

한우의 수정란이식 효율성 향상을 위한 생체난포란 채취에 관한 연구

조상래, 강성식, 김의형, 이석동, 이명숙, 양병철[†]
농촌진흥청 국립축산과학원

Study on Ovum-pick up for Improvement of Embryo Transfer Efficiency in Hanwoo Cows

Sang-Rae Cho, Sung-Sik Kang, Ui-Hyung Kim, Suk-dong Lee, Myoung-Sook Lee and Byoung-Chul Yang[†]

Hanwoo Research Institute, Pyeongchang, Kangwondo, 232-950, Korea

ABSTRACT

Commercial applications of OPU/IVP were to produce embryos and calves from high genetic cows. The aim of this present study was to compare the number of recovered oocytes and cultured *In vitro* produced embryos from Ovum Pick-up (OPU). OPU derived embryo production was carried out of oocytes by ultrasonographic guided follicular aspiration and then produced in vitro produced blastocysts by IVP culture system. In result, the rate of recovered oocytes was obtained 612 (57.2%) and 451(73.7) G1+G2 grade oocytes. No difference of recovered rate (51.1~62.1%) was seen in six donor. The rate of cleavage and blastocyst development were obtained 320 (70.9%) and 78 (24.4%) that was 3.3±0.4 cleaved embryo and 0.9±0.2 blastocysts per session. Cleavage rate of OPU oocytes in No. 6 donor was 90.6%, significantly ($P<0.05$) higher than that in the other donors, However, blastocysts was similar (25.8~30.0%). In conclusion, limited numbers of OPU oocytes had competent development when cultured in SOF culture medium

(Key Words : *In vivo* oocytes, OPU, Embryo)

서 론

한우의 생산기반 구축을 위해서는 번식우의 효율적인 관리가 무엇보다 중요한 사항이다. 특히, 한우 암소의 개량과 대량 증식 사업은 한우의 생산성 증대를 통한 농가의 소득 향상 뿐만 아니라 소비자들의 기호성에 맞는 소비자 맞춤형 한우 고기 생산을 위해서도 매우 중요하다. 특히 유전적으로 우량한 암소를 기반한 고급육 생산과 웰빙식 선호 소비자를 위한 다양한 소비패턴에 맞는 고기 생산 시스템 구축을 위해서 다양한 연구가 수행되고 있다. 우수한 유전력을 지닌 공란우의 생산성 향상을 위해서 초음파 유도 질경유 난자탐색 (Ultrasound-guided transvaginal oocytes retrieval, Ovum Pick-up, OPU) 방법은 살아있는 암소의 생체에서 난자검색을 위한 수단으로 사용되는 방법으로서 1988년 소에서 처음으로 수행되었다 (Pieterse, 1988). 이 방법은 체외수정란 생산에 대한 연구와 수정란이식을 위한 상업적인 활용을 위한 기본적인 기술로 사용되고 있다 (Looney 등 199; Hasler 1998; Galli 등, 2000). 반복적으로 사용할 수 있는 체외 생산 기술과 함께 이러한 과정은 유전형질

개선 프로그램에서 우수한 공란우에서 다수의 수정란을 생산할 수 있는 기술이다(Broadbent 등., 1997). OPU 성공 여부는 난자의 회수 효율과 체외수정란 생산을 위한 체외배양 시스템에 따라서 질적으로 우수하고 이식가능한 수정란을 생산하는 것이다. 체외수정란 생산을 위해서는 개체별 또는 소량의 그룹 배양이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 각 개체별 반복채란에 따른 난포란의 회수 효율과 수정란 생산을 위한 체외배양액에 따른 배반포 수정란의 발달율을 조사하여 우수한 유전력을 지닌 공란우의 활용성 증대를 통한 생산성 향상뿐만 아니라 한우 암소의 기반구축을 위한 기초자료로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공란우 선발

한우 공란우는 2015년부터 2016년까지 국립축산과학원 한우연구소에서 사육중인 한우를 선발하여 사용하였다. 공란우

[†] Correspondence: Byoung-Chul Yang
Phone: 82-64-754-5710
E-mail: bcyang@korea.net

의 선발 조건은 유전적 형질이 우수한 개체 중에서 직장 검사에 의한 생식 기관과 발정주기가 정상적이고 비만도(body condition score, BCS)가 2.5~3.0 범위에 해당되고 질병예방을 위한 정기적으로 백신 접종을 실시한 개체를 공란우로 선발하였다.

