

체외생산 소 배반포의 이식에 의한 한우 쌍태 생산

이호준 · 윤종택[†] · 노상호 · 정연길 · 손동수* · 김일화* · 류일선* · 김창근** · 정영채**

한경대학교 동물생명자원학과

Production of HanWoo (Korean Native Cattle) Twin Calves by Transfer of Bovine Blastocysts Produced *In Vitro*

H. J. Lee, J. T. Yoon, S. Roh, Y. G. Jung, D. S. Son*, I. H. Kim*,

I. S. Ryu*, C. K. Kim** and Y. C. Chung**

Department of Animal Life and Resources, Hankyong National University, Kyonggi-do 456-749

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of co-culture system (bovine oviduct epithelial cells; BOEC) and defined culture system (modified TALP; mTALP) on the conception of embryos transferred, and pregnancy and twin birth rates after transfer of fresh or frozen-thawed bovine blastocysts produced *in vitro* were also evaluated. Oocytes from the slaughterhouse ovaries were matured and fertilized using general protocol. The results obtained were as the following. The pregnancy rate after transfer was higher in co-culture group than in mTALP group, but was not significantly different, and there is no difference between fresh embryo group and frozen-thawed embryo group in conception rate. The conception rate was not different whether 3~4 blastocysts or 2 blastocysts transferred into a recipient, but the production rate of twin calves was significantly higher ($p < 0.05$) when 3~4 embryos transferred. The average birth weight of twin calves (24.38 kg) was numerically, but not significantly lighter than that of single calves (26.68 kg).

(Key words : twin calves, *in vitro* production, embryo transfer, freezing and thawing)

서론

가축번식 분야는 가축의 인공수정 기술 개발, 체내 수정란 이식, 체외 수정란 생산, 복제동물 생산 및 형질전환 동물의 생산과 같은 가축생산 기술의 많은 개발과 발전을 이루었다. 그러나 이러한 기술을 산업적으로 활용하기 위해서는 생산효율의 증가와 생산비용의 절감과 같이 해결해야 할 많은 문제가 산재해 있는 것이 현실이다. 생산효율의 증가를

위한 최신 가축번식 기술의 산업적 활용을 위해서는 체외성숙, 체외수정, 체외배양, 동결-융해 및 수정란이식 등의 전과정이 최적상태로 이루어짐으로써 송아지의 생산을 위한 최적체계가 마련되어야 하는데, 체외성숙, 체외수정, 체외배양체계가 체내 배양조건과 같이 최적화되지 못하므로 인하여 체외에서 생산된 체외수정란은 체내수정란에 비하여 동결에 더 민감하여 동결-융해 후 생존성이 취약하며, 수태율도 낮은 것으로 알려져 있다 (Wurth 등, 1994). 또한 내독소를 제거한 고순도의 물과 시약의

*농촌진흥청 축산기술연구소 (National Livestock Research Institute, RDA)

**중앙대학교 축산학과 (Department of Animal Science, Chung-Ang University)

[†]교신저자

사용으로 체세포와의 공배양없이 혈청첨가만으로 소 배반포의 생산이 가능함이 증명되었으나 (Shamsuddin 등, 1993) 성공적인 배양을 위해서는 난구세포 (Goto 등, 1992), 과립막세포 (Critser 등, 1986) 및 난관상피세포 (Fukui와 Ono, 1988)와의 공배양이 널리 이용되고 있다.

소에서 생산비용의 절감을 위한 최선 번식기술의 산업화 적용의 한 방법으로 쌍태를 생산하여 생산비용을 절감하는 방법이 있다. 쌍태 생산방법으로는 다배란 유기 후 수정하는 방법, 수정 후 수정란을 추가 이식하여 쌍태를 생산하는 방법과 수정란을 2개 이상을 동시에 이식하여 쌍태를 생산하는 방법 등이 있다 (Gordon, 1996). 쌍태 생산방법 중 수정란 이식을 활용한 방법은 대리모의 품종에 영향을 받지 않고 동일한 개체를 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다. 특히 체외수정란을 활용하여 쌍태를 생산한다면 보다 저렴한 비용으로 송아지를 생산하게 될 것이다. 소 체외수정란의 이식에 있어서 Goto (1988) 등은 체외생산된 소 배반포를 직접 혹은 동결-융해 후 각각 2~5개와 2~3개를 이식에 사용하였으며 Reichenbach 등 (1992)은 신선체외수정란을 수란우에 각각 2개와 1개씩 이식하여 수태율을 비교하였다. Wurth 등 (1994)은 신선수정란과 동결수정란의 임신율을 비교하였다.

