韓國受精卵移植學會誌(2005) 第 20 卷 第 2 號
Korean J. Emb. Trans. (2005) Vol. 20, No. 2, pp. 163~168

한우 체내수정란의 성판별 후 이식으로 우수 암송아지 생산

손동수† · 조상래 · 최창용 · 최선호 · 한만희 · 김현종 · 조창연 ·
진현주 · 김영근 · 정연길[1] · N. Saito[2] · S. Kageyama[3] · 최상용[4]
농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장

Production of Superior Cows by Sexed Embryo Transfer Using *In Vivo* Embryos in Hanwoo

D. S. Son†, S. R. Cho, C. Y. Choe, S. H. Choi, M. H. Han, H. J. Kim, C. Y. Cho, H. J. Jean, Y. K. Kim, Y. G. Jeoung[1], N. Saito[2], S. Kageyama[3] and S. Y. Choe[4]

Animal Genetic Resources Station, National Livestock Research Institute, RDA

SUMMARY

.The objective of this study was to produce superior cows by sexual distinction of embryos collected from the donor with pedigree information.

Collected embryos distinguished by biopsy using punching or bisection methods and Loop-mediated isothermal amplification of sex-determined DNA for sexing. Six embryos predicted as female were transplanted to recipients and then 2 pregnant cows were normally delivered of calves at 278 and 285 days after embryo transfer. Birth weights of calves named Barani and Borani were 18 kg and 25 kg, respectively. Adjusted body weights for 90 days were 61.1 kg and 88.8 kg, respectively. Average daily gains were 0.48 kg and 0.71 kg, respectively.

(Key words : Hanwoo, *in vivo* embryo, biopsy, sexual distinction, female)

서 론

국내에서 한우 송아지 가격은 암송아지가 수송아지보다 80~120만원 정도 더 많은 가격으로 거래되고 있다. 그러나 인공수정으로 태어나는 암송아지의 비율은 56.4% 수준이며(이 등, 2001), 수정란 이식으로 태어나는 암송아지의 비율은 47% 수준이다(손 등, 1997).

수정란의 성판별에 의해 희망하는 송아지의 생산과 수정란의 부가가치를 높일 수 있는 기술이 개발되고 있다. 수정란의 성판별 방법으로는 H-Y 항원을 이용하는 방법(Ramalho 등, 2004), Fluorescence *in situ* hybridization(FISH) 방법(Lee 등, 2004), Polymerase chain reaction(PCR) 방법(Hasler 등, 2002; Park 등, 2001; Roschlau 등, 1997; Bredbacka 등, 1995) 및 Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) 방법(Hirayama 등, 2004) 등이 있으며 성 판별 송아지 생산에 활용되고 있다. 그러나 Roschlau 등(1997)은 PCR 방법에서 biopsy 수정란 약 9%가 판정할 수 없었으며, Shea(1999)도 6~18%가 판별이 불가능하였다고 했다. Lee 등(2004)은 FISH 방법의 정확성은 96%이라고 했다.

[1] ET 바이오텍(ET Biotech)
[2] 일본 가축개량센터(National Livestock Breeding Center, Japan)
[3] 북해도 축산시험장(Hokkaido Animal Research Center, Japan)
[4] 경상대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)
† Correspondence : E-mail : sonds@rda.go.kr

수정란의 성판별을 위한 biopsy는 수정란의 생존율에 영향을 미치므로 고도의 기술이 요구된다(Herr와 Reed, 1991; Hasler, 2003). Biopsy 방법으로는 bisection(Hasler 등, 2002; Park 등, 2001; Bredbacka 등, 1995; Thibier와 Nibart, 1995) 방법과 aspiration(Lee 등, 2004; Roschlau 등, 1997; Thibier와 Nibart, 1995) 방법 등이 있으며, biopsy 방법에 따라 성 판별 수정란의 수태율이 다르다(Shea, 1999; Thibier와 Nibart, 1995).

국내에서도 성 판별에 의한 한우 송아지가 생산되었으나 대부분 도축 난소 유래 체외수정란을 성판별 후 이식하였다(김 등, 2003; 김 등, 2000; 오 등, 1996).

