

한우 체외수정란 Biopsy 후 PCR 기법을 이용한 성 판정과 성감별 수정란의 이식

김용준[†] · 정구남* · 이해이* · 조성우* · 김용수* · 유일정
전북대학교 수의과대학

Sex Determination of Biopsied Hanwoo Embryos by Polymerase Chain Reaction and Embryo Transfer with Sexed Blastocysts

Y. J. Kim[†], G. N. Chong*, H. L. Lee*, S. W. Cho*, Y. S. Kim* and I. J. Yu

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University,
Chonju, 561-756, Republic of Korea

SUMMARY

This study was carried out to determine the factors on achieving good viability of embryos biopsied for sexing, to investigate pregnancy rate following embryo transfer(ET) with sexed embryos, and to confirm the accuracy for the calves born following ET with sexed embryos by polymerase chain reaction(PCR).

To investigate viability of Hanwoo embryos after biopsy for sexing, fresh and frozen/thawed embryos were biopsied according to different developmental day of blastocysts, different stage of blastocysts, and different biopsy grade and the embryos themselves were incubated for 2 hours in TCM199 after microsection to be evaluated morphologically for recovery as blastocyst.

The results obtained were as follows :

1. The rate of oocytes cleaved *in vitro* and the rate of blastocyst of the cleaved oocytes were 52.5% and 21.6%, respectively. The rate of blastocyst on day 8 was 11.2%, denoting the highest rate during whole culture period posterior to *in vitro* fertilization(IVF)
2. After biopsy for sexing, the viability rate of blastocyst on day 7, 8 and 9 was 75.0%, 88.4%, and 100.0%, respectively and the viability of early, mid, and expanded blastocyst after biopsy was 75.0%, 88.9%, and 91.1%, respectively. The viability rate of fresh and frozen/thawed embryos was 89.9%, 71.4%, respectively. And the viability of expanded, hatching, and hatched blastocyst of frozen/thawed embryos was : 75.0%, 75.0%, and 50.0%, respectively. The viability of embryos according to biopsy grade of 10~20%, 21~30%, and 31~40% was 85.7%, 91.5%, and 71.4%, respectively.
3. Pregnancy rate after transfer with biopsied embryo between fresh and frozen/thawed embryos was 22.6% and 20.0%, respectively.

*전라북도 축산진흥연구소 종축시험소(Livestock Breeding Station, Livestock Development & Research Institute of Chollabuk-Do Province)

[†]Correspondence

4. In comparison between sex by PCR method and sex of calves born after embryo transfer, the accuracy of sex determination was 92.3% (12/13).

(Key words : viability of embryos, pregnancy rate, PCR, Korean cattle, biopsy grade)

서 론

축산경영의 효율성과 가축의 생산성을 제고하기 위해 성을 인위적으로 조절하여 산자를 생산할 수 있다면 축산농가가 필요로 하는 성의 산자를 마음대로 얻을 수 있으므로 성조절된 가축의 생산은 농가의 숙원과제의 하나이다.

성감별 방법은 정자에 대한 성조절로서 X정자와 Y정자를 분리하기 위한 여러가지 방법(Lu 등, 1999; Schenk 등, 1999; Nagao 등, 1993; Brandriff 등, 1986; Kaneko 등, 1983; Binor 등, 1982; Landa 등, 1980)이 시도되어 왔으나 실용적인 적용이 어려워 산업적 이용이 불가능한 상태이나 수정란에 대한 성감별은 정확하면서 실용 가능하다고 인정되어 착상전 수정란 단계에서의 수정란에 대한 성감별에 대한 많은 연구가 수행되었다. 수정란을 이용한 성감별 방법은 세포유전학적 성염색체 검색법(송 등, 1996; Iwaskai와 Nakahara, 1990; King, 1984), 암·수 수정란의 대사활성 차이에 의한 특정효소 역가 측정법(Williams, 1986), 용성특이항원(H-Y항원)을 이용한 방법(유 등, 1999; 박 등, 1996; Utsumi 등, 1993), 수정란의 발달속도 차이에 의한 방법(오 등, 1996; Itagaki 등, 1995), Y염색체 특이 반복 DNA서열을 확인하는 방법(유 등, 1999; Itagaki 등, 1996; Bredbacka 등, 1995; Kudo 등, 1993) 등이 있다. 특히 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 Y specific DNA의 검정은 적은 양의 수정란 세포로부터 용이하고 보다 정확한 성감별을 실시할 수 있게 되었다.

본 연구는 현재 가장 신속하고 실용적인 PCR기법을 이용한 수정란의 성판정과 수정란이식을 통해 계획적인 암수 송아지의 선별 생산 뿐 아니라 유전적 개량을 촉진시키는 데 효과적으로 이용될 수 있는 성감별 기술을 확립하고자 수행되었으며, 아울러 PCR 기법을 이용한 수정란의 성감별에서 생검이 불가피하게 이용되므로 생검된 수정란의

생존성을 높일 수 있는 조건들과 수정란 이식을 통해 생산된 산자의 성을 조사하여 PCR을 이용한 성감별에 대한 정확도를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 한우 체외수정란 생산

1) 난자의 회수 및 체외성숙

도축직후 한우의 난소를 항생제 penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 함유된 25~30°C의 멸균 생리식염수에 넣어 3시간 이내에 실험실로 운반한 후 난소를 37°C의 멸균 생리식염수로 3~5회 세척하였다.

세척후 난소에서 난자를 회수하기 위하여 5 ml 주사기로 7 mm 이하의 난포로부터 난포액을 흡입하였으며 흡입배지는 3% fetal calf serum(FCS)이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Gibco)를 사용하였다.

