

한우 유래의 체외수정란의 이식후 임신에 관한 연구

김소섭 · 최석화 · 김재명¹ · 이제협² · 김재영² · 박흠대[†]
충북대학교 수의과대학

The Studies on Pregnancy after Transfer to Recipient with Blastocyst Derived *In Vitro* in Korean Cattle

S. S. Kim, S. H. Choi, J. M. Kim¹, J. H. Lee², J. Y. Kim² and H. D. Park[†]

Department of Veterinary Medicine, Chungbuk University

SUMMARY

These studies were carried out to establish an effective *in vitro* embryo transfer methods by analyzing several factors. The base media were TCM-199 solution for *in vitro* maturation(IVM) of bovine follicular oocytes and Fer-TALP solution for *in vitro* fertilization(IVF) and CR1aa medium for *in vitro* culture(IVC). IVC used the fertilized oocytes of 24-hr culture (day 1) after IVF. Embryos were cultured in drop-culture that contained 25 embryos per 10 μ l. Blastocysts cultured for 7 to 9 *in vitro* were transferred to recipients. The results obtained were as follows:

1. The pregnancy rate according to different region of embryo transfer were 33.8%, 48.1%, 45.0% and 35.3% respectively.
2. The pregnancy rate according to the parity of recipient when embryos were transferred to nulliparous (42.9%) was higher than that of 1~3rd parous(36.9%), however there were not show significant difference each other.
3. According to the stage of blastocyst, the pregnancy rate when middle blastocysts (MB) (45.5%) were transferred to recipients were higher than that of late blastocysts (LB) (41.0%).
4. When IVF-derived blastocysts cultured for 7 to 9 day were transferred to recipients, the pregnancy rate was higher 7 day of blastocyst than that of 8 day or 9 day of blastocyst.

The results of embryo transfer according to the regions, the parity of recipient and the development stage showed that blastocyst formed for 7day transferred to nulliparou were higher pregnancy rate than others.

(Key words : bovine, embryo transfer, blastocyst)

서 론

가축의 개량 효과를 높이기 위하여 오래전부터 선발 및 교배법을 이용하여 우수한 형질의 발현

빈도를 증가시키는 노력이 행해졌었고, 형질이 우수한 종모축의 번식 기회를 증가시키기 위한 인공 수정 기술이 보급되었지만, 인공수정 기술은 종모축 중심의 가축개량이라는 한계성이 있다(Ruane,

¹ 포천중문과대학교 생리학교실(College of Medicine, Pochon CHA University)

² 대구대학교 식품 생명 화학공학부(Division of Food, Biological and Chemical Engineering, Daegu University)

[†] Correspondence : E-mail : humdai@taegu.ac.kr

1988). 이를 보완하는 방법으로 수정란 이식 기법이 널리 이용되고 있으며, 수정란 이식 기술이 실용화되기 위해서는 우수한 수정란의 다량 확보가 필수적이다. 따라서 이러한 것을 충족시키기 위해서는 실험실에서 수정란의 다량 생산이 가능한 체외수정란 생산체계의 적용이 적극적으로 검토되고 있다.

수정란 이식에 관한 연구는 소(Seidel, 1981; Wright, 1985; Seidel 등, 1991), 면양(Armstrong 등, 1983) 및 돼지(Day, 1979) 등 여러 축종에 걸쳐 매우 다양하게 이루어졌으며, 특히 우리나라의 소 수정란 이식은 1979년부터 한우에서 비외과적으로 수정란 채취와 이식시험이 이루어졌다.

체내 또는 체외수정란 이식시의 수태율에 관해 Hasler 등 (1992)은 육우에서 경산우는 57%, 미경산우는 49%를 보고하였고, Sediel(1980)은 이식 시술자의 숙련도에 따라 26%에서 67%까지의 수태율을 나타냈다고 보고하였다. 따라서, 수정란 이식 후 수태율에 영향을 미치는 요인으로 수정란의 발육 단계와 질(Linder and Wright, 1983; Humblot 등, 1987), 발정동기화(Looney 등, 1984), 수란우의 신체 충실도(Mapletoft 등, 1986) 및 이식 기술 등의 많은 요인이 관계되는 것으로 보고되어지고 있지만, 아직까지 완벽한 기술체계가 잡혀 있지 않으므로 이에 본 연구에서는 체외에서 성숙된 수정란의 이식을 다각적으로 분석하고 개선하기 위해 이식한 결과를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 배양액