따라서 혈통이 등록된 우수한 한우 공란우로부터 회수한 수정란을 간편한 방법으로 성 판별하여 우수한 암송아지를 생산하고자 punching 또는 bisection 방법으로 일부 세포를 biopsy하여 LAMP 방법으로 성 판별 후 암컷 예측 수정란을 이식하여 우수한 암송아지가 분만되었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 공시 수정란

축산연구소 가축유전자원시험장에서 사육하고 있는 한우 중에서 성장률이 1위이며 육질이 39위인 9026호, 성장률이 17위이며 육질이 22위인 2009호, 육질이 58위인 1108호, 그리고 성장률과 육질순위가 없는 5016호 4두를 공란우로 선정하였다.

공란우는 직장검사로 건강한 생식기와 황체를 보유하고 있는 개체를 선발하여 외음부 주위를 세척 및 70% 알코올로 소독하고 progesterone releasing device(CIDR®, InterAg, New Zealand)를 삽입한 후 외음부로부터 끈이 약 5cm 정도 노출되게 절단하여 삽입기간중 이탈을 방지하였다. CIDR® 삽입후 5일째에 난포자극호르몬(Folltropin®-V, Bioniche, Canada)을 1회 40mg씩을 1일 2회 4일간 근육주사하였고, Folltropin®투여 5회째에 dinoprost(Lutalyse™, Upjohn, U.S.A.) 25mg과 6회째에 15mg을 각각 근육주사하였다. 그리고 CIDR®는 Folltropin®투여 7회째에 제거하였다.

Folltropin® 최종 투여후 48시간에 공란우 5016은 KPN 363, 공란우 9026, 1108 및 2009는 KPN 393의 정액으로 2 스토로 인공수정하고 12시간 후에 2 스트로의 정액으로 재수정하였으며, 최종 인공수정후 7일째에 멸균 Foley catheter(Balloon Catheter®, Fujihira Industry Co., Japan)를 이용하여 polyvinyl alcohol(PVA, Sigma)이 0.1% 첨가된 Dulbecco's phosphate-buffered salines(D-PBS, Gibco)로 자궁에서 수정란을 회수하였다. 회수된 수정란 중 1~2등급의 상실기 또는 배반포기의 수정란을 성 판별에 이용하였다.

2. 수정란 Biopsy

성 판별을 위한 수정란 할구의 biopsy를 위하여 punching 방법과 bisection 방법의 2가지 방법을 사용하였으며, 수정란 biopsy는 petri dish(87mm×20 mm, Corning)에 멸균 mineral oil 아래 50 μl의 Ca^{2+}, Mg^{2+} free D-PBS(Gibco) 80 μl의 배양액 미소적에 수정란을 옮기고 micromanipulator(Narishige, Japan)가 부착된 inverted microscope(Olympus, Japan)에서 200배율로 관찰하면서 실시하였으며, Biopsy로 분리된 수정란의 할구수는 4~10개였다.

Punching 방법은 수정란의 투명대를 미세유리 피펫으로 구멍을 낸 후 0.1% PVA가 포함된 D-PBS 배양액에서 2~3회 washing하고 IVMD(FTP, Japan) 배양액에서 18시간 배양하였으며, 구멍이 난 투명대 부분으로 탈출되어 나오는 세포를 절단하여 성 판별에 사용하였다.

Bisection 방법은 수정란을 15° 각의 micro-blade (Bio-cut Blade®, Feather Safety Razor Co., Japan)를 이용하여 수정란의 영양막세포 일부분을 절단 후 성 판별에 사용하였다. Biopsy가 완료된 수정란들은 0.1% PVA가 포함된 D-PBS 배양액에서 2~3회 washing 후 IVMD 배양액에서 18~22시간 배양하였다.

3. 수정란 성 판별

수정란의 성 판별은 진단 킷트(Loopamp Bovine Embryo Sexing Kit, Eiken Chemical Co., Ltd, Japan)를 이용하였다.

무균 실험대내에서 biopsy한 수정란 세포 6 μl를 채취하여 0.25ml의 reaction tube에 분주하고,

진단 킷트에 있는 extration solution 6㎕를 추가 분주하여 실온에서 5분간 혼합하므로서 DNA를 추출하였다.