흡입된 난포액을 petri dish내에 천천히 분주한 후 실험현미경하에서 극히 불량한 난자를 제외한 모든 난자들을 회수하여 흡입배지로 세척한 후 다시 성숙배지인 10% FCS 첨가 tissue culture medium-199(TCM-199, Gibco)으로 2~3회 세척한 다음 성숙배양용 배지 droplet내로 옮겼다.

성숙배양용 배지 droplet은 10% FCS 첨가 TCM-199으로 100 µl를 만들어 mineral oil로 도포하였고 난자를 15~20개씩 넣은 후 38.5°C, 5% CO₂ 조건하에서 20~22시간 동안 체외성숙시켰다.

2) 체외수정 및 수정란 체외배양

한우 동결정액을 37°C에서 30초간 용해한 후 5 mM의 caffeine sodium benzoate(Sigma)와 10 µg/ml의 heparin(Sigma)이 첨가된 세척용 B·O 액(Brackett & Oliphant, 1975)을 이용하여 500 g에서 5분간 2회 원심분리하였다.

원심분리액의 상층액을 제거한 후 10 mg/ml의

BSA가 첨가된 체외수정용 B·O액으로 최종 정자 농도가 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 조정된 후 100 μl 의 정액 droplet을 만들어 mineral oil로 도포하였다.

20~22시간 동안 성숙배양시킨 난자들을 체외 성숙용 droplet에서 꺼내어 체외수정용 B·O액으로 2~3회 세척한 후 100 μl 의 정자 droplet에 넣어 5% CO₂ incubator에서 5~6시간 동안 체외수정시켰다.

체외수정후 난자는 10% FCS 첨가 TCM-199으로 3~4회 세척하여 난자 주위의 정자를 깨끗이 제거하고 체외성숙시 사용된 droplet내로 다시 옮겨 난구세포와 공배양하면서 7~9일간 38.5°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양시켰으며 수정란의 발달을 도와주기 위하여 체외수정후 24시간에 수정란과 난구세포를 분리시켜 주었고, 그후 매 24시간마다 배양액의 1/2을 신선한 배양액으로 교환하여 주었다.

체외수정후 48시간에 난자의 분할율을 조사하였고 배양 후 7~9일에 생산된 배반포율을 조사하였다.

2. 한우 체외수정란의 PCR기법에 의한 성감별

1) 공시 수정란

체외수정란중 배양후 7~9일에 생산된 초기배반포(early blastocyst)단계 이상의 신선수정란을 이용하였고, 일부 수정란은 동결수정란으로서, 수정란 동결은 1.8 M의 ethylene glycol을 사용, 직접익법으로 동결보존하여 용해한 후 TCM 199 배지에서 12시간 배양하여 확장배반포(expanded blastocyst)단계 이상으로 발달한 수정란을 공시하였다.

2) 수정란의 성감별을 위한 primer와 Genomic DNA 준비

성감별에 사용된 bovine Y-specific DNA primer는 BRY.1(Bovine repeat, Y-associated)으로서 그 염기배열은 forward primer는 5'-GGATCCGAGACACAGAACAG-3' reverse primer는 5'-CAAGCTAATCCATGCATCCT-3'이며 크기는 304 nucleotides이었다.

대조군으로 이용된 genomic DNA는 한우 암·

수의 경정맥에서 혈액을 채혈하여 혈액의 buffy coat로부터 genomic DNA purification kit(Promega)를 이용하여 male과 female의 genomic DNA를 각각 분리하였다.

또한 ultraviolet(UV)/spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 genomic DNA농도를 10 ng/ μl 이 되도록 희석한 후 사용전까지 4°C에서 보관하였다.

3) 수정란의 생검 및 배양

체외수정란을 0.2 M의 sucrose가 첨가된 50 μl 의 PBS(Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free) droplet내로 옮겨 Inverted microscope(Nikon)의 micromanipulator(Narishige)에 부착된 bio-cut blade(Feather)를 이용하여 수정란 inner cell mass(ICM)부분의 반대극에서 10~40%를 절단하여 생검하였다.

수정란의 생검후 10~40% 절단된 부분은 PCR 기법을 이용한 성감별에 공시하고 나머지 수정란은 체외성숙배지인 TCM-199 droplet내에서 1~3 시간동안 배양한 후 수정란의 생존성을 관찰하였다.

수정란의 회복 여부 및 생존성은 McEvoy와 Sreenan(1990)의 기준에 의해 blastocoele과 ICM의 명확한 형성 여부로 판단하였다.

체외수정란의 발생일령별, 발생단계별에 따른 생검후 생존성 및 신선수정란과 동결/용해 수정란의 생검후 생존성을 조사하였으며, 동결수정란의 용해후 확장배반포 단계 이상으로 발달한 수정란의 biopsy후 생존성과 수정란의 생검율에 따른 생검후 생존성에 대해서도 조사하였다.

4) PCR 및 전기영동

성감별공시 수정란의 일부 세포는 mineral oil로 도포된 4 μl 의 embryo lysis buffer(ELB : 20mM Tris, 0.9% Tween 20, 0.9% Nonidet, 0.4 mg/ml proteinase K)가 들어있는 PCR tube에 넣고 55°C에서 30분간 처리한 후 thermal cycler (Ericomp)를 이용하여 95°C에서 15분간 처리하였다.

수정란이 들어있는 tube에 PCR을 위한 반응액(10 \times PCR buffer, 25mM MgCl₂, 25mM dNTPs, 10pmol primers, 5IU Taq Polymerase)을 혼합한 후

증류수를 첨가하여 50 μ l가 되도록 하였다.