본 연구에 사용된 기초배양액은 난소로부터 미성숙 난포란의 회수용 배지로써 10mM HEPES와 3mg/ml bovine serum albumin(BSA: Sigma, A-9647)이 첨가된 TALP(HEPES-TALP)용액이었다. 난포란의 체외 성숙용 배지는 25mM HEPES가 함유된 TCM 199(Gibco, 12340-030)용액에 0.22mg/ml pyruvate(Sigma, P2256), 10% fetal bovine serum(FBS: Gibco, 26140-079), 1 μ g/ml follicle stimulating hormone(FSH: Sigma, 14H0796)을 첨가한 용액이었다. 체외 성숙된 난포란의 체외수정용

배양액은 6mg/ml BSA(Sigma, A-6003)가 첨가된 TALP(Fer-TALP)용액이었고, 정자처리용 배양액은 10 μ g/ml heparin(Sigma, H3149), 3mg/ml BSA(Sigma, A-6003)가 첨가된 TALP 용액이었다. 한편, 체외 수정된 배의 체외배양용 배양액은 CR1aa(Rosenkrans와 First, 1991)용액이었고, 배발생 단계에 따라 bovine serum albumin (BSA)을 0.3% 또는 fibroblast bovine serum (FBS)을 10% 첨가하였다. 이렇게 제조된 각각의 배양액을 0.22 μ m millipore filter(Millex-GV, Millipore, France)로 여과한 후 적당량을 분주하여 냉장 보관하여 약 2주간 사용하였다. 사용시에는 12시간 이상 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기(Forma)에서 전 배양하여 사용하였다.

2. 난포란 회수

도축된 한우로부터 난소를 수집하여 25mg/ml gentamycin(Gibco, 15750-011)이 함유된 30~33 $^{\circ}$ C의 생리식염수가 들어있는 보온병에 담아, 도축 후 2~4시간 이내 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 2~3회 세척하여 난소에 존재하는 이물질을 제거한 후, 18gauge 주사침이 부착된 1회용 10ml 주사기를 이용하여 직경 2.0~5.0mm의 가시 난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 난포란의 회수용 배지로서는 25mM HEPES와 3mg/ml의 Fraction V첨가 TALP 용액을 이용하였다. 회수한 난포란중 난구세포가 치밀하고 세포질이 균일한 것만(Wiemer 등, 1991)을 실험현미경하에서 선별하여 체외성숙에 제공하였다.

3. 체외성숙

선별된 난포란을 TCM-199용액으로 2회 세척한 후, 35 \times 10mm petri dish (Falcon, 3001)에 mineral oil(Sigma, M-8410)로 피복된 전 배양했던 0.2 mg/ml pyruvate, 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco 26140-079), 1 μ g/ml follicle stimulating hormone 함유 50 μ l의 TCM199(Gibco, 12340-030)용액에 15~20개씩을 넣어 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 난포란의 체외 성숙을 유도하였다.

4. 체외수정

1) 정자의 준비

한우 동결정액 1~2 straw를 실온에서 10초간 방치 후, 37℃ 항온수조에 30초간 침지하여 용해하였다. 용해된 정액을 15ml 원심분리관(Falcon, 2097)에 담겨져 있는 80% percoll 3ml 용액 위에 조심스럽게 놓고, 2,000rpm, 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하였다. 회수한 정자괴를 10 μ g/ μ l heparin과 6mg/ml BSA(Sigma, A9647) 첨가 TALP(Fer-TALP) 용액으로 2회 원심분리(1,000 rpm, 10분)하여 세척 후, 정자 농도가 2.5 \times 10⁶ cells/ml이 되도록 조절하여 체외 수정용 정자로써 준비하였다.

2) 체외수정

형태적으로 난구세포가 확장된 난포란만을 선별하여 Fer-TALP 용액으로 2~3회 세척한 후 체외수정에 제공하였다.

체외수정은 35 \times 10mm petri dish에 mineral oil로 피복된 46 μ l의 Fer-TALP용액에 10~15개씩의 난포란을 넣고, 2 μ l의 heparin(10 μ g/ml)과 최종 정자농도가 1 \times 10⁶ cells/ml이 되도록 미리 준비된 정자 2 μ l를 첨가하여, 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

5. 체외배양

체외수정 후 22~24시간째에 실체현미경하에서 극체의 유무와 관계없이 형태적으로 정상이라고 판단한 것만을 회수하여, bovine serum albumin(BSA)이 0.3% 함유된 CR1aa용액에 2~3회 세척한 후, 미리 준비한 50 μ l 용액에 10~15개씩의 난자를 넣고 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양(day 1)하였다. day 3에 4~8세포기의 배를 10% FBS가 함유된 CR1aa 10 μ l에 배지의 교환없이 배양하였다. day 7과 8에 형성된 배반포 중 원래 투명대의 크기와 같고, 포배강이 50% 이상 형성된 것을 middle blastocyst(MB), 원래의 투명대 크기보다 1.5배 크고 포배강이 100% 정도 형성된 것을 late blastocyst(LB)로 평가하여 실험에 공시하였다.