본 연구는 상기 보문의 결과에 준하여 체외수정 후 배양조건, 동결-융해 및 이식 시 수정란의 개수가 수태 및 쌍태분만에 미치는 영향을 분석함으로써 수정란이식의 산업화를 촉진하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채란 및 체외성숙

도축장에서 도축된 한우난소를 항생제 (penicillin G 100 units/ml, streptomycin 100µg/ml)가 첨가된 35℃의 0.85% 생리식염수에 침적, 2시간 이내에 실험실로 운반하여 생리식염수로 3~4회 세척하고 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 2~6 mm의 난포로부터 난포액과 난자를 흡입, 채취하였다.

채취된 난자는 TCM-199 (Gibco BRL Life Technologies, Inc, USA)을 50 µg/ml의 gentamycin

(동신제약, 한국)이 첨가된 기본배양액으로 3~4회 세정하여 상층액 및 이물질을 제거한 후 실험실미경하에서 3층 이상의 치밀한 난구세포층을 가진 난포란을 선별하여 10% 우혈청 (fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA), 5 µg/ml FSH (Sigma, USA), 1 µg/ml estradiol (Sigma, USA) 및 50 µg/ml gentamycin이 첨가된 TCM-199 성숙배양액에 1~2회 세정 후 동 배양액이 0.5 ml씩 분주된 4-well dish (Nunc, Denmark)에 40~50개/well의 난포란을 넣고, 39℃ 5% CO₂ 배양기내에서 24시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

2. 정자처리 및 체외수정

한우동결정액을 38℃의 온수에서 15~20초간 용해한 후 90% 및 45% Percoll gradient (Sigma, USA)를 이용하여 600×g로 20분간 원심분리하여 sperm pellet을 확보하고 이를 3 ml의 sp-TALP (정자처리용 TALP)로 희석하여 600×g로 5분간 다시 원심분리를 함으로 정자세정을 실시하였다. 정자를 처리하는 동안 성숙된 난자는 60 mm dish에 43 µl의 IVF-TALP 미소적을 만들고 3 µl IVF-TALP에 5~7개씩 난자가 함유되도록 하여 IVF-TALP 미소적에 넣어 체외수정을 준비하였다. 정자의 수정능획득은 100 µg/ml의 heparin IVF-TALP에서 15분처리하여 유도하였다. 이후 정자는 2×10⁶개/ml의 농도로 조정하여 IVF-TALP drop에 4 µl씩 주입, 18시간 동안 39℃; 5% CO₂ 배양기에서 체외수정을 유도하였다.

3. 공배양세포(난관상피세포) 준비

도축장에서 채취한 소의 난관을 5℃로 유지하여 실험실로 옮겨 멸균된 수술기기로 결합조직과 지방조직을 완전히 제거하고 70% 알코올로 소독한 후 난관 전체를 가볍게 문지른 다음 난관누두부에서 자궁-난관접합부 쪽으로 3 ml TCM-199을 관류시켜 난관상피세포 (bovine oviduct epithelial cells; BOEC)를 회수하였다. 회수된 난관상피세포는 200×g로 5분간 원심분리 후 BOEC 세포피만 남기고 상층액을 버렸다. 이후 200×g로 5분간 2회 추가 원심분리를 실시, 세정하고 10% FBS 첨가된 배양용 배양액으로 1회 더 원심분리 후 최종 농도가 1×

10⁶cell/ml가 되도록 조정된 후 4-well dish에 0.5 ml씩 분주하여 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양, 단층세포의 형성을 유도하였다.

