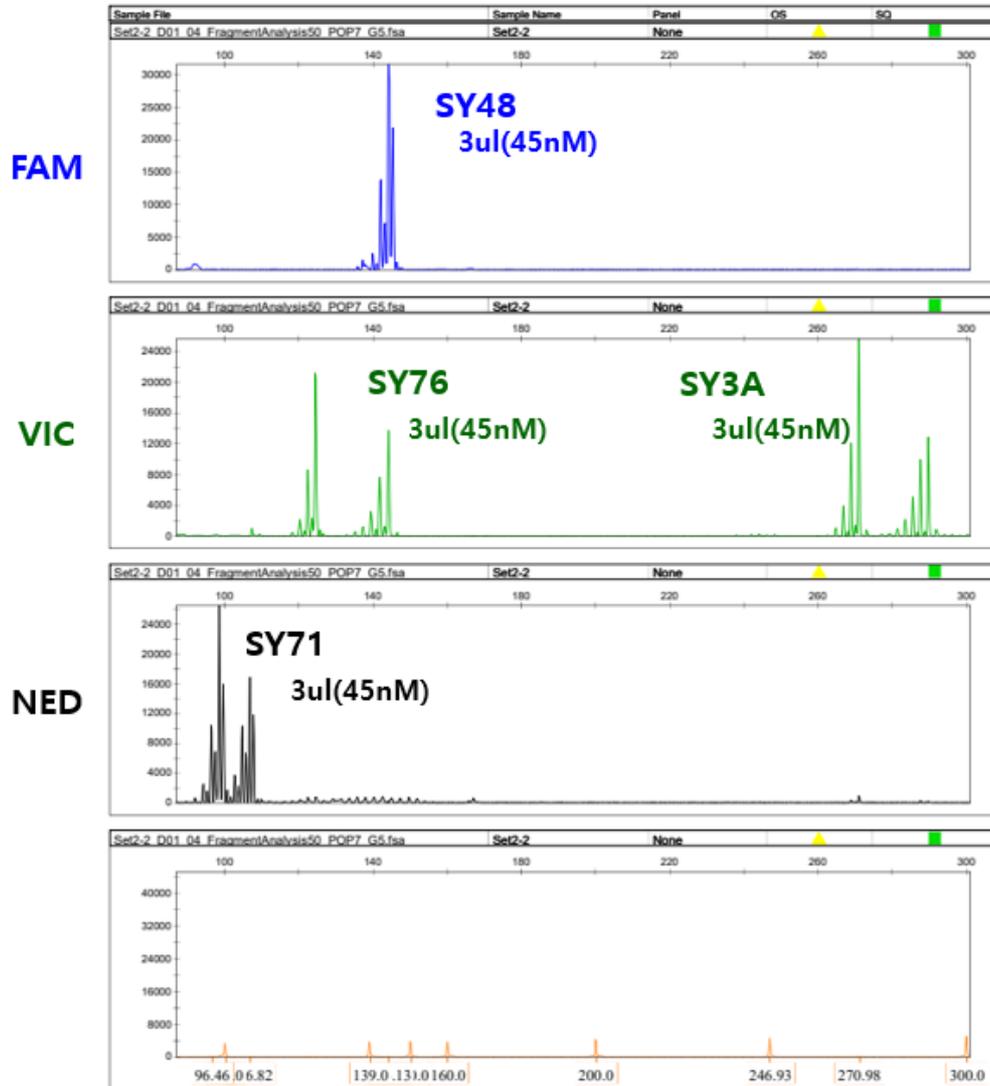


그림 5. 산양 개체식별 다중증폭 세트 증폭 결과(세트 2번)

2) 산양 사체 샘플을 활용한 다중증폭 마커 검증 및 유전다양성 분석

가) 실험에서 선별된 다중증폭 마커 세트를 검증하기 위해서 국가유산청에서 이관받은 강원권 산양 폐사체 46개체를 활용하여 분석하였다(그림 6). 수집된 사체으로부터 유전자를 분리하고 최종적으로 선별한 다중증폭 마커 2세트로 분석하였다(표 4).



그림 6. 강원권 산양 폐사체 사진

나) 사용된 8개 초위성체 마커의 유전다양성을 분석 한 결과 이형접합률 관찰치(H_O)는 0.593, 이형 접합율 기대치(H_E)는 0.653로 나타났다(표 5). 이는 기존에 알려진 산양의 유전다양성과 비교하였을 때 강원권에서 폐사한 산양의 유전다양성이 상대적으로 낮은 수치가 아니라는 것을 예측할 수 있었다(표 4). 또한, 성관별 결과 산양 폐사체 46개체 중 암컷이 19개체, 수컷이 27개체로 확인되었다.

표 4. 강원권 산양 다중증폭 마커를 활용한 개체식별 분석 결과

연번	마커 이름							
	SY58	SY12A	SY12B	SY84B	SY48	SY76	SY3A	SY71
1	202/204	208/208	128/137	185/187	147/147	122/124	274/278	100/108
2	200/202	203/203	132/132	185/185	145/145	124/144	272/290	100/108
3	202/204	208/212	130/132	185/193	145/145	122/149	272/272	100/100
4	202/204	203/208	132/132	185/185	147/147	149/149	272/274	100/108
5	200/202	203/203	132/132	193/193	145/147	124/126	278/280	100/100
6	204/204	203/203	132/137	185/193	145/145	126/144	272/274	108/114
7	200/204	203/208	128/132	185/187	147/147	124/144	272/278	100/112
8	200/200	212/212	132/132	185/193	145/147	144/149	272/272	100/114
9	200/206	203/212	132/132	185/189	145/147	149/149	272/280	100/112
10	202/204	212/212	130/132	185/187	147/147	126/149	272/280	100/100
11	200/202	203/208	128/132	185/193	147/147	124/144	274/278	100/114
12	200/202	203/208	132/137	185/185	147/147	122/122	272/278	108/114
13	200/204	203/203	128/132	193/193	145/147	124/124	274/290	100/108
14	204/204	203/212	132/137	185/185	145/145	124/149	274/274	108/114
15	200/200	203/208	132/137	185/187	145/147	124/144	272/274	100/108
16	200/204	203/203	137/137	185/185	145/145	122/149	272/274	108/114
17	200/202	203/212	132/137	185/187	145/145	126/149	274/278	108/112
18	202/204	203/212	132/132	185/185	147/147	124/126	278/278	100/100
19	198/202	208/208	132/132	185/187	145/145	144/149	274/280	100/100
20	202/204	203/208	132/137	185/185	145/145	122/122	272/274	100/112
21	202/204	203/203	132/137	185/187	145/145	124/126	278/278	108/108
22	200/204	208/212	130/132	185/185	145/145	124/124	274/274	108/114
23	200/204	208/208	128/128	185/185	145/147	124/149	278/280	108/114
24	202/202	203/203	128/132	185/185	147/147	124/149	278/278	112/112
25	200/204	208/208	128/132	185/185	147/147	126/144	272/274	98/98
26	200/204	203/203	130/132	193/193	145/147	124/126	274/278	100/108
27	200/204	203/203	132/137	185/187	145/145	126/144	272/280	100/108
28	202/204	203/212	132/132	185/187	145/145	126/149	272/274	100/108
29	200/204	208/208	132/137	185/187	145/145	122/149	274/278	100/108
30	200/202	203/212	132/132	185/187	147/147	149/149	272/274	108/108
31	200/200	203/212	128/137	185/193	145/145	126/126	272/274	100/114
32	198/204	203/203	132/132	185/185	145/147	144/144	278/278	100/100
33	200/204	203/208	132/137	185/193	145/147	126/144	272/278	100/108
34	200/200	203/208	132/137	185/189	145/145	122/126	274/274	108/108
35	200/200	203/208	132/137	185/185	145/145	122/126	278/278	100/108
36	198/204	203/208	132/137	185/187	147/147	124/124	274/274	108/108
37	202/204	203/203	132/132	185/187	145/145	126/149	272/278	100/112
38	202/204	208/212	132/132	185/189	145/147	122/149	278/290	100/100
39	198/204	203/205	132/132	193/193	147/147	126/149	272/274	100/100
40	202/202	189/203	132/132	185/193	145/145	149/151	274/290	96/100
41	204/204	189/205	132/132	187/193	145/145	124/124	274/274	96/100
42	202/202	203/208	132/132	185/187	145/147	122/149	272/278	100/108
43	200/202	208/208	128/128	189/189	145/145	144/149	272/274	100/114
44	200/202	203/208	130/132	185/193	145/145	124/149	274/290	100/100
45	202/202	203/208	132/132	185/189	145/145	126/149	272/274	100/100
46	202/202	203/210	128/132	185/185	145/147	126/149	274/290	114/116