PCR 증폭은 thermal cycler를 이용하여 94°C에서 3분간 primary denaturation을 실시하였고 denaturation, annealing, extension을 각각 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 35 cycles을 수행하였으며 마지막 extension은 72°C에서 10분간 정치하였다.

PCR 증폭이 완료된 다음 PCR product 10 μ l에 loading dye 2 μ l를 혼합하여 2% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)로 염색하고 UV transilluminator 하에서 관찰하여 304bp band 유무에 따라 수정란의 성을 판정하였다.

3. 수정란 이식

성감별 공시 수정란 세포를 제외한 나머지 수정란을 TCM-199에서 배양한 후 전라북도 축산진흥연구소 종축시험소에서 사육하고 있는 0~3세의 한우와 젖소 68두에 이식하여 신선수정란 및 동결/용해 수정란의 수정란 이식후 수태율을 조사하였으며, 이식전 수정란의 성판정 결과와 성감별수정란 이식에 의한 분만후 송아지의 성을 비교하여 PCR기법을 이용한 한우 체외수정란 성감별의 정확도를 조사하였다.

결 과

1. 한우 체외수정란의 분할율과 배반포율

한우 난소의 난포로부터 난자를 채취하여 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배지로 20~22시간 체외 성숙시킨 후 B·O액으로 처리한 한우 동결정액과 반응시켜 체외수정을 하였고 그후 체외성숙배지에서 배양하여 48시간후 난자의 분할율을 조사한 결과 전체 2,852개의 난자중 1,496개가 2세포기 이상

으로 분할됨으로써 52.5%의 분할율을 나타내었다 (Table 1).

분할된 1,496개의 난자중 체외수정후 7일에서 9일 사이에 생산된 배반포 단계의 수정란은 323개로서 배반포율은 21.6%이었으며(Fig. 1) 체외수정후 7일, 8일, 9일에 생산된 배반포율은 각각 2.5%, 11.2%, 7.8%로서 수정후 8일에 가장 높은 배반포율을 나타내었으며 수정 후 7일에 가장 낮은 배반포율을 나타내었다.

2. 한우 체외수정란의 발생일령 및 발생단계에 따른 생검후 생존율

체외수정후 7일에서 9일 사이에 생산된 배반포기 수정란을 Bio-cut blade를 이용하여 10~40%를 생검한 후 체외성숙배지인 10% FCS 첨가 TCM-199 배지에서 1~3시간 배양하여 수정란의 회복상태를 관찰함으로써 수정란의 생존율을 조사한 결과 생검된 수정란의 생존율은 89.9%이었다(Table 2).

배반포 발생일 7일, 8일, 9일에 생산된 배반포의 생검후 생존율은 각각 75.0%, 88.4%, 100.0%를 나

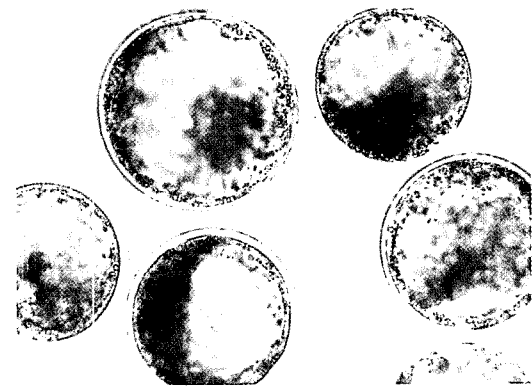


Fig. 1. Hanwoo blastocysts after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture ($\times 200$).

Table 1. Result of *in vitro* fertilization of bovine oocytes and development to blastocysts

No. of oocytes	No. of cleaved oocytes(%)	No. of blastocysts (%)			
		Day 7	Day 8	Day 9	Total
2,852	1,496 (52.5)	38 (2.5)	168 (11.2)	117 (7.8)	323 (21.6)

Table 2. Viability of bovine blastocysts biopsied for sexing according to different developmental days after *in vitro* fertilization

Development day	No. of biopsied embryos	No. of viable embryos(%)
Day 7	8	6(75.0)
Day 8	43	38(88.4)
Day 9	18	18(100.0)
Total	69	62(89.9)

타냄으로써 생검후 생존율은 발생일 9일 수정란에서 가장 높았으며 8일, 7일순으로 높은 성적을 나타내었다.

체외수정후 7일에서 9일 사이에 생산된 초기배반포, 배반포, 확장배반포 수정란의 생검후 생존율은 각각 75.0%, 88.9%, 91.1%를 나타내었으며 확장배반포 단계의 수정란이 초기배반포, 배반포 단계보다 높은 성적을 나타내었다(Table 3).

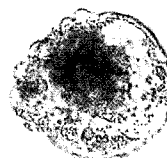


Fig. 2. A biopsied frozen/thawed embryo incubated for 3 hours in TCM-199 after biopsy. Fully recovered blastocoele and trophectoderm($\times 200$).

3. 신선 수정란과 동결/융해 수정란의 생검후 생존율

한우 체외수정란중 배양후 7~9일에 생산된 초기배반포(early blastocyst)단계 이상의 신선수정란과 일부 동결 수정란을 융해하여 10~40%로 생검한 후 잔여 수정란 부분을 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배지에서 1~3시간 배양한 후(Fig. 2) 생존율을 조사한 결과 생존율은 신선수정란이 89.9%, 동결/융해 수정란이 71.4%로서 신선란이 동결/융해란보다 높은 성적을 나타내었다(Table 4).