4. 체외배양

1) 공배양

체외수정된 난자를 TCM-199으로 2~3회 세척한 후 1 ml의 배양배지를 35mm dish에 넣고 1,000 μl의 pipet으로 pipetting을 실시하여 난구 및 과립막 세포를 제거하였다. 이후 수정란을 난관상피세포가 1×10⁶cell/ml의 농도로 조정되어 4-well dish에 배양된 각 well에 신선배양액 0.5 ml를 첨가한 후 15~20개의 수정란을 넣어 공배양을 실시하였으며, 매 48시간마다 0.5 ml의 배지를 제거하고 신선배양액 0.5 ml를 첨가하여 교환하면서 수정 후 7~10일까지 39℃, 5% CO₂, 배양기에서 배양을 실시하였다.

2) 단순배양

수정란의 체외배양을 위해 사용한 m-TALP는 100 mM NaCl (Sigma, USA, 이하 모두 Sigma), 3.2 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na-lactate (60% syrup), 0.5 mM Na-Pyruvate, 2 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1.5 mM Glucose와 2% EAA (essential amino acid; EAA) 및 1% NEAA (non-essential amino acid; NEAA)를 혼합한 것에 1% ITS와 3 mg/ml BSA를 첨가하고 삼투압을 270~280 mOsm, pH 7.4로 조정된 후 0.2 μm의 filter로 여과 멸균하여 준비하였다.

체외 수정된 난자는 세정용 mTALP 배양액으로 2~3회 세정 및 난구세포를 제거한 후 25~30 μl씩 분주된 mTALP 미소적에 소적당 5~10개의 수정란을 넣고 39℃, 5% CO₂, 배양기에서 7~10일 동안 배지 교환없이 배양을 실시하여 배발달을 유도하였다.

5. 동결 및 융해용액의 준비

동결액 (conventional slow freezing solution)은 FBS가 50% 첨가된 D-PBS 보존액에 10% glycerol-

을 첨가하여 제조하였다 (이하 10% glycerol). 융해액은 D-PBS 보존액에 0.3 M sucrose (Sigma, USA)를 첨가한 후 8%, 4%와 0%의 glycerol을 첨가하여 준비하였다.

6. 수정란의 동결

완만동결 (conventional slow freezing)은 체외 수정 후 7~10일에 확장배반포 (expanding blastocyst)로 발육된 수정란을 10% glycerol에 10분간 평형시킨 후 0.25 ml 스트로에 수정란을 1~2개씩 주입하여 -5℃로 냉각된 수정란 동결기의 Cryo chamber에 넣었다. 동결은 -5℃에서 시작하여 5분 동안 정지 후 식빙 처리하고 -30℃까지 -0.5℃/min의 속도로 냉각시킨 뒤 액체질소에 침지하여 실시하였다.

7. 동결 수정란의 융해 및 배양

완만동결로 동결된 체외수정란은 액체질소통에서 수정란이 들어있는 스트로를 꺼내 공기 중에 5초간 방치한 후 35℃의 온수에서 15~20초간 급속융해 하였으며 융해 후 8%, 4%와 0%의 glycerol이 첨가된 배지에서 단계별 5분씩 침지하여 동결보호제를 제거하였으며 동결-융해된 체외수정란은 TCM-199 배양액으로 2~3회 세정한 후 난관상피세포로 단층이 형성된 4-well dish에 10% FBS를 첨가된 TCM-199 0.5 ml를 첨가한 후 12~18시간 동안 배양을 실시하여 확장을 재개하거나 확장된 배반포 또는 탈출배반포를 생존 수정란으로 판정하였다.

8. 수정란 이식

체외배양으로 생산된 한우 배반포기의 수정란은 자연발정이 발현된 번식적령기의 젖소 미경산우에 발정 발현 6~8일령에 직장 검사를 통하여 황체 등급을 진단하고 황체상태가 양호한 수란우만을 선발하여 황체가 존재하는 자궁각 선단에 두 당 2~4개의 수정란을 비외과적 이식방법으로 이식하였다. 임신진단은 이식 후 45~60일에 직장검사 및 초음파 진단을 통하여 확정하였다.