추출한 DNA 시료 5㎕를 0.25ml의 reaction tube에 채취하여 웅성(male specific reaction, RM Ⅰ) 및 자성(male-female common reaction, RM Ⅱ) 특이 반응액 각각 20㎕에 혼합하고 30초간 vortexing한 후 Loopamp(LA-100, Teramecs, Japan)에서 63℃ 35분, 80℃ 2분간 처리하여 −+는 암컷, ++는 수컷으로 판정하였다.

4. 수정란 이식

성 판별된 수정란은 자연 발정 발현후 6~7일째의 수란우를 직장검사하여 정상적인 생식기와 발정주기 황체를 보유하고 있는 미경산 한우 5두와 2산 한우 1두를 선발하였다.

수란우는 수정란이식전 xylazine hydrochloride (Rompun®, 바이엘코리아, 한국) 9.3mg을 정맥주사하여 진정시키고, lidocaine hydrochloride 100mg을 미추경막외 마취를 실시하였다. 수태율 향상을 위해 개체에 따라 수정란 이식 직전 flunixin meglumine (Banamine®, Schering-Plough Animal Health Corp.) 500mg을 정맥주사하거나 수정란 이식 직후 hCG (Chorulon, Intervet) 1,500IU를 근육주사하였다.

수란우는 경관경유법으로 황체가 존재하고 있는 쪽의 자궁각에 이식하였고, 임신진단은 수정란 이식후 60일경에 직장검사법으로 실시하였다.

5. 분만 송아지 체중 조사

분만된 송아지는 수정란의 성 판별 결과와 일치 여부를 확인하였고, 생시체중과 112~125일령의 체중을 우형기에서 측정하여 90일령 체중으로 보정하고 일당 증체량을 구하였다.

결과 및 고찰

혈통이 등록된 우수한 한우 공란우로부터 회수한 수정란을 성 판별하여 이식한 결과는 Table 1과 같다. 자연발정으로 동기화 된 수란우 6두에 암컷으로 예측되는 수정란을 각각 이식하여 2두가 임신되어 수태율 33.3%를 나타내었다. 수정란 이식 전후 투여된 약품에 의한 수태율은 flunixin meglumine 투여 수란우는 4두중 2두가 임신되었으며, hCG 투여 수란우 2두는 임신되지 않았다.

성 판별된 수정란의 이식 수태율에 대하여 Roschlau 등(1997)은 55.6%로 성 판별하지 않은 수정란의 수태율 53%와 차이가 없었다고 하였으며, Bredbacka 등(1996)은 62.5%의 높은 수태율 보고하였다. 한편, Thibier와 Nibart(1995)는 성 판별을 위한 수정란의 biopsy 방법에 따라 bisection과 aspiration에서 각각 28%와 55%의 수태율을 나타내었다고 하였으며, Shea(1999)는 bisection 49%, aspiration 58%라고 하여 수정란의 biopsy 방법에 따라 차이가 있음을 알 수 있다. 본 연구에서도 수태율이 33.3%로 다른 연구자들에 비하여 낮은 성적을 나타내었다는 것은 수정란의 biopsy 및 이식

Table 1. Result of embryo sexing and transfer in Hanwoo

Embryos	Methods of biopsy	Sex of embryos	Treated Medicine	Diagnosis of pregnant
5016-1	Punching	Female	Flunixin M.	Pregnant
5016-2	Punching	Female	Flunixin M.	Non pregnant
9026-1	Bisection	Female	Flunixin M.	Non pregnant
9026-2	Bisection	Female	Flunixin M.	Pregnant
1108-1	Bisection	Female	hCG	Non pregnant
2009-1	Bisection	Female	hCG	Non pregnant

Flunixin M. : flunixin meglumine 500mg, IV.
hCG : hCG 1,500IU, IM.

Table 2. The parturition of Hanwoo calves derived from sexed embryos

Embryos		Recipients		Calves			
Donor	Sex	Parity	Gestation* length (days)	Name	Sex	Birth weight (kg)	Body weight for 90 days (Average daily gain, kg)
5016	Female	Heifer	278	Barani	Female	18	61.1 (0.48)
9026	Female	Cow	285	Borani	Female	25	88.8 (0.71)

*Gestation length : from the next day of ET to parturition day.