4. 동결/융해 수정란의 발생단계에 따른 생검후 생존율

한우 체외수정란중 배양후 7~9일에 생산된 배반포기 수정란을 직접이식법으로 동결보존하여 용

해한 후 TCM 199 배지에서 12시간 배양하여 확장배반포(expanded blastocyst), 부화중배반포(hatching blastocyst), 부화배반포(hatched blastocyst) 단계로 발달한 동결/융해 수정란을 Bio-cut blade를 이용하여 10~40%를 생검한 후 나머지 수정란을 TCM-199 배지(10% FCS 첨가)에서 1~3시간 배양하고 나서 생존율을 조사한 결과 생존율은 각각 75.0%, 75.0%, 50.0%로서 확장배반포와 부화중배반포가 부화배반포보다 높은 성적을 나타내었다

Table 3. Rate of viability of bovine embryos biopsied for sexing according to different stages of blastocysts

Stage of embryos	No. of biopsied embryos	No. of viable embryos(%)
Early blastocysts	4	3(75.0)
Blastocysts	9	8(88.9)
Expanded blastocysts	56	51(91.1)
Total	69	62(89.9)

Table 4. Comparison of viability between fresh and frozen/thawed embryos biopsied for sexing

Embryo status	No. of biopsied embryos	No. of viable embryos(%)
Fresh	69	62(89.9)
Frozen	14	10(71.4)
Total	83	72(86.7)

Table 5. Viability of frozen/thawed embryos biopsied for sexing according to different development stages

Stage of embryos	No. of biopsied embryos	No. of viable embryos(%)
Expanded blastocysts	8	6(75.0)
Hatching blastocysts	4	3(75.0)
Hatched blastocysts	2	1(50.0)
Total	14	10(71.4)

(Table 5).

5. 한우 체외수정란의 생검율에 따른 생존율

한우 체외수정란중 배양후 7~9일에 생산된 배반포기 수정란을 inverted microscope의 micromanipulator에 부착된 bio-cut blade를 이용하여 수정란 ICM부분의 반대극에서 10~20%, 21~30%, 31~40%를 절단하여 생검하였다.

수정란의 생검후 10~40% 절단된 부분은 PCR 기법을 이용한 성감별에 공시하고 나머지 수정란은 TCM-199 droplet내에서 1~3시간 동안 배양한 후 수정란의 생존성을 조사하였다.

10~20% 절단된 수정란은 85.7%이었고 21~30% 절단된 수정란은 91.5%로서 가장 높은 성적을 나타내었으며 31~40% 절단된 수정란은 71.4%로서 가장 낮은 성적을 나타내었다(Table 6).

6. 한우 체외수정란의 생검후 수정란이식에 따른 수태율

한우 체외수정란중 배양후 7~9일에 생산된 초기배반포(early blastocyst)단계 이상의 신선수정란과 일부 수정란을 직접이식법으로 동결보존하여 용해한 후 TCM 199 배지에서 12시간 배양하여 확장배반포(expanded blastocyst)단계 이상으로 발달한 동결/용해 수정란을 10~40%로 생검한 후 10~40% 절단된 부분은 PCR기법을 이용한 성감별에 공시하고 나머지 수정란은 TCM-199 droplet내에서 1~3시간 동안 배양한 후 대리모에 이식하여 신선수정란과 동결/용해수정란의 수정란 이식후 수태율을 조사하였다.

신선수정란은 22.6%로서 동결/용해 수정란의 20.0%보다 약간 높은 성적을 나타내었다(Table 7).

7. 수정란의 성감별 정확도

한우 체외수정란을 bio-cut blade를 이용하여 10~40%를 생검한 후 10~40% 절단된 부분은 PCR 기법을 이용한 성감별에 공시하고 나머지 수정란은 TCM-199 droplet 내에서 1~3시간 동안 배양한

Table 6. Viability of embryos biopsied according to biopsy grade

Biopsy grade of embryos	No. of biopsied embryos	No. of viable embryos(%)
10~20%	28	24(85.7)
21~30%	47	43(91.5)
31~40%	7	5(71.4)
Total	82	72(87.8)

Table 7. Pregnancy rates after embryo transfer with biopsied bovine embryos

Group	No. of ET recipients	No. of pregnant(%)
Fresh	53	12(22.6)
Frozen	15	3(20.0)
Total	68	15(22.1)

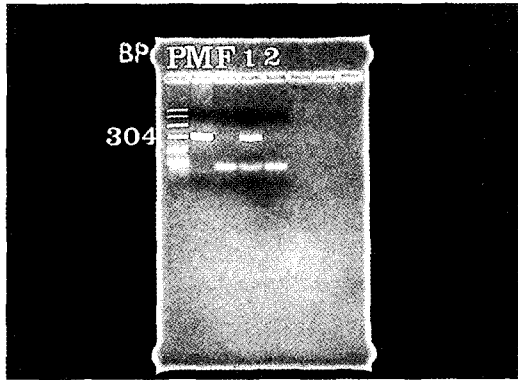


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products from Hanwoo embryos.

P : PCR marker(Molecular size marker)
 M : genomic DNA from blood sample of male cattle, positive control
 F : genomic DNA from blood sample of female cattle, negative control
 Lane 1 : male
 Lane 2 : female

후 대리모에 이식하여 이식전 수정란의 성판정과 성감별 수정란 이식에 의한 분만후 송아지의 성을 비교하여 PCR기법을 이용한 한우 체외수정란 성감별의 정확도를 조사하였다.

Bovine Y-Specific DNA Primer를 이용하여 한

우 체외수정란의 성을 판정하였다(Fig. 3).