표 5. 강원권 산양 유전다양성 분석 결과

Locus	N	Na	Ho	He	PIC	HWE
SY58	46	5	0.717	0.708	0.639	ND
SY12A	46	6	0.587	0.651	0.583	NS
SY12B	46	4	0.565	0.554	0.504	NS
SY84B	46	4	0.587	0.597	0.543	NS
SY48	46	2	0.261	0.482	0.363	*
SY76	46	6	0.761	0.797	0.755	ND
SY3A	46	5	0.739	0.742	0.688	NS
SY71	46	7	0.652	0.692	0.636	NS
Mean		4.875	0.593	0.653	0.589	-

N = number of analyzed individuals; Na = number of alleles per locus; HO = observed heterozygosity; HE = expected heterozygosity

2. 유전자 연구를 통한 서식지의 표범 흑색증(Melanism) 분석

가. 연구 내용

1) 시료(혈액)에서 유전자 추출

가) 서울대공원이 보유한 아무르표범 2마리(♂2016년생 로드, ♂2016년생 레오)에서 채취한 혈액 시료를 협조받았다. Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit을 활용하여 유전자를 추출하였으며 과정은 다음과 같다.

- 1.5 ml microcentrifuge tube에 Proteinase K 20 μ l, 항응고 처리된 혈액 100 μ l, 그리고 PBS 100 μ l를 넣어 220 μ l를 맞췄다.
- AL buffer 200 μ l를 넣고 볼텍싱(Vortexing)하여 섞은 뒤 56°C에서 10분간 반응시켰다.
- 반응이 끝난 tube에 에탄올(96~100%) 200 μ l를 추가하고 볼텍싱 한 뒤, 혼합액 중 600 μ l를 2ml tube에 장착된 DNeasy mini spin 컬럼에 옮겨서 6,000xg(8,000rpm)으로 1분간 원심분리 했다.
- collection tube에 모인 용액은 버리고 컬럼을 새로운 2ml collection tube에 장착한 뒤 AW1 buffer 500 μ l를 넣고 6,000xg(8,000rpm)으로 1분간 원심분리 했다.
- collection tube에 모인 용액은 버리고 컬럼을 새로운 2ml collection tube에 끼운뒤 AW2 buffer 500 μ l를 넣고 20,000xg(14,000rpm)에서 3분간 원심분리 했다.
- 컬럼을 꺼내 새 1.5ml microcentrifuge tube에 옮겼다.
- 컬럼의 멤브레인 중앙에 AE buffer 200 μ l를 직접 떨어뜨린 후 상온에서 1분간 대기하고 6,000xg(8,000rpm)으로 1분간 원심분리하여 DNA를 추출 했다.

2) 대상(ASIP) 유전자 증폭

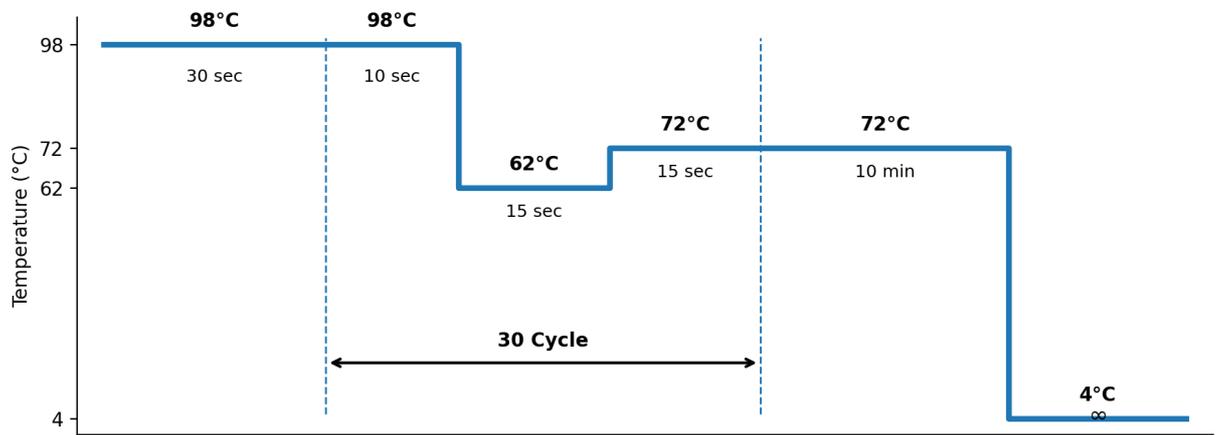
가) 표범의 흑색증을 판별하기 위해 ASIP exon 4구간 유전자의 변이 여부를 확인한다. 이를 위해 ASIP 유전자를 증폭하는데 그 방법은 아래와 같다.

- 증폭을 위해 2개의 시료에서 추출한 유전자로 반응액(DNA template: 4 μ l, Forward primer: 2 μ l, Reverse primer: 2 μ l, 2 mM dNTP: 5 μ l, 5X Phusion GC Buffer: 10 μ l, Phusion high-fidelity DNA polymerase: 0.5 μ l, Nuclease-free water: 26.5 μ l) 각 50 μ l를 만들었다.

프라이머 정보

- Forward primer: TTTTCCCCACAGAAAAAGGCTT
- Reverse primer: GGAAGCCACACCTGTTAGAAAT
- 증폭산물: 360bp

- PCR 조건은 ① 98°C에서 30초, ② 98°C에서 10초, ③ 62°C에서 15초, ④ 72°C에서 15초, ⑤ 72°C에서 10분이며, ②~④과정을 30회 반복했다.



- PCR이 끝나면 1% agarose gel에서 증폭산물을 확인했다.