9. 통계처리

본 실험의 결과는 χ^2 -test를 실시하여 각 처리구 간의 유의성을 검정하였다

결과 및 고찰

1. 체외 배양체계에 따른 수정란 이식 후 수태율

난관상피세포 공배양과 단순합성배양시스템인 mTALP 유래 배반포의 이식 후 수태율은 공배양 유래 배반포의 이식 후 수태율이 55.6%로 mTALP 유래 배반포의 12.5%보다 높았으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다 (Table 1). 본 실험에서 제시된 공배양 유래 수정란이식 시 수태율은 Eystone과 First(1989)가 난관상피세포와 공배양하거나 conditioned medium에서 배양 후 이식하여 55%의 수태율을 보고한 결과와는 유사하였으며 단순배양체계의 경우 Larson 등 (1992)이 성장인자를 이용하여 배양한 수정란의 이식 후 수태율 33.3%보다는 다소 낮은 경향을 보였다.

2. 신선수정란과 동결수정란의 이식 후 수태율

체외생산된 소 수정란의 동결 여부가 수태율에 미치는 영향을 조사한 결과, 신선수정란의 경우 60.7%로 동결수정란의 45.0%로 신선란이 다소 높게 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않아 동결 여부가 수태에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Table 2). 본 실험결과는 Agea 등(1998)이 보고한 소 체외수정란의 신선란 이식에 의한 수태

Table 1. Pregnancy rates after transfer of *in vitro* produced bovine blastocyst cultured in two different systems

Culture system*	No. of		
	Embryos transferred	Recipients	Pregnancy (%)
mTALP	17	8	1 (12.5)
Co-culture	21	9	5 (55.6)

*mTALP: modified Tyrode's with albumin, lactate, pyruvate; Co-culture: culture with bovine oviduct epithelial cell.

Table 2. Pregnancy rates after transfer of fresh or frozen-thawed bovine blastocysts produced *in vitro*

Group	No. of		
	Embryos transferred	Recipients	Pregnancy (%)
Fresh	68	28	17 (60.7)
Frozen	66	20	9 (45.0)

율 73.3%보다는 낮았으며, Agca 등 (1994)이 보고한 신선란에서의 수태율 63%와 유사하였으며 Wirth 등 (1994), Fukuda 등 (1990) 및 Takada 등 (1990)보다는 높은 결과였다. 동결-용해 수정란의 수태율은 Kuwayama 등 (1992)와 Ishimori 등 (1992)에 비하여 낮은 경향을 보였으나 Aoyagi 등 (1990) 및 Jiang 등 (1991)의 결과보다는 높은 수준이었다.

3. 수란우에 이식한 수정란의 개수에 따른 수태율 및 쌍태 분만율

체외수정란의 이식 시 수란우에 이식한 수정란의 개수가 수태율과 쌍태 분만율에 미치는 영향을 살펴보면 두 당 3~4개의 수정란 이식 시 수태율이 59.1%로 2개 이식 시의 55.9%보다 다소 높았으나 유의적인 차이는 없었으며 쌍태 분만율은 3~4개의 수정란 이식 시 53.8%로 2개 이식 시의 10.5%보다 유의적으로 높게 나타났다 (Table 3, $p < 0.05$). 본 실험의 결과는 Fukuda 등 (1990) 및 Agca 등 (1995)이 보고한 결과보다는 낮은 수준이었으나 Reichenbach 등 (1992) 및 Takada 등 (1990)보다는 높은 수준이었다. 본 연구의 결과로 미루어 볼 때 쌍태 유기를 목적으로 체외수정란 이식을 활용하고자 한다

Table 3. Pregnancy rate after transfer of 2 or 3~4 blastocysts into a recipient

	No. of		
	Recipients	Pregnancy (%)	Twin (%)
2 ea	34	19 (55.9)	2 (10.5) ^a
3~4 ea	22	13 (59.1)	7 (53.8) ^b

^{ab} Different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

면 3~4개의 수정란을 이식하는 것이 유리할 것으로 판단된다.