이식전 수정란 13개를 성 판정한 결과 8개가 female, 5개가 male이었으며 수정란 이식에 의한 분만후 송아지의 성은 9두가 female, 4두가 male로 태어남으로써 PCR기법을 이용한 한우 체외수정란 성감별의 정확도는 92.3%이었다 (Table 8).

고 찰

한우 난자를 난자의 등급을 상관하지 않고 모두 회수하여 10% FCS가 첨가된 TCM-199에서 20~22시간 체외성숙한 후 동결정액으로 체외수정하여 48시간 후 조사한 난자의 분할율은 52.5%를 나타내었다.

이 결과는 오 등(1996)과 비슷한 성적이었으나 64%의 Izadyare 등(1996)과 Hasler 등(1994), 64.6%의 Nagao 등(1993), 76.1%의 Rehman 등(1994) 보다는 낮았으며 40%의 Bondioli 등(1989)보다는 높았다.

수정후 난자를 TCM 199에서 난구세포와 공배양하면서 7~9일 동안 배양시켜 배반포기로의 발생율은 21.6%로서 23.5%의 오 등(1996), 19.7%의 Nagao 등(1993)과 유사한 성적을 보였고 Bevers와 Dieleman(1997)은 30.1%, Izadyar 등(1996)은 28.2%로서 높은 성적을 보고하였다.

배양 후 배양일령에 따른 배반포 발생율은 체외수정후 7일, 8일, 9일에 각각 2.5%, 11.2%, 7.8%를 나타내어 체외수정후 8일에 가장 높은 배반포 발생율을 보였다.

Rehman 등(1994)은 bovine oviduct epithelium cell(BOEC)과 공배양하여 수정후 7일부터 9일까지 배양일령에 따른 배반포 발생율에서 8일에 45.3%로서 가장 높았으며 Hasler 등(1994)과 Heeres 등(1996)도 배양 8일째에 42.2%, 28.0%로서 배양 7일째

Table 8. Result of sex determination by PCR method in bovine embryos and sex of calves born after embryo transfer

Sex by PCR		Sex of calves		Rate of accuracy(%)
Male	Female	Male	Female	
5	8	4	9	12/13(92.3)

인 27.3%, 19.0%보다 높아 본 실험의 배반포기 발달을 성적과는 다소 차이가 있었으나 수정후 8일에 가장 높은 성적을 나타냈다고 한 결과와는 일치한다.

오 등(1996)은 발생일 7일, 8일, 9일에 각각 11.1%, 8.0%, 4.3%로서 7일에 가장 높았으며 Van Soom 등(1994)은 배양후 7일과 9일을 비교한 결과 7일째보다 9일째에서 더 높은 배반포기 발생율을 보여 본 실험의 8일에서의 가장 높은 성적과 상이한 성적을 보였다.

이와 같이 본 연구와 다른 연구자들의 성적이 다른 것은 소 체외수정란 생산에 있어서 중요한 요인이 되고 있는 난포에서의 흡입된 난자의 질, 체외성숙을 촉진하는 hormone, growth factor 등의 첨가 유무, 배양액의 종류, cell block 현상을 방지하는 공배양세포의 종류, 배양조건 등에 따라 난분할율, 배반포기 발생율이 각각 다른 성적을 보인 것으로 사료된다.

이 실험에서 각기 다른 배반포기 발생일에 따라 한우 체외수정란을 10~40%로 생검한 후 ICM부분을 10% FCS가 첨가된 TCM-199에 1~3시간 배양하였을 때 75~100%의 생존율을 나타내었으며 배반포 발생일 7일, 8일, 9일에 생산된 배반포의 생검후 생존율은 각각 75.0%, 88.4%, 100.0%를 나타내었다.

이 결과는 Itagaki 등(1995)이 보고한 68.4%의 생검후 생존율보다는 높았으며, 한편, Carbonneau 등(1997)은 발생일 5일, 6일, 7일의 체외수정란을 생검, B2-menezo 배지에서 3~5시간 배양하여 발생일 7일에서 93.8%의 생존율을 보고하였는데 이 실험에서 7일의 생존율보다 높았다.

이 실험에서 각기 다른 배반포기의 발생단계에 따라 수정란을 생검한 후 조사한 생존율은 75.0~91.1%를 나타냈으며 확장배반포의 생존율이 91.1%로서 배반포 88.9%보다는 약간 높았으나 초기배반포 75.0%보다는 훨씬 높은 성적이었다.

Wu 등(1995)은 배반포기의 발생단계를 초기, 중기, 후기로 나누어 생검후 생존율을 비교한 결과 각각 89.0%, 94.0%, 93.0%로서 중기 배반포와 후기 배반포가 초기배반포보다 높았다고 보고하였다.

Ricdi 등(1996)은 초기배반포, 배반포, 확장배반포 수정란의 생검후 생존율을 각각 53.2%, 62.4%, 77.2%로 보고하여 본 실험의 생검후 생존율의 성적보다는 전체적으로 낮은 성적이었으나 확장배반포로 진행될수록 생존율이 증가한 것과 확장배반포 단계에서 가장 높은 성적을 나타냈다고 한 결과와는 일치한다.

Itagaki 등(1996)은 확장 배반포의 생검 수정란을 48시간 배양하여 72.0~83.6%의 생존율을, Itagaki 등(1993)은 확장배반포, 부화배반포 단계의 수정란을 24시간 배양하여 77.5~86.3%의 생존율을 보고하였다.