3) 시퀀싱(Sequencing) 및 판정

- 가) forward 및 reverse primer를 사용하여 Sanger sequencing을 의뢰하였다.

나. 연구 결과

1) 시료(혈액)에서 유전자 추출

- 가) 혈액 시료로부터 QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit을 이용해 genomic DNA를 추출하였고, NanoDrop으로 정량한 결과 DNA 농도는 각각 20.2 ng/μL(레오) 및 16.8 ng/μL(로드)로 확인되었다.

2) 대상(ASIP) 유전자 증폭

- 가) 1% Agarose Gel 전기영동으로 PCR 산물을 확인한 결과 약 360bp 크기의 밴드가 관찰되었다.

3) 시퀀싱(Sequencing) 및 판정

- 가) Sanger 시퀀싱 결과, 레오와 로드의 ASIP 유전자 코딩서열에서 c.333 위

치의 염기가 C와 A로 함께 관찰되어(c.333C>A) 두 개체 모두 이형접합 (C/A)으로 확인되었다(그림 7).

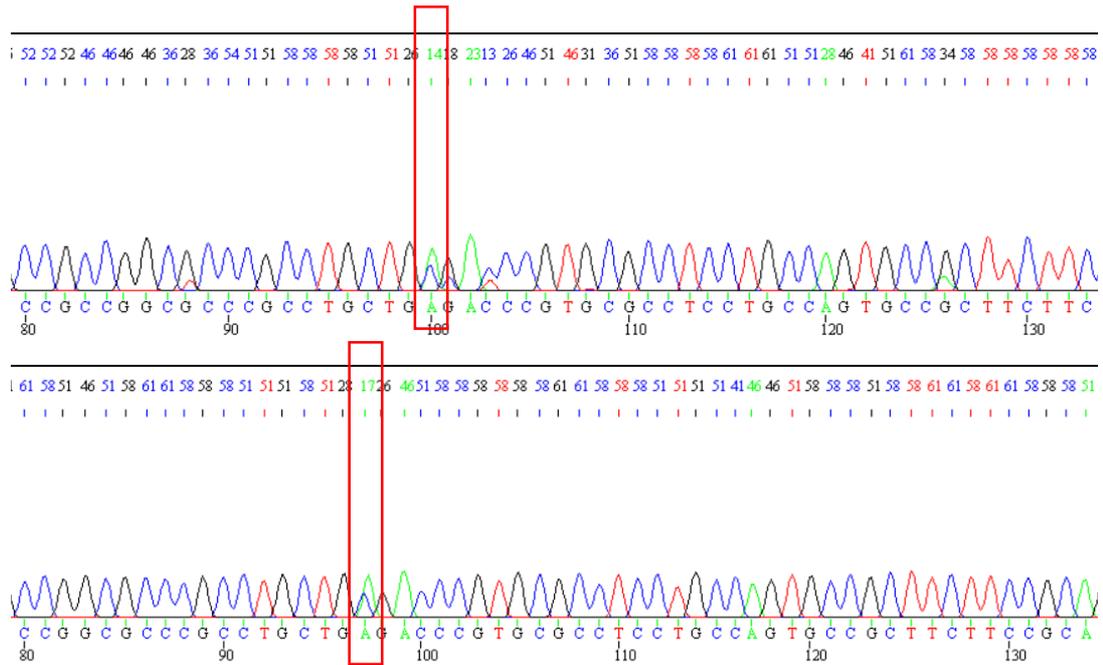


그림 7. 표범 ASIP 유전자 염기서열 결과 (위쪽: 레오, 아래쪽: 로드)

3. 멸종위기종 생식세포 확보 및 동결보존 안정성 기술 개발

가. 연구 내용 및 결과

1) 멸종위기종 생체시료 확보

가) 내·외부 협력 및 수집을 통해 다양한 생체시료를 확보하였다. 멸종위기종 식물(4종) 수집을 통해 29개체 348개 식물 샘플을 확보하였으며, 내부 협력을 통해 소똥구리 사체 180개체 180샘플을 확보하였다.

연번	분류군	국문명	학명	개체 수	샘플 수	확보 형태	확보 방법
1	식물	산작약	<i>Paeonia obovata</i>	17	53	잎, 꼬투리	수집
2		신안새우난초	<i>Calanthe aristulifera</i>	4	12	잎	
3		석곡	<i>Dendrobium moniliforme</i>	4	134	잎, 줄기	
4		흑난초	<i>Bulbophyllum inconspicuum</i>	4	149	잎	
5	곤충류	소똥구리	<i>Gymnopleurus mopsus</i>	180	180	사체	-
총				209개체	528샘플		

나) 또한, 외부협력을 통해 국가유산청으로부터 이관받은 산양 폐사체 50개체로부터 750개의 조직 샘플을 확보하였다. 확보된 사체는 바코드 시스 그리고 영남대학교·공주대학교와의 공동연구를 통해 살아있는 세포 11개체 20샘플을 확보하였다.

연번	분류군	국문명	학명	개체 수	샘플 수	확보 형태	확보 방법
1	포유류	산양	<i>Naemorhedus caudatus</i>	50	750	조직	국가유산청 이관
2		라쿤*	<i>Procyon lotor</i>	1	3	생식세포	영남대학교 공동연구
3		사자*	<i>Panthera leo</i>	1	3	생식세포	
4		여우*	<i>Vulpes vulpes</i>	1	4	생식세포	
5	양서류	고리도롱뇽	<i>Hynobius yangi</i>	3	5	정자	공주대학교 공동연구
6		맹꽁이	<i>Kaloula borealis</i>	5	5	정자	
총				61개체	770샘플		

다) 확보된 샘플들은 바코드 시스템에 등록하고 초저온(-80℃) 또는 액체질소(-196℃)에 저장하였다.

라) 이렇게 멸종위기종을 포함하여 생체시료 총 8종 270개체 1,298 샘플을 확보하였다.

2) 멸종위기 양서류 2종(고리도롱뇽 및 맹꽁이) 동결 정자 채취 및 동결보존 기술 개발

가) 고리도롱뇽, 맹꽁이 포획채취 허가신청을 하고 소변으로부터 정액 시료를 채취하였다. 고리도롱뇽에 hCG 200IU 용량을, 맹꽁이에 hCG 300IU 용량을 복강 주사 (PI) 후 소변 배출을 유도하기 위해 1시간 정도 깨끗한 물에 충분히 수화시켰다. 수화된 양서류의 소변을 수집하여 1.5ml tube에 넣고 얼음 위에 보관하여 정자 생존율을 유지하였다(그림 8).