의 기술적인 문제로 추정되며, biopsy 방법에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

수정란 이식 수태율 향상을 위해 수정란 이식 직전에 Schrick 등(2001)과 Purcell 등(2005)은 prostaglandine 분비억제제인 flunixin meglumine을 투여하여 효과를 나타내었다고 했으며, 박 등(2000)과 Nishigai 등(2002)은 hCG를 투여하므로서 황체기능을 증진시켜 수태율을 높였다고 했다.

성 판별된 체내 수정란의 이식으로 태어난 우수한우 송아지의 내역은 Table 2와 같다. 임신된 2두의 수란우는 암컷으로 예측된 수정란을 이식하여 각각 278일과 285일에 정상적인 암컷 송아지를 각각 분만하였다. 분만된 송아지 바란이와 보란이의 생시체중은 각각 18kg 및 25kg이었으며, 90일령 보정 체중은 각각 61.1kg 및 88.8kg으로 일당 증체량은 0.48kg 및 0.71kg이었다. 보란이의 일당 증체량은 바란이와 가축유전자원시험장에서 육성하였던 한우 암송아지의 일당 증체량 0.50kg보다 매우 높은 것은 가축유전자원시험장에서 성장률이 1위인 공란우 9026에서 채취한 수정란이었기 때문인 것으로 사료된다.

김(2004)은 우수한 유전능력을 보유하고 있는 한우를 이용하여 수정란 이식으로 태어난 송아지를 인공수정으로 태어난 송아지와 비교하였을 때에 생시 및 이유시 체중은 차이가 없었으나 그 이후의 증체 및 육질과 관련한 경제형질은 좋은 결과를 나타내었다고 하였다.

적 요

혈통이 등록된 우수한 한우 공란우로부터 회수한 수정란을 간편한 방법으로 성 판별하여 우수한 암송아지를 생산하고자 실시한 결과는 다음과 같다.

회수한 수정란을 punching 또는 bisection 방법으로 biopsy하여 Loop-mediated isothermal amplification법으로 성 판별하였으며, 암컷으로 예측되는 성 판별 수정란을 6두의 수란우에 이식하여 2두가 임신되었고, 수정란 이식후 278일과 285일에 정상적인 암컷 송아지를 각각 분만하였다. 분만된 송아지 바란이와 보란이의 생시체중은 각각 18kg 및 25kg이었으며, 90일령 보정체중은 각각 61.1kg 및

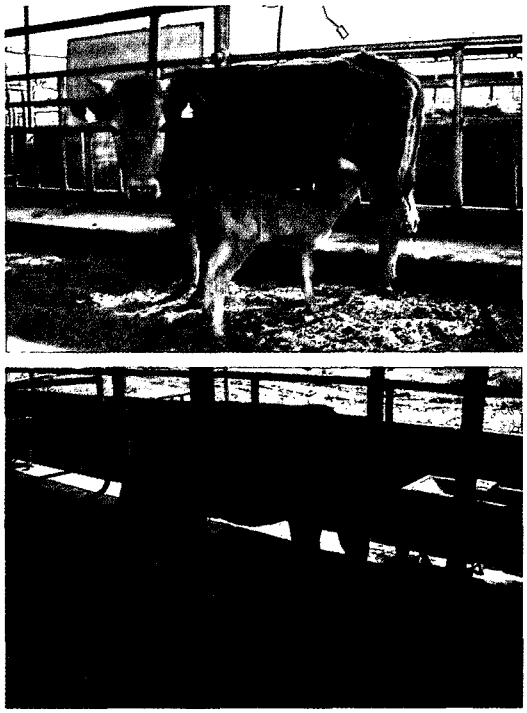

Fig. 1. Hanwoo calves, Barani born in April 17, 2005 (A) and Borani in May 1, 2005 (B), derived from sexed embryos.

88.8kg으로 일당증체량은 0.48kg 및 0.71kg이었다.