한편, 체내 수정란에 대한 생검후 생존율 조사에서 Machaty 등(1993)은 상실배 단계의 체내수정란을 생검후 배양하여 56.3%의 생존율을 보고하였고, Picard 등(1984)과 McEvoy와 Sreenan(1990)도 각각 67~82%, 61.7~85.6%의 성적을 보고하였는데 후자의 경우는 이 실험에서의 생존율 보다 낮기는 하나 근접한 결과이다.

이 실험에서 한우 체외수정란의 발생일령과 발생단계에 따른 생검후 생존율을 비교해 볼 때 발생일 9일째의 확장배반포 단계의 수정란을 성감별에 공시하여 90~100%의 높은 생검후 생존율이 나타남과 9일째의 확장배반포를 이용하는 것이 수정란 성감별에 대한 효율을 높일 것으로 생각된다.

한우 체외수정란의 신선수정란과 동결/융해 수정란을 성감별을 위해 수정란의 일부를 생검한 후 생존율을 조사한 결과 신선수정란의 생검후 생존율이 89.9%로서 동결/융해 수정란의 71.4%보다 높았다.

수정란을 직접이식법에 의해 동결하고 융해하여 확장배반포, 부화중 배반포, 부화배반포로 발달한 수정란의 생검후 생존율은 각각 75.0%, 75.0%, 50.0%를 나타내어 확장배반포와 부화중 배반포가 부화 배반포보다 높은 성적을 나타내었으나 부화배반포의 실험난자수가 적어 향후 추가실험이 요구된다.

동결/융해 수정란이 신선수정란보다 생검후 생존율이 다소 낮기는 하나 동결/융해 수정란도 생검후 10% FCS 첨가 TCM-199 배지에서 배양하였을 때 ICM과 blastocoele이 명확하게 형성되어 동결/

용해 수정란도 수정란 생검 및 성감별 수정란 이식에 공시해도 좋을 것으로 사료된다.

배반포기 한우 체외수정란을 10~20%, 21~30%, 31~40%의 각기 다른 생검율로 생검한 후 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배지에서 배양하였을 때 21~30%의 생검율에서 91.5%의 생존율을 보여 10~20% 생검율의 85.7%의 생존율보다 약간 높았으며 31~40% 생검율의 71.4%보다는 훨씬 높았다.

이 결과를 보아 수정란의 성감별을 위해 수정란의 일부 세포를 생검할 때 수정란 세포의 30% 이상을 넘지 않는 것이 수정란의 생존성에 좋을 것으로 생각된다. 21~30%의 생검율에서의 생존율이 10~20%의 생검율에서의 생존율보다 높은 것은 이 실험에 사용된 수정란의 숫자가 매우 많은 편은 아니었기 때문에 나타난 결과로 사료된다.

한우 체외수정란의 신선란과 동결/융해란을 생검한 후 생검부분은 PCR기법을 이용한 성감별에 공시하고 ICM부분은 TCM-199에서 1~3시간 배양하여 수정란을 전라북도 축산진흥연구소 종축시험소에서 사육하고 있는 0세에서 3세까지의 한우 및 젖소의 경우에 이식하여 수태율을 조사한 결과 신선란의 경우 22.6%, 동결/융해란의 경우 20.0%의 수태율을 나타내어 신선란에서 동결/융해란보다 약간 높은 수태성적을 나타내었다.

신선 수정란의 생검후 이식하여 수태율을 조사한 결과에서 Utsumi 등(1992)은 38.8%, Itagaki 등(1993)은 43%의 수태율을 보고하였으며, Thibier와 Nibart(1995)는 동결/융해란을 이식하여 28%의 수태율을 보고하였고, Kameyama 등(1996), Sungawa 등(1994), Lewis(1994)는 체내수정란을 이용하여 성감별 수정란을 이식하였는데, Kameyama 등(1996), Sungawa 등(1994)은 생검을 하고 나서 성감별된 수정란을 1.8 M ethylene glycol을 이용한 직접이식법으로 동결한 후 대리모에 이식하여 각각 15.1, 42.1%의 수태율을 보고하였고, 한편, Lewis(1994)는 신선 수정란을 이식하여 56.1%의 수태율을 보고하였다.

상기에서와 같이 본 실험의 성적을 포함하여 다른 연구자들의 수태율이 서로 상이한 성적을 보이는데 이것은 수란우의 가임능력 상태와 수정란 생

산 방법, 동결방법 등에 의한 차이라고 생각된다.

특히 본 실험의 수태율이 낮은 것은 가임능력이 높은 좋은 상태의 수란우는 적었고 불량한 수란우가 많이 이용되었기 때문인 것으로 사료된다.

한우 체외수정란의 일부를 생검, PCR을 이용하여 성을 판정하고 성감별된 수정란을 수란우에 이식한 후 분만한 송아지의 성을 비교하여 한우 체외수정란의 PCR기법을 이용한 성감별의 정확도를 조사하였다.

임신된 소 13두에 이식된 수정란 13개는 PCR기법에 의해 female은 8개, male은 5개로 감별되었으나 male로 판정된 성감별 수정란의 이식 후 분만한 송아지가 암컷으로 태어나 정확도는 92.3%의 성적을 나타내었다.

이 실험에서 male로 감별된 수정란이 암컷으로 확인된 것은 이식 당시 수컷 1개, 암컷 2개의 수정란이 3두의 수란우에 이식이 되었는데 기록상의 잘못으로 실제의 수정란과 다른 수정란이 이식되었던 결과로 사료된다.