그림 8. 양서류 호르몬 주입 및 소변 유래 정자 수집

나) 비침투성 동결보존제인 0.3M Sucrose와 침투성 보존제인 5%, 10%, 15% DMSO 또는 5%, 10%, 15% DMFA를 혼합하여 6가지의 동결보존제를 제조하였다(표 6)

표 6. 고리도롱뇽 및 맹꽁이 동결보존액 제조 농도

동결보존제 종류	동결보존제 농도	Sucrose	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgSO ₄	Tris-HCl (pH 8.0)
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	5%	300 mM	100 mM	3 mM	1 mM	1 mM	20 mM
	10%	300 mM	100 mM	3 mM	1 mM	1 mM	20 mM
	15%	300 mM	100 mM	3 mM	1 mM	1 mM	20 mM
DMFA (dimethylformamide)	5%	300 mM	100 mM	3 mM	1 mM	1 mM	20 mM
	10%	300 mM	100 mM	3 mM	1 mM	1 mM	20 mM
	15%	300 mM	100 mM	3 mM	1 mM	1 mM	20 mM

다) 제조된 동결보존제를 소변과 1:1 (v/v)로 희석 후, 동결 방지제 처리한 소변을 0.25mL IMV straw에 넣고, PVA 분말로 밀봉하였다(그림 9). 밀봉한 straw는 4°C 냉장고에 넣어 10분 동안 보관한 후, 액체질소 표면에서 10cm 떨어진 트레이 위에서 10분간 pre-freezing 진행한 뒤 액체질소에 넣어 보존하였다(그림 10).

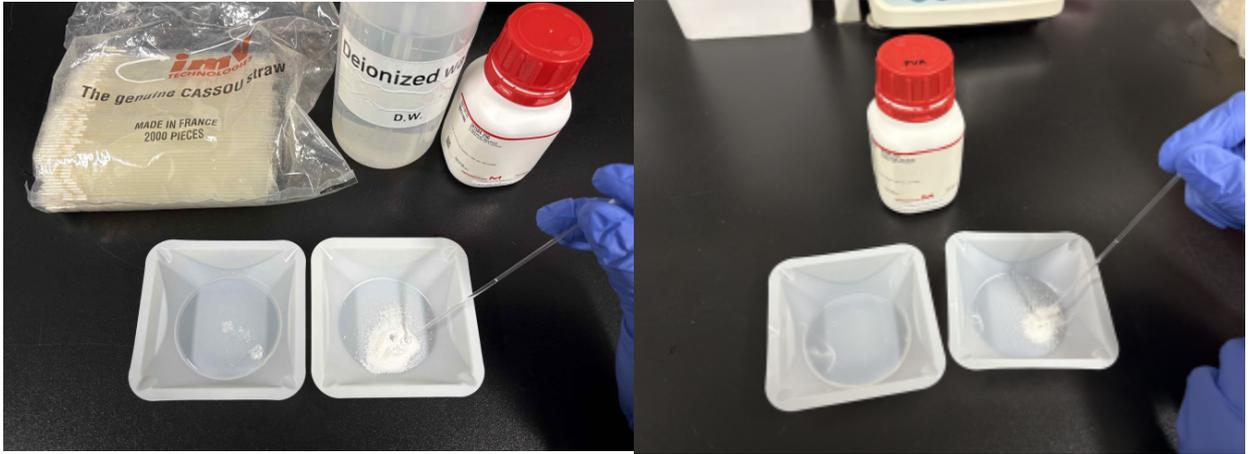


그림 9. 양서류 소변과 동결보존제 혼합 및 straw에 밀봉

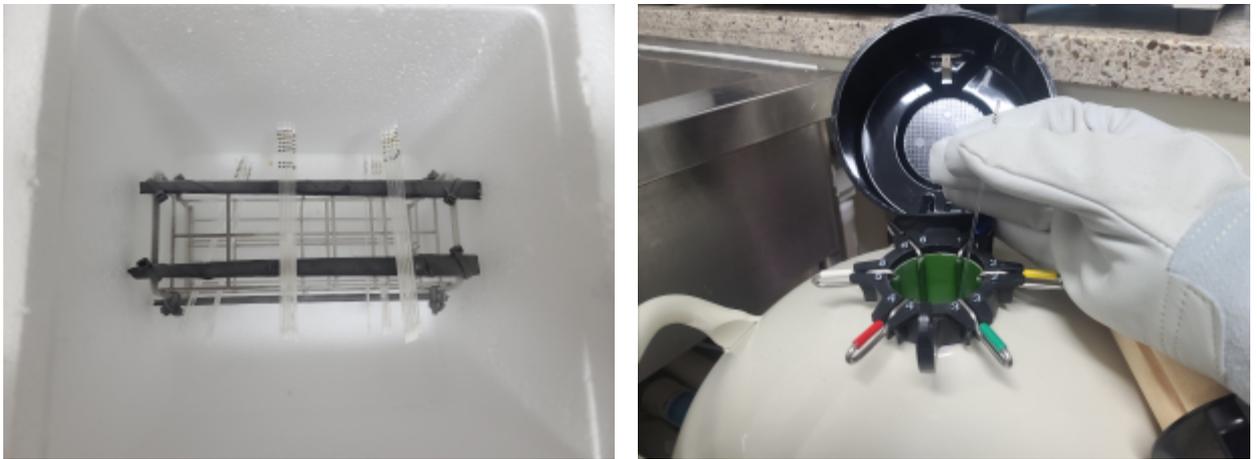


그림 10. 양서류 정자 pre-freezing 및 액체질소 보존

라) 동결한 정자 straw를 40℃로 설정된 워터배스에서 5초간 해동한 후, straw의 한쪽 끝을 가위로 잘라 얼음 위에 놓인 1.5ml e-tube에 보관하였다. 정자 활성 용액과 고리도롱뇽, 맹꽁이 정자 현탁액을 각 1:5 (v/v) 비율로 3분에 걸쳐 희석을 진행하였다(그림 11).



그림 11. 양서류 동결 정자 해동 및 정자 현탁액 희석

마) 4 μ l의 양서류 정자 현탁액과 amphibian ringer's solution으로 50배 희석한 SYBR-14 염색약 5 μ l와 propidium iodid 1 μ l를 순차적으로 혼합하여 핵산을 염색한 뒤 (Hemocytometer)에 10 μ l를 주입하여 40X 배율 광학현미경으로 고리도롱뇽 및 맹꽂이 정자의 생존을 확인하였다(그림 12).

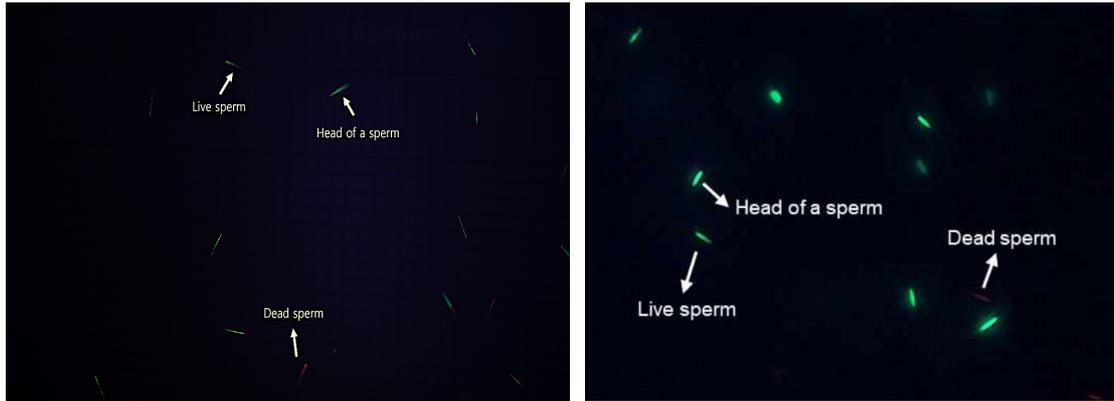


그림 12. 고리도롱뇽(왼쪽), 맹꽂이(오른쪽) 해동 정자 생존을 확인

바) 고리도롱뇽은 10% DMSO + 0.3M Sucrose 동결보존제 조합에서 해동 후 가장 높은 생존율이 확인되었다. 맹꽂이는 15% DMSO + 0.3M Sucrose 동결보존제 조합에서 해동 후 가장 높은 생존율이 확인되었다(그림 13).