6. 수정란의 이식

체외배양 기간별로 형성된 배반포란을 10% FBS가 함유된 TCM199 용액을 이용하여 0.25ml

straw에 넣은 후, 약 39℃ 상태로 유지하면서 이식장소까지 3시간 이내에 운반하였다. 수란우로는 경북 김천, 경주, 탐리, 경산 일대의 일반 낙농가에서 사육되고 있는 경산 또는 미경산 Holstein종을 대상으로 선발하였다. 선발된 수란우는 인공수정을 실시하지 않고 발정 7.5일째에 황체가 존재하는 난소 쪽의 자궁각 상단에 비외과적인 방법으로 배반포를 이식하였다. 임신 판정은 이식후 60일경에 재발정이 오지 않은 수란우를 대상으로 직장 검사를 통하여 진단하였다.

7. 통계처리

실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test 를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 각기 다른 지역별 이식에 따른 수태율

도축장에서 도축된 한우의 난소로부터 채란된 난포란을 이용하여 생산된 체외수정란을 각기 다른 지역에 있는 수란우에 이식하여 Table 1과 같은 성적을 얻었다.

B지역에 있어서 106두의 수란우에 이식 후 51두(48.1%)가 수태하였다. B지역에서의 수태율은 A지역에서 나타난 수태율(33.8%)과 D지역 수태율(35.3%)보다 유의하게 높았지만 C지역 수태율에서는 유의차는 존재하지 않았다.

따라서 수정란이식에 있어서 이식 지역의 사육환경 및 사양조건에 따라 수태율이 달라질 수 있다는 것을 알 수 있었다.

2. 수란우의 산차에 따른 수태율

수란우의 산차에 따른 수태율은 Table 2에서 보는 바와 같이 미경산우가 42.9%로써 경산우의 36.6%에 비해 다소 높은 수태율을 보였으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다(P<0.05). 이러한 결과는 오 등(1986)이 보고한 미경산우 46.9%, 경산우 42.9%와 비슷하였고, Hasler 등(1992)에서는 경산우는 57%, 미경산우는 49%라고 발표한 것과 같이 미경산우가 경산우에 비해 영양적인 스

Table 1. Pregnancy rate according to different regions of embryo transfer

Transfer regions	No. of recipients	No. of recipients pregnant	Pregnancy rate(%)
A	222	75	33.8 ^a
B	106	51	48.1 ^b
C	262	118	45.0 ^{bc}
D	133	47	35.3 ^{ac}
Total	723	291	40.2 ^{abc}

^{abc} different superscripts with the same column were different significantly (P<0.05).

A: Gimcheon. B: Gyeongju. C: Tabri. D: Gyeongsan.

Table 2. Effect of recipient parity on pregnancy rate

Parity of recipient	No. of recipients	No. of recipients pregnant	Pregnancy rate(%)
Nulliparous	659	283	42.9 ^a
1~3rd parous	134	49	36.6 ^a
Total	793	332	41.9 ^a

^a same superscripts with the same column were not different significantly(P<0.05).

Table 3. Effect of development stage of blastocyst on pregnancy rate

Development stage	No. of recipients	No. of recipients pregnant	Pregnancy rate(%)
MB	11	5	45.5 ^a
LB	61	25	41.0 ^a
Total	72	30	41.7 ^a

^a same superscripts with the same column were not different significantly(P<0.05).

트레스를 적게 받으며 또한, 미경산우의 자궁이 수정란의 이식에 적합하다는 것을 알 수 있었다.

3. 수정란의 발육 단계별 수태율

이식용 수정란은 발육 단계별로 중기 배반포 또는 후기배반포로서 구분하여 수란우에 이식하였다. 수정란의 발육단계별 수태율은 Table 3과 Table 4와 같다. Table 3에서는 중기 배반포가 45.5%, 후기 배반포 41.0%로서 중기 배반포가 후기 배반포보다 높은 수태율을 나타내었지만 유의한 차이는

인정되지 않았다. 이는 Wright(1985) 등이 보고한 후기 배반포기 37.5%, 중기 배반포기 35.5%의 수태율과 비슷한 결과를 나타내었고, 또한 후기 배반포기 42%, 중기 배반포기 40%의 수태율을 보인 Leibo(1986)와도 유사한 결과를 나타내었다.