Utsumi 등(1993)과 Itagaki 등(1993)은 PCR로 성감별된 수정란을 이식한 후 각각 2두와 3두의 분만 결과에서 모두 100%의 정확도를 보고하였고, Herr 등(1990)과 Kirkpatrick와 Monson(1993)은 각각 분만한 12두를 조사하여 11두가 정확히 감별되어 91.6%의 정확도를 보고하여 본 실험의 성적과 유사하였다. Utsumi 등(1993)과 Itagaki 등(1993)의 100%는 본 실험의 성적보다 약간 높았지만 이는 검사대상 두수가 본 실험두수보다 적어 그 정확도가 높았던 것으로 생각된다.

상기의 결과들을 종합해 볼 때 PCR기법을 이용한 한우 체외수정란의 성감별시 수정후 배양 9일째의 확장배반포 단계의 신선수정란을 사용하는 것이 추천된다는 점, 수정란은 확장배반포와 부화중배반포로 발달한 수정란을 사용하는 것이 높은 생존율을 얻을 수 있다는 점, 10~30%의 생검율로 생검했을 때 생검으로 인한 손상을 최소화하고 생검후 생존율을 가장 높일 수 있다는 점을 확인하였으며, 아울러 한우 체외수정란의 성감별에 PCR을 이용할 때 신속하고 정확한 성감별을 할 수 있음을 알게 되었다.

적 요

성감별에 이용된 체외수정란은 한우 난소에서 채취한 난자를 TCM-199배지(10% FCS첨가)에서 20~24시간 체외성숙시킨 후 B·O액(5mM caffeine, 10 µg/ml heparin)을 이용하여 5×10^6 /ml의 농도로 맞춘 정자와 5~6시간 수정시켰고 난구세포와 공배양하면서 7~9일간 배양하였다. 신선 수정란과 일부 수정란을 동결보존하여 융해한 후 확장배반포 단계 이상으로 발달한 동결/융해 수정란을 이용하여 성감별을 위한 수정란 생검을 수행하였다.

성감별방법은 수정란의 생검후 일부 세포를 추출하여 BRY1 primer를 이용, PCR 처리를 한 후 전기영동으로 304bp band 유무에 따라 암컷과 수컷의 성을 판정하였고 성감별 검정에 이용된 세포를 제외한 나머지 수정란을 전라북도 축산진흥연구소 종축시험소에서 사육하고 있는 한우와 젖소에 이식하였다.

체외수정 후 분할율과 발생일에 따른 배반포율을 조사하였으며 각기 다른 발생일령별, 발생단계별에 따른 생검후 생존율, 신선수정란과 동결/융해 수정란의 생검후 생존율, 동결/융해란의 발생단계에 따른 생검후 생존율, 성감별 수정란 이식후 수태율을 조사하였고, 이식전 PCR기법을 이용한 수정란의 성판정과 성감별수정란 이식에 의한 분만후 송아지의 성을 비교하여 성감별의 정확도를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 한우 체외수정란의 분할율은 52.5%, 배반포율은 21.6%의 성적을 나타내었다.
2. 체외수정란의 배양후 7일, 8일, 9일째 발생일령에 따른 수정란의 생검후 생존율은 각각 75.0%, 88.4%, 100.0%를 나타내었다.
3. 체외수정란의 초기배반포, 배반포, 확장배반포의 발생단계에 따른 생검후 생존율은 각각 75.0%, 88.9%, 91.1%를 나타내었다.
4. 신선수정란과 동결수정란의 생검후 생존율은 신선란이 89.9%로서 동결란 71.4%보다 높았다.
5. 동결수정란의 융해후 발생단계별 생검후 생존율은 확장배반포 75.0%, 부화중 배반포 75.0%, 부화배반포 50.0%를 나타내었다.

6. 수정란의 10~20%, 21~30%, 31~40%의 생검율에 따른 생존율은 21~30%의 생검율에서 91.5%로서 가장 높았다.
7. 신선란과 동결란의 성감별수정란 이식후 수태율은 각각 22.6%, 20.0%를 나타내었다.
8. 수정란의 PCR기법을 이용한 성감별 판정과 성감별 수정란의 분만후 송아지의 성감별에 대한 정확도는 92.3%이었다.

이상의 결과에서 한우 체외수정란의 성감별에 PCR기법을 이용하여 신속하고 정확하게 감별할 수 있다는 점, PCR기법을 이용한 한우 체외수정란의 성감별시 수정후 배양 9일째의 확장배반포 단계의 수정란 이용이 선택된다는 점, 동결수정란의 경우 확장배반포와 부화중배반포로 발달한 수정란이 생검을 위해 추천된다는 점, 또한 10~30%의 생검율로 생검하는 것이 바람직하다는 것을 알게 되었다.

참고문헌

- Bevers MM, Dieleman SJ, Van den Hurk R, et al. 1997 Regulation and moleculation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47: 13-21.
- Binor Z, Rao R, Hans van der Ven, et al. 1982. The effect of albumin gradients and human serum on the longevity and fertilizing capacity of human spermatozoa in the hamster ova penetration assay. *Fertil. Steril.*, 38:222-226.
- Bondioli KM, Ellis SB, Pryor JH, et al. 1989. The use of male specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 31: 91-104.
- Brandriff BF, Gordon LA, Haendel S, et al. 1986 Sex chromosome ratio determined by karyotypic analysis in albumin isolated human sperm. *Fertil. Steril.*, 46:678-685.
- Bredbacka P, Kankaanpaa A and Peippo J. 1995. PCR-sexing of bovine embryos : A simplified protocol. *Theriogenology*, 44:167-176.