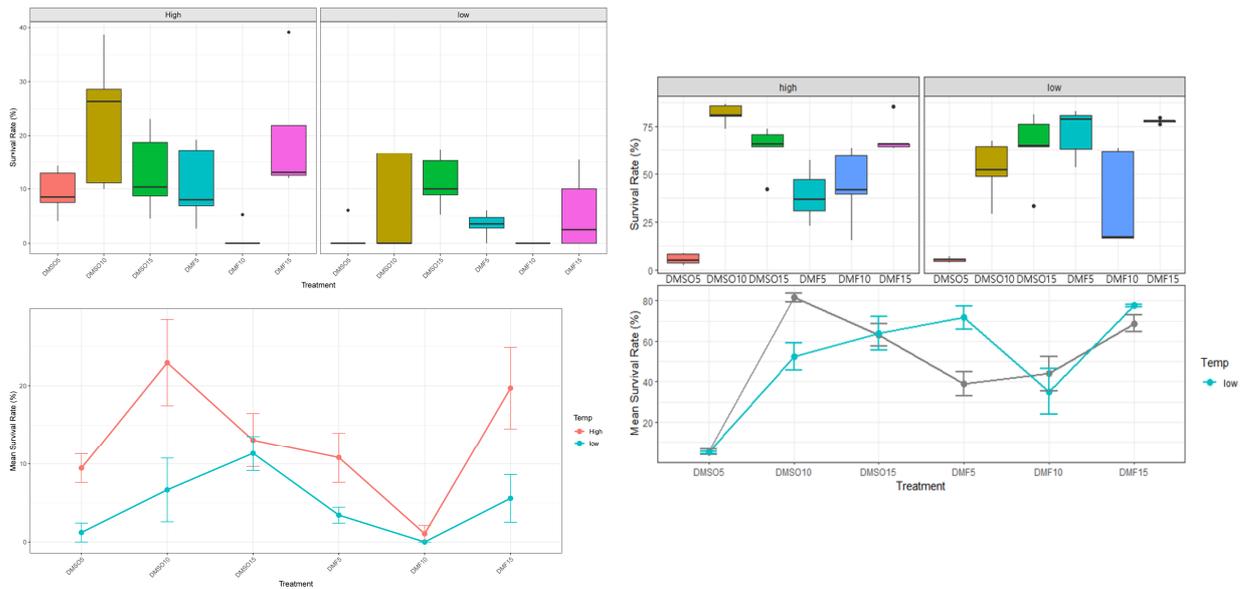


그림 13. 동결보존제에 따른 고리도롱뇽(왼쪽), 맹꽂이(오른쪽)의 해동 정자 생존율 그래프

사) 고리도롱뇽 및 맹꽂이 최적 동결보존제 농도를 확인 한 뒤, 소변 유래 정자 시료와 각 10%, 5% DMSO 동결보존제를 혼합하여 액체질소에 보관하였다. 총 3개체의 고리도롱뇽으로부터 5개의 동결 정자 시료와 5개체의 맹꽂이로부터 5개의 동결 정자 시료를 확보하여 동결보존하였다.

2) 국제적 멸종위기종 및 야생생물 생식세포 확보 및 동결보존 기술 개발

가) 사자 난소 조직·체세포 확보 및 동결보존 기술 개발

- 사자 난소 조직은 무게 측정 후 DPBS with이 들어있는 60π 페트리 디시에 옮겨 처리하였다. 난소 외부의 불필요한 지방 및 결합조직을 제거한 뒤, 난소 피질(cortex) 부위를 중심으로 멸균 메스를 이용하여 약 1-2 mm 두께의 조각으로 절단하였다. 절단된 난소 조각은 한 dish에 4-6개 정도씩 배치하였으며, 이후 실험 목적에 따라 동결보존 또는 체외 배양 및 추가 분리 실험에 사용하였다(그림 14).

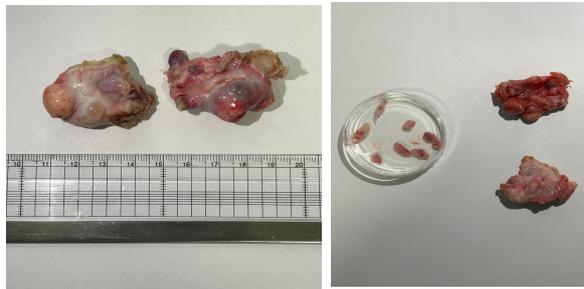


그림 14. 사자 난소 조직

- 난소 표면의 난포액을 1 mL syringe로 흡인하여 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 L-15 medium + 10% FBS + 1% p/s에서 2회 세척하였다. 그 다음, 4-well plate에서 MEM-alpha medium(Welgene, LM 008-01) + 5% FBS + 1% p/s 조건으로 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 Day 3까지 배양하였다. 그 후 fluorescein diacetate(FDA) 2 µg/mL와 propidium iodide(PI) 1 µg/mL 조건으로 5분간 반응시킨 후 형광현미경(CELENA S)으로 관찰하였다.
- 그 결과, 난자 세포질 전반에 걸쳐 fluorescein diacetate(FDA) 양성의 녹색 형광이 관찰되었다(그림 15). FDA는 세포막이 온전히 유지된 살아있는 세포 내로 확산된 후, 세포 내 esterase에 의해 가수분해되어 형광을 발현하는 물질로, 세포의 대사 활성이 유지되는 경우에만 형광 신호를 나타내는 생존 지표로 사용된다 (Boender, 1984; Mohr & Trounson, 1980). 반면 propidium iodide(PI)는 세포막이 손상된 세포에서만 핵산과 결합하여 적색 형광을 나타내는 염색제로, 본 실험에서 관찰된 난자에서는 PI 양성 신호가 뚜렷하게 확인되지 않았다 (Nagy et al., 2003). 이러한 염색 결과는 D3 시점의 난자가 세포막 무결성과 기본적인 대사 활성을 유지하고 있었

음을 시사하며, 체외 배양 이후에도 생존 상태가 유지되었음을 의미한다 (Mohr & Trounson, 1980). 특히 난자는 세포 크기가 크고 세포질 비율이 높아, FDA 형광이 핵이 아닌 세포질 전반에 확산되어 관찰되는 것이 일반적인 특징으로 보고되어 있으며, 이는 본 실험에서 관찰된 형광 패턴과 일치한 것과 확인되었다 (Boender, 1984; Nagy et al., 2003).