감사의 글

본 연구논문 작성에 도움을 주신 축산연구소 한우시험장 최연호 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

Bredbacka P, Kankaanpää A and Peippo J. 1995. PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. Theriogenology, 44(2):167-176.

Bredbacka P, Peippo J and Jaakma Ü. 1996. A simplified protocol for PCR-sexing of bovine embryos: A field trial. Theriogenology Abst., 45(1):218.

Hasler JF, Cardey E, Stokes JE and Bredbacka P. 2002. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. Theriogenology, 58(8):1457-1469.

Hasler JF. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. Animal Reproduction Science, 79(3-4):245-264.

Herr CM and Reed KC. 1991. Micronanipulation of bovine embryos for sex determination. Theriogenology, 35(1):45-54.

Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, Katagiri S, Toen K, Watanabe K, Notomi T, Yamashina H, Matsuzaki S and Minamihashi A. 2004. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology, 62(5):887-896.

Lee JH, Park JH, Lee SH, Park CS and Jin DI. 2004. Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Theriogenology, 62(8): 1452-1458.

Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T and Kaneda Y. 2002. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. Theriogenology, 58(8):1597-1606.

Park JH, Lee JH, Choi KM, Joung SY, Kim JY, Chung GM, Jin DI and Im KS. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. Theriogenology, 55(9):1843-1853.

Purcell SH, Beal WE and Gray KR. 2005. Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. Theriogenology, 64(4):867-878.

Ramalho MFPD-T, Garcia JM, Esper CR, Vantini R, Alves BCA, Almeida Junior IL, Hossepian de Lima VFM and Moreira-Filho CA. 2004. Sexing of murine and bovine embryos by developmental arrest induced by high-titer H-Y antisera. Theriogenology, 62(9):1569-1576.

Roschlau K, Roschlau D, Roselius R, Dexne U, Michaelis U, Strehl R, Unicki P and Rink N. 1997. Over 5 years experience in sexing of bovine morulae and blastocysts during routine embryo transfer. Theriogenology Abst., 47(1): 273.

Schrick FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Wert NE and Wehrman ME. 2001. Administration of a prostaglandin inhibitor immediately prior to embryo transfer improves pregnancy rates in cattle. Theriogenology Abst., 55(1): 370.

Shea BF. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: A six-year retrospective study. Theriogenology, 51(4):841-854.

Thibier M and Nibart M. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. Theriogenology, 43(1):71-80.

김덕임. 2004. 한우 체내수정란의 생산과 이식. 한국과 일본의 소 수정란 이식 실용화 연구현황과 활성화 심포지엄. 농촌진흥청 축산연구소.

pp. 39-50.

김용준, 정구남, 이해이, 조성우, 김용수, 유일정. 2000. 한우 체외수정란 Biopsy 후 PCR 기법을 이용한 성 판정과 성감별 수정란의 이식. 한국수정란이식학회지, 15(3):219-230.

김용준, 이창민, 정구남, 이해리, 조성우, 김용수, 신동수, 홍유미, 유일정. 2003. 성감별된 한우 체외수정란의 수정란 이식. 한국수정란이식학회지, 18(2):97-108.

박수봉, 임석기, 우제석, 김일화, 최선호, 이장희, 김인철, 손동수. 2000. 한우 수란우의 임신율에 대한 hCG 영향과 혈장 요소태질소 수준과의 관계. 한국수정란이식학회지, 15(2):115-120.

손동수, 김일화, 이호준, 서국현, 이동원, 류일선, 이광원, 전기준, 손삼규, 최상용. 1997. 한우 수정란의 동결보존 및 쌍자생산에 관한 연구 Ⅰ. 동결 수정란의 이식과 자우 생산. 한국수정란이식학회지, 12(1):75-89.

오성종, 양보석, 임경순. 1996. PCR 기법에 의한 수정란의 성 판별과 체외수정란의 발생속도가 성비에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 20(4): 443-451.

이덕희, 김상훈, 김정상, 임진규, 여영근, 박영식. 2001. 한우 송아지 성비에 대한 수정년도, 종모우, 농가 및 빈우산차의 효과. 한국가축번식학회지, 25(3):227-230.

(접수일: 2005. 6. 25 / 채택일: 2005. 8. 12)