한편 Table 4에서는 배반포기가 생성된 날짜에 따른 수란우의 수태율을 나타내었다. 7일째에 생성된 배반포 이식시의 수태율은 43.8%, 8일째 생성된 배반포 이식시의 수태율은 32.9%, 9일째 생성된 배반포의 이식시 수태율은 20.0%로써 7일째

Table 4. Pregnancy rate according to day of development blastocysts

Day of blastocyst	No. of recipients	No. of recipients pregnant	Pregnancy rate(%)
Day 7	146	64	43.8 ^a
Day 8	76	25	32.9 ^a
Day 9	5	1	20.0 ^a
Total	227	90	39.6 ^a

^a same superscripts with the same column were not different significantly(P<0.05).

배반포의 수태율이 다른 두 처리군보다 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다. 이로써 Table 3과 Table 4의 결과로 알 수 있는 것은 7일째 중기 배반포로 생성된 배반포를 이식하는 것이 다른 경우보다 수태율을 높일 수 있다는 것을 알 수 있다. 따라서 수정란 회수는 7일째 중기 배반포로 형성된 것을 회수 일정으로 조정하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 소에 있어서 수정란 이식을 다각적으로 분석하고 개선하기 위해 이식한 결과를 비교 검토하였고 그 결과는 다음과 같다.

1. 채란된 한우 난포란을 이용하여 생산된 체외 수정란을 서로 다른 지역별로 이식한 바 B지역(경주)에서는 106의 수란우에 이식하여 51두(48.1%)가 수태하였고, A지역(김천) 수태율(33.8%)과 D 지역(경산) 수태율(35.3%)보다 유의하게 높았지만, C 지역(담리)에서는 유의차가 존재하지 않았다. 따라서, 수정란이식에 있어서 이식 지역과 사육 환경, 시술자의 숙련도에 따라 수태율이 달라질 수 있다는 것을 알 수 있었다.
2. 수란우의 산차에 따른 수태율은, 미경산우 42.9%로서 경산우의 36.6%에 비해 다소 높은 수태율을 보였으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다(P<0.05).
3. 이식 수정란의 발육단계는 중기 배반포 또는 후기 배반포로서 구분하여 수란우에 이식하였다. 중기 배반포가 45.5%, 후기 배반포 41.0%

로서 중기 배반포가 후기 배반포보다 높은 수태율을 나타내었지만 유의한 차이는 인정되지 않았다. 배반포가 생성된 날짜에 따른 수란우의 수태율은 7일째 생성된 배반포 이식시 수태율은 43.8%, 8일째 생성된 배반포 이식시 수태율은 32.9%, 9일째 생성된 배반포 이식시 수태율은 20.0%로서 7일째 배반포의 수태율이 다른 두 처리군보다 수태율은 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다.

참고문헌

- Armstrong DT and Evans G. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, 19:31-42.
- Broadbent PJ, Stewart M and Dolman DF. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology*, 35:125-139.
- Day BN. 1979. Embryo transfer swine. *Theriogenology*, 11:27-31.
- Hasler JF. 1992. Current status and potential of embryos transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 75:2857-2879.
- Humblot P, Perrin J, Jeanguyot N, Nibart M and Thibier M. 1987. Effect of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology*, 27:240.
- Leibo S. 1986. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 25:166(abstr.).

- Linder GE and Wright RW Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20, 407-416.
- Looney CR, Oden AJ, Massey JM, Johnson CA and Godke RA. 1984. Pregnancy rates following hCG administration at the time of transfer in embryo-recipient in cattle. *Theriogenology*, 21:246(abstr.).
- Rosenkrans Jr CF, Zerg GZ, Schoff PK and First NL. 1990. A simple medium for *in vitro* development of bovine embryos, *J. Anim. Sci.*, 68(Suppl);430 abstr.
- Seidel GE. 1980. Critical review of embryo transfer procedures with cattle. *Fert. And Embryo Develop.* Plenum Press. 323-353.
- Seidel GE. 1981. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*, 211:351-358.
- Seidel GE Jr. 1991. Embryo transfer: The next 100 years. *Theriogenology*, 35:171-180.
- Ruane J. 1988. Review of the use of embryo transfer in the genetic improvement of dairy cattle. *Anim. Breed.*, 56:437-446.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Shultz GA. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30, 330-338.
- Wright JM. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology*, 23:17-29.
- 오성중, 양보석, 김희양, 이근상, 김경식, 스피어스 아우리. 1986. 발정동기화 및 동결수정란 이식에 관한 연구. *한축지*, 3:38-42.
-
- (접수일: 2003. 11. 22/ 채택일: 2003. 12. 20)