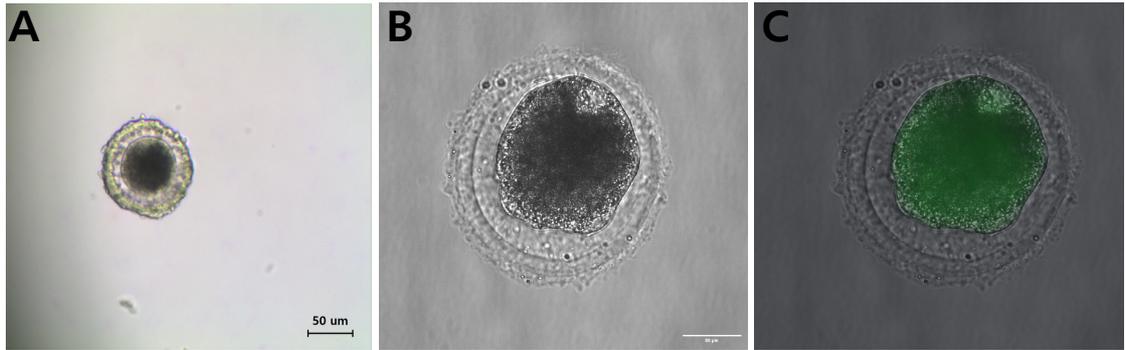


그림 15. 사자 난포액 유래 난자의 체외성숙(IVM) 및 Live/Dead 염색 결과

- 효소 처리 후 분리된 조직을 배양한 결과, 배양 용기 바닥에 부착하는 세포들이 관찰되었다(그림 16). 배양 경과에 따라 해당 세포들은 방추형 형태를 보이며 점차 밀도가 증가하는 양상을 나타냈다. 2차례 계대배양을 통해 세포 증식이 유지되었으며, p2 단계까지 체세포 확보가 가능하였다. p2 배양 초기(Day 0)와 배양 9일차 관찰 결과, 세포 수 증가와 함께 세포 간 연결이 증가하는 형태가 확인되었다.
- 확보된 사자 난소 1샘플 및 난자 유래 체세포 1샘플은 동결보존 하였으며, 동결 전 세포는 부착형 형태를 유지하였다.

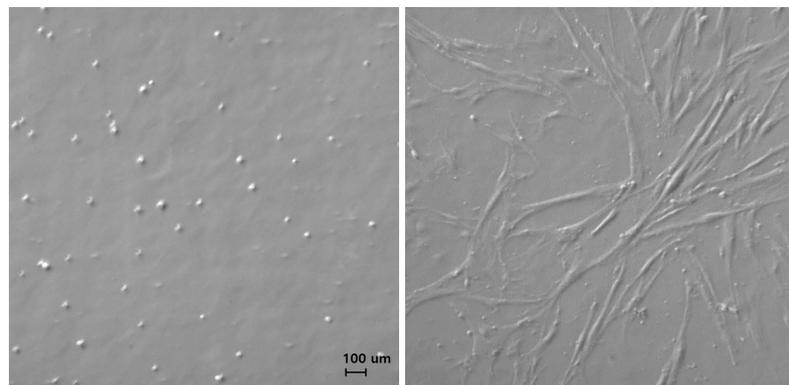


그림 16. 사자 난소 조직 유래 체세포 배양

나) 라쿤 정소조직 확보

- 국립생태원에서 보유중인 라쿤의 증성화수술을 통해 정소 조직을 확보하였다. 확보된 조직은 DPBS로 세척한 후 조각화하였다. 그 후 효소 처리 후 기계적 분산을 통해 단일세포 수준으로 분리하였다(그림 17).



그림 17. 라쿤 정소 및 세정관 분리

- 분리된 세포를 배양한 결과 배양 접시 바닥에 부착하는 세포들이 관찰되었다. 배양 초기(Day 0)에는 낮은 세포 밀도가 확인되었으나, 배양 5일차에는 부착성 세포의 수가 증가하며 증식 양상이 관찰되었다(그림 18). 배양을 통해 확보된 여우 정소 유래 체세포는 p0 단계까지 안정적으로 유지되었으며, 동결 전 관찰에서 세포는 전반적으로 균일한 형태와 부착 상태를 보였다. 해당 체세포는 cryovial에 분주하여 동결보존 처리하였으며, 정소 조직 유래 체세포의 확보 및 저장이 가능함을 확인하였다.
- 분리한 정소(세정관) 4샘플을 확보하여 동결보존하였다.

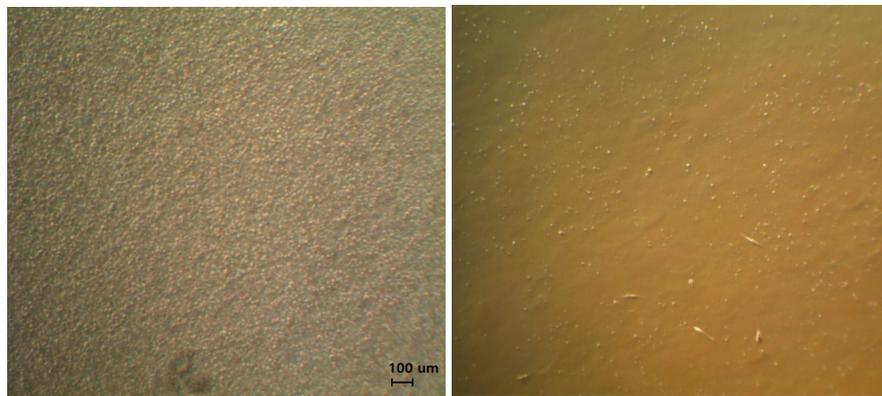


그림 18. 라쿤 세정관 세포 배양

다) 여우 정소조직 및 체세포 확보

- 국립생태원에서 구조한 여우(잡종 추정) 중성화수술을 통해 정소 조직을 확보하였다. 확보된 조직은 잘게 분쇄하였다. 이후 collagenase type I 750 U/mL 용액을 5ml 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 30분간 처리하였다. 효소 처리 후에는 1 ml 피펫팁의 끝부분을 절단하여 반복적인 pipetting을 수행함으로써 조직을 추가로 분산시켰다(그림 19).

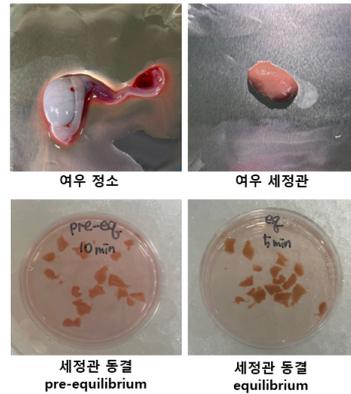


그림 19. 여우 정소 조직 및 세정관 분리

- 분산된 세포 현탁액은 40 μ m cell strainer(FALCON, 352340)로 여과한 뒤, DMEM Low glucose 배지에 10% FBS를 첨가한 배지를 기존 현탁액과 1:1 비율로 혼합하였다. 이후 390 g에서 4분간 원심분리하여 세포 pellet을 회수하였다.
- 분리된 세포는 DMEM low glucose + 10% FBS + 2% p/s 조건에서 배양하였으며, 배양 다음 날 1회 배지를 교체한 후 이후에는 2일 간격으로 배지를 교체하였다. 초기 배양된 세포는 p0 단계에서 동결보존을 수행하였다. 세포 동결은 DMEM + 80% FBS + 10% DMSO + 2% P/S 조건으로 cryo vial에 현탁하여 coolcell에 넣어 -80°C에서 보관한 뒤, 다음 날 액체 질소 탱크로 옮겨 장기 보관하였다(그림 20).
- 여우에서 분리한 정소(세정관) 조직 3샘플 및 체세포 1샘플을 확보하여 동결 보존하였다.