4. 분만한 송아지의 생시 체중

체외수정란을 이식하여 분만한 송아지의 생시체중은 단태로 분만한 송아지의 체중이 평균 26.67 kg으로 쌍태로 분만한 송아지의 생시체중 24.25 kg보다 높았으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다 (Table 4). 유사한 연구에서 Xu 등 (1988)은 39.5 kg의 송아지 2두 생산을 보고하였으며, Zhang 등 (1993)은 37.5~54.5 kg의 송아지 5두 생산을 보고하였다. Fukuda 등 (1990)은 단태일 때 27~40 kg과 쌍태일 때 30.3 kg의 송아지 생산을 보고하였다. 최근 체외생산 송아지의 거대태아증후군 등이 논의되고 있는 바 (Young 등, 1998) 체외수정란 유래의 신생축에 대한 지속적인 체중측정을 통해 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Table 4. Weights of single or twin offsprings after transfer of bovine blastocysts produced *in vitro*

	No. of calves	Weights (\pm SD)
Single	9	26.67 (\pm 7.04)
Twin	8	24.38 (\pm 5.40)



Fig. 1. Twin calves derived from *in vitro* produced HanWoo (Korean native cattle) blastocysts transferred into a Holstein recipient.

적 요

1. 공배양체계 및 단순배양체계 유래 배반포의 이식 후 수태율은 공배양군에서 다소 높게 나타났으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다.
2. 동결-융해 후 생존이 확인된 배반포는 이식 후 신선란과 유사한 수준의 수태율을 나타내었다.
3. 체외수정란을 2개 및 3~4개를 이식한 경우 수태율은 수정란의 개수에 영향을 받지 않았으나, 쌍태 분만율은 3~4개의 수정란을 이식했을 경우가 2개 이식 시보다 유의적으로 높게 나타났다.
4. 체외수정란을 이식하여 태어난 송아지를 단태와 쌍태로 구분하여 체중을 측정할 결과 두 집단 생시체중의 차이는 인정되지 않았다.

참고문헌

- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Schaefer DM and Rutledge JJ. 1995. Post-thaw survival and pregnancy rates of biopsied, sexed and vitrified bovine IVF embryos. *Theriogenology*, 43:153.
- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Abas Mazni O, Schaefer DM and Rutledge JJ. 1998. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, 50:147-162.
- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Mazni OA and Rutledge JJ. 1994. Post-thaw survival and pregnancy rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification. *Theriogenology*, 41:154.
- Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M and Ono H. 1990. Effect of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, 34:749-759.
- Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, First NL,

- Eyestone WH, and Northey NDL. 1986. Influence of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryonic development. *Biol. Reprod.*, 34 (Suppl. 1):192.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K and Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocyte matured, fertilized, and cultured with cumulus cell *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42:114-119.
- Fukui Y and Ono H. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Rec.*, 122:282.
- Gordon I. 1996. Controlled reproduction in cattle and buffalos. CAB International, Wallingford, pp. 372-406.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y and Nakanishi Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83:753-758.
- Ishimori H, Miki Y, Kishi M and Saeki K. 1992. Vitricification of bovine embryos. *Theriogenology*, 37:228.
- Jiang JY, Z hong S and Fan BQ. 1991. Calf born after the transfer of frozen-thawed embryos from follicular oocytes matured, fertilized and developed *in vitro*. *Theriogenology*, 35:217.
- Kuwayama M, Hamano S and Nagai T. 1992. Vitricification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 96:187-193.
- Larson RC, Ignatz GG and Cirrie WB. 1992. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the growth cell cycle. *Development*, 115:821-826.
- Reichenbach HD, Liebrich J, Berg U and Brem G. 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 95:363-370.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro*-matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *Theriogenology*, 39:1067-1079.
- Takada N, Ohisa N, Numabe T and Ishikawa Y. 1990. Conception rate after transfer of Japanese Black cattle embryos produced *in vitro*. *Vet. Rec.*, 126: 581-582.
- Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF and Kruip AM. 1994. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology*, 42:1275-1284.
- Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ and King WA. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 94:33-43.
- Young LE, Sinclair KD and Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, 3:155-163.
- Zhang L, Barry DM, Denniston RS, Bunch TD and Godke RA. 1993. Birth of live calves after transfer of frozen-thawed bovine embryos fertilised *in vitro*. *Vet. Rec.*, 132:247-249.

(접수일 : 1999. 12. 1 / 채택일자 : 1999. 12. 20)