- Carbonneau G, Morin N, Durocher J, et al. 1997. Viability of bovine IVF embryos biopsied with micosection or microaspiration technique for sexing. *Theriogenology*, 47:53.
- Hasler JF, Stokes JE and Merton JS. 1994. Comparison of two different populations of BRL cells in a bovine *in vitro* culture system. *Theriogenology*, 41:214.
- Heeres AA, Merton JS, Hazeleger W, et al. 1996. Optimization of sperm/oocyte ratio during *in vitro* fertilization of bovine cumulusoocytes-complexes. *Theriogenology*, 45:266.
- Herr CM, Holt NA, Matthaai KI, et al. 1990. Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. *Theriogenology*, 33:247.
- Itagaki Y, Kimura N, Yamanaka M, et al. 1995. Developmental rate differences and sex of bovine preimplantation embryos generated *in vitro*. *J. Mamm. Ova. Res.*, 12:73-78.
- Itagaki Y, Kimura N, Yamanaka M, et al. 1996. PCR sexing and survival following embryo biopsy-bisection of *in vitro* produced bovine embryos. *J. Mamm. Ova. Res.*, 13:48-51.
- Itagaki Y, Sato S, Shitanaka Y, et al. 1993. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex. *J. Reprod. Dev.*, 39:65-72.
- Iwaskai S, Nakahara T. 1990. Number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. *Theriogenology*, 33:669-675.
- Izadyar F, Colenbrander B and Bevers MM. 1996. Growth hormone stimulates *in vitro* bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development. *Theriogenology*, 45:279.
- Kameyama K, Numabe T, Sekizawa F, Takada N, et al. 1996. Direct transfer of bovine frozen-thawed embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. *Theriogenology*, 45:227.
- Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T. et al. 1983. Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *Fertil. Steril.*, 40:661-665.
- King WA. Sexing embryos by cytological methods. 1984. *Theriogenology*, 21:7-17.
- Kirkpatrick BW, Monson RL. 1993. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *J. Reprod. & Fertil.*, 98:335-340.
- Kudo T, Sato S and Sutou S. 1993. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction : Cloning and characterization of bovine male-specific repetitive DNA. *Reprod. Develop.*, 39:55-63.
- Landa CA, Almouist JI and Amann RP. 1980. Factors influencing Sephadex separation of bovine and ovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 63:277-282.
- Lewis IM. 1994. Splitting cattle embryos commercially : The effects of sucrose, embryo stage and the duration between embryo recovery and bisection. *Theriogenology*, 41:237.
- Lu KH, Cran DG and Seidel GE. Jr. 1999. *In vitro* fertilization with flow - cytometrically - sorted bovine sperm. *Theriogenology*, 52(8):1393-1405.
- Machaty Z, Paldi A, Csaki T, et al. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *Reprod. & Fertil.*, 98:467-470.
- McEvoy TG and Sreenan JM. 1990. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demi-embryos. *Theriogenology*, 33:1245-1253.
- Nagao Y, Saeki K, Hoshi M, et al. 1993. H. Effect of oxygen concentration on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in a protein-free medium *Theriogenology*, 39:273.
- Picard L, King WA and Betteridge KJ. 1984. Cyto-

- logical studies of bovine half-embryos. *Theriogenology*, 21:252.
- Rehman N, Collins AR, Suh TK, et al. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes co-cultured with buffalo rat liver cells. *Theriogenology*, 41:1453-1462.
- Riedi J, Zakhartchenko V, Wolf E, et al. 1996. Effect of embryo developmental stage and quality on the efficiency of *in vitro* produced bovine embryo splitting. *Theriogenology*, 45: 221.
- Schenk JL, Suh TK, Cran DG, et al. 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 52(8):1375-1391.
- Sungawa M, Kurosawa I, Kassahara T, et al. 1994. Direct transfer of bovine frozen-thawed demi-embryos. *Theriogenology*, 41:306.
- Thibier M and Nibart M. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*, 43:71-80.
- Utsumi K, Hayashi M, Takakura R, et al. 1993. Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, 34:25-32.
- Utsumi K, Kawamoto T, Iritani A, et al. 1992. Sex determination of bovine embryos by the polymerase chain reaction using Y-specific primers. *J. Reprod. & Develop.*, 38:35-43.
- Van Soom A, Van Langendonck A, Mahmoudzadeh AR, et al. 1994. Effect of oil quality on *in vitro* embryonic development in the bovine. *Theriogenology*, 41:325.
- Williams TJ. 1986. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology*, 25:733-739.
- Wu GM, Liao HM, Li XF, et al. 1995. *In vitro* development of bovine demi-embryos bisected at early-mid, late-blastocyst stages. *Theriogenology*, 43:357.
- 박영일, 임경순, 한재용, 등. 1996. Y 염색체 특이성 DNA 분리와 단일 H-Y 항체 개발에 의한 토끼의 수정란 성감별에 관한 연구 I. 정소를 항원으로 한 H-Y 항혈청에 의한 토끼 수정란의 성판별. *한국가축번식학회지*, 20:53-63.
- 송시환, 박충생, 송상현. 1996. 염색체분석기법에 의한 소 체외수정란의 성조절, *한국가축번식학회지*, 20:179-190.
- 오성종, 양보석, 임경순. 1996. PCR 기법에 의한 수정란의 성판별과 체외수정란의 발생속도가 성비에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 20: 443-451.
- 유일정, 김용준, 이경광. 1999. 햄스터 H-Y 항체와 중합효소연쇄반응을 이용한 소 수정란의 성감별. *대한수의학회지*, 39(1):189-203.

(접수일: 2000. 10. 10 / 채택일: 2000. 12. 6)