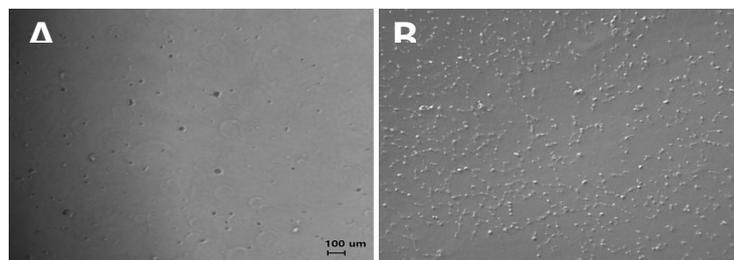


그림 20. 여우 정소 조직 유래 체세포 분리 및 배양 결과

라) 꽃사슴 및 다마사슴 정소 조직 확보 및 동결보존

- 경북야생동물구조센터에서 보유 중인 꽃사슴 및 다마사슴 중성화수술을 통한 정소 조직을 확보하였다(그림 21,22). 확보된 조직에서 세정관을 분리하고 배양하여 각각 5샘플씩 동결보존 하였다.

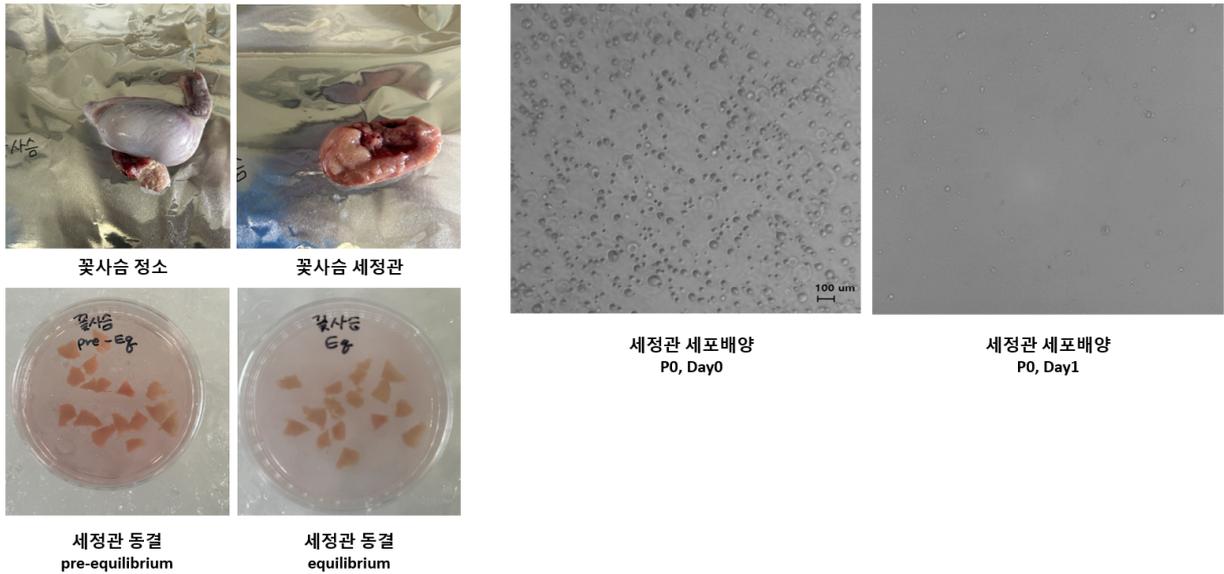


그림 21. 꽃사슴 정소·세정관 확보 및 배양

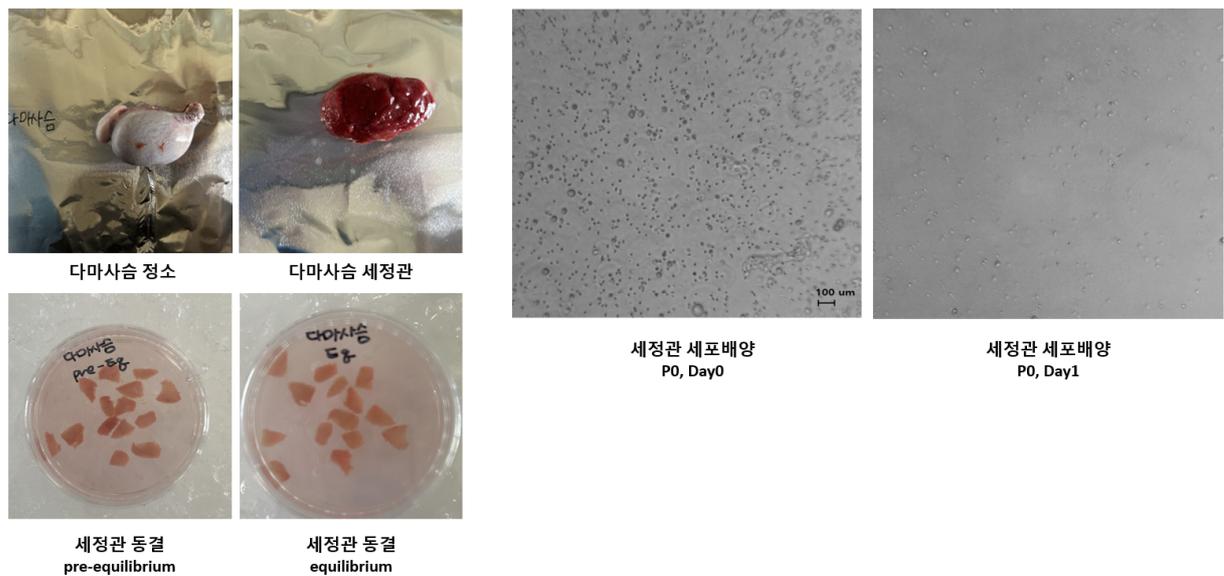


그림 22. 다마사슴 정소·세정관 확보 및 배양

III. 고찰 및 제언

(산양 유전자 마커 개발) 본 연구에서 최종적으로 산양의 개체식별을 위한 마커로 8개의 MS 마커와 1개의 성감별 마커를 개발하였다. 각각의 마커는 다중증폭을 위해 길이를 조절하였으며, 최종적으로 5개와 4개의 마커를 섞어서 2개의 다중증폭 세트를 구성하였다. 강원권 산양 폐사체(46개체) 조직으로 테스트 한 결과 두 개의 마커 세트는 매우 잘 작동하였으며, 산양의 개체 식별뿐만 아니라 유전다양성을 확인 할 수 있었다. 이로써 본 연구에서 개발된 산양 개체식별 다중증폭 마커 세트를 이용하여 모니터링 할 경우 기존 대비 예산과 시간을 77% 수준으로 줄일 수 있을 것이라 예상된다.

(표범 흑색증 분석) 본 연구에서는 서울대공원 보유 아무르표범 2개체(레오, 로드) 혈액에서 gDNA를 추출하고 ASIP exon 4 구간(증폭산물 360 bp)을 PCR로 증폭한 뒤 Sanger 시퀀싱으로 변이를 확인하였다. 두 개체 모두 ASIP 코딩서열(coding sequence) 333번 위치에서 C/A 이형접합으로 확인되었다(= c.333C>A에 해당). 이는 두 개체는 외형적으로는 정상 색 패턴을 보이지만 유전적으로는 흑색증 관련 대립유전자를 보유하고 있는 보인자임을 확인할 수 있었다. 이 결과, 아무르표범도 서식지외(ex situ) 개체군에서 멜라니즘 관련 대립유전자가 잠재적으로 유지되고 있음을 시사한다. 염기서열 분석 결과는 아무르표범 EEP와 공유하였으며, 이는 향후 사육·번식 관리(유전적 다양성 유지, 특정 표현형 관리 등) 측면에서 참고할 수 있는 기초자료가 된다.

(생식세포 확보 및 동결보존 기술 개발) 본 연구에서는 멸종위기종 연구 및 보존을 목적으로 멸종위기종 생체시료를 체계적으로 확보하였다. 살아있는 세포를 확보하고 장기적으로 보존하기 위한 중별 맞춤형 동결보존 기술을 개발하는데 중점을 두었다. 살아있는 세포를 확보하기 위한 연구대상은 멸종위기종 양서류 2종(고리도롱뇽, 맹꽁이 정자) 및 야생동물(사자, 라쿤 여우, 꽃사슴, 다마사슴)로 총 7종 31샘플을 확보하였다. 실험을 통해 각 세포에 적합한 동결보존액과 동결 조건을 확인하였으며, 동결 후 해동한 세포의 생존율을 분석하여 안정적인 동결 조건을 검증하였다. 본 연구 결과는 멸종위기종 세포 동결 기술을 확립함으로써, 개체 복원 및 생물다양성 보존을 위한 기초 자료로 활용될 것으로 기대된다. 또한, 살아

있는 세포뿐만 아니라 조직, 사체와 같은 죽어있는 샘플도 확보하여 25년 멸종위기종을 포함하여 총 8종 270개체 1,298샘플을 확보하였다. 이 결과, 멸종위기종 생체시료은행은 국내에서 가장 많은 멸종위기종 생체시료를 보유한 기관으로 자리잡았으며, 총 71종 1,903개체 6,473샘플을 보관중이며 생물자원 보존 및 활용에 중요한 역할을 수행할 것으로 기대된다.

IV. 활용 방안 및 기대 효과

- 1) 유전자 마커 개발 및 활용 매뉴얼을 제작하여 관련기관에 배포함으로써 멸종위기종 모니터링 연구 활성화 기여
- 2) 멸종위기종 개체군 크기 및 유전다양성 연구 등 유전연구를 통한 복원 전략 추진
- 3) 개발된 마커의 특허 출원 및 등록을 통한 계량 성과 달성
- 4) 산양 개체식별을 위한 다중중폭 마커 개발을 통해 유전자 분석 소요 시간 및 예산 절감

V. 당해 연도 추진 일정

연구 목표 및 내용	월 별											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
멸종위기종 생체시료 확보	[Progress bar]											
표범 흑색증(Melanism) 분석	[Progress bar]											
맞춤형 저장 기술 개발	[Progress bar]											
개체 식별 마커 개발		[Progress bar]										

참고문헌

환경부 국립생태원. (2022). 멸종위기종 유전다양성 및 고유성 연구 (22년).

환경부 국립생태원. (2024). 냉동보존 세포를 활용한 멸종위기종 복원연구 (24년).

An, J., Choi, S. K., Sommer, J., Louis Jr, E., Brenneman, R., Zemanová, B., Hájková, P., Park, G., Min, M. S., Kim, K. S., and Lee, H. (2010). A core set of microsatellite markers for conservation genetics studies of Korean goral (*Naemorhedus caudatus*) and its cross-species amplification in Caprinae species. *Journal of Veterinary Science*, 11(4), 351-353.

An, J., Min, M. S., Sommer, J., Louis, E., Brenneman, R., Kwon, S. W., Nam, S. S. and Lee, H. (2005). Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the Korean goral (*Nemorhaedus caudatus*). *Molecular Ecology Notes*, 5(2), 421-423.

Beacham, T. D., Pollard, S. and Le, K. D. (2000). Microsatellite DNA population structure and stock identification of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Nass and Skeena Rivers in Northern British Columbia. *Marine Biotechnology*, 2, 587-600.

Boender, J. (1984). Fluorescein-diacetate, a fluorescent dye compound stain for rapid evaluation of the viability of mammalian oocytes prior to in vitro studies. *Gamete Research*, 6(4), 236-240.

Cho, WB., Lee, DH., Choi, IS., Lee, JH.(2018). The complete chloroplast genome of hemi-parasitic *Pedicularis hallaisanensis* (Orobanchaceae). *Mitochondrial ENA B Resour.*, 3(1), 235-236.

DeWoody, J. A. and Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.*, 56, 461-473.

Hauswith, W.W. and Laipias, P. J. (1985). Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. *Nucl. Acids Res.*, 13,

8093-8104.

- Howard, D. J. and Berlocher, S. H. (1998). *Endless forms: species and speciation*. Oxford Univ. Press, 470 pp.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. and Wilson, A. C. (1991). Evolution of cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.*, 32, 12-144.
- Jarne, P. and Lagoda, P. J. G. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, 11, 424-429.
- Jo, Y. S., Baccus, J. T. and Koprowski, J. L. (2018). *Mammals of Korea*. National Institute of Biological Resources, Incheon, 573 pp.
- Kocher, T. D. and Stepien, C. A. (1997). *Molecular systematics of fishes*. Academic Press, 313pp.
- Liu, Z. (2011). *Next Generation Sequencing and Whole Genome Selection in Aquaculture*. Wiley-Blackwell, pp. 3-19.
- Liu, Z. J. and Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquacult.*, 238, 1-37.
- McConnell, S., Hamilton, L., Morris, D., Cook, D., Paquet, D., Bentzen, P. and Wright, J. (1995). Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. *Aquacult.*, 137, 19-30.
- Mohr, L. R., Trounson, A. O. (1980). The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*, 58(1), 189-196.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R. (2003). *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nelson, R. J., Beacham, T. D. and Small, M. P. (1998). Microsatellite analysis of the population structure of a Vancouver Island sockeye salmon (*Onchyrhynchus merka*)

- stock complex using nondenaturing gel electrophoresis. *Mol. Mar. Biotechnol.*, 7, 312-319.
- Smith, C. T., Koop, B. F. and Nelson, R. J. (1998). Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. *Mol. Ecol.*, 7, 1614-1616.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecol. and Evol.*, 15, 199-203.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.*, 17, 6463-6471.
- Wang, Y., Wang, X., Luo, Y., Zhang, J., Lin, Y., Wu, J., ... & Li, M. (2023). Spatio-temporal transcriptome dynamics coordinate rapid transition of core crop functions in 'lactating' pigeon. *PLoS genetics*, 19(6), e1010746.