2. 난포란의 채란

공란우에서 생체 난포란의 채란은 매주 2회 실시하였으며, 미성숙 난포란을 채취하여 체외 수정 후 이식 가능한 배반포 수정란을 생산을 위한 체외배양 실험에 공시하였다. 생체 난포란 채란을 위해서 생체내 난포의 확인을 위해서 MyLabTM30-VETGOLD(Esaote, Genova, Italy), 6.6 MHz convex scanner 탐촉자(EC123; Micro-Convex 9~3 MHz, Esaote, Genova, Italy), 미성숙 난포란을 회수하기 위해서 19 G 주사침을 사용하였다. 그리고 난포란 채란시 혈액의 유입으로 인한 혈액의 응고 방지를 위해서 10 IU/ml Heparin이 첨가된 기본 배양액(TL HEPES medium + 10 IU Heparin)을 사용하여 난포란을 채취하였다. 난포란 채란을 위해서는 보정틀이 설치된 장소에서 실시하였다. 채란을 위해서 7 mg Xylazine HCl 0.2ml (Rompun, (주)바이엘)과 2% Lidocaine(주)대한)을 두당 0.3 ml와 3~4 ml를 정맥 및 미추 1번과 2번 사이에 투여하여 통증을 완화시켰다. 난소는 직장을 통해서 위치를 확인하고 견인하여 질 내에 투입된 탐촉자 선단부에 밀착시켜 초음파상 모니터 화면으로 검은점으로 보여지는 난포를 확인하여 보다 선명하게 보이도록 난소의 위치를 조절하여 난포의 수를 확인하였으며, 그 중에서 채란이 가능한 2~8mm 크기의 난포란을 흡입하였다. 난포란 채란을 위한 압력은 70~75 mmHg 음압을 유지하였다. 이와 같은 방법으로 연속하여 난포란을 흡입하며, 모니터 상에서 난포가 완전히 흡입되는 것을 확인하고, 주사침을 다음 난포로 이동 시켜 반복적인 방법으로 채란하였다. 흡입된 난포란은 실체현미경하에서 난자를 회수하였고, 난포란의 등급 분류는 난구 세포의 부착 정도와 세포질의 균일성에 따라 평가 기준을 Grade I~IV 등급 까지 설정하여 분류하였다. 1등급은 난구세포와 세포질이 균일하고 형태학적으로 정상적인 것 그리고 2등급은 난구세포가 일부 떨어졌으나 방사관층과 세포질이 균일한 것 그리고 3등급은 난구세포가 나화되고 방사관층이 거의 없는 것, 그리고 4등급은 난구세포가 완전히 나화 되고 세포질이 균일하지 못한 것으로 분류하였다. 체외성숙을 위해서 TCM199 (Sigma, U.S.A)를 기본배양액으로 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, U.S.A), 10µg/ml LH (Sigma, U.S.A) 및 35µg/ml FSH (Sigma, U.S.A)를 첨가하여 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 22시간 동안 배양을 실시하였다.

3. 체외수정

체외수정을 위해서 사용된 정액은 한우동결정액(KPN)을 이용하였으며, 정자분리는 BO medium을 이용하여 1,800rpm에서 5분 동안 2회 원심분리 후 Sperm-TALP 배양액에서 1회 원심 분리한 후 IVF-TALP배양액에서 체외수정을 실시하였다. 사용된 정액의 최종농도는 2×10⁶/ml 이었다. 체외성숙된 난포란의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 0.1% PVA (Polyvinyl Alcohol)가 첨가된 D-PBS 배양액에서 약 10초간 vortexing 후 50µl IVF-TALP미소적에 약 12~15개의 체외성숙된 난포란과 정자를 공동 배양하여 수정을 유도하였다.

4. 수정란 체외배양

체외배양에 사용된 수정란은 체외수정 후 체외배양은 synthetic oviductal fluid(SOF)에는 0.5µM sucrose를 첨가하였고 CR1aa 배양액에는 5% FBS를 첨가된 배양액을 사용하였다. 배양액 교환은 배양 후 4일째와 6일째 2회 신선한 배양액을 추가하여 배양을 실시하였다. 수정란 배양조건은 38.5°C 온도에서 5% CO₂, 5% O₂ 그리고 90% 질소가 포함된 배양조건에서 수정란을 배양하였다. 수정란배양은 6-well plate dish(IFP, JAPAN)에서 well 당 50µl 배양액에 15개의 수정된 난자를 넣어서 배양을 실시하였다. 분할율은 체외수정 후 48시간에 확인하였으며, 배반포 수정란 평가는 수정 후 7일째, 8일째 생산된 배반포 수정란으로 하였다.

5. 통계처리

실험결과의 통계적 분석은 SAS package 방법을 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) 과정 적용으로 각 요인간의 Least square means를 구하여 유의성 검정($P < 0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

공란우 6두에서 생산된 난포란의 총 25회 채란을 실시한 결과는 Table 1과 같다. 공란우 6두에서 채란회수는 97회로서 초음파상의 난포란은 1069개중 회수된 난포란 수는 612개로서 평균 회수율은 57.2%의 회수율을 보였다. 각 개체에서 회수된 난포란의 평균은 178±34개로 나타났다. 그 중에서 실험에 공시한 것은 1, 2등급의 난포란을 실험에 사용하였다. 612개의 회수된 난포세포 중에서 G1과 G2의 비율은 451개로서 73.7%의 결과를 보였고, G3등급은 115개의 18.8% 그리고 G4등급은 7.5% 결과를 보였다. OPU 채란의 효율성 중에서 난포란의 사용가능한 외적인 요인들은 채란시 사용되는 펌프의 진공상태의 압력과 시술자의 숙련도 그리고 실험실내에서 작

업능력 등은 난모세포의 품질 뿐만 아니라 채란과 수정란 생산 효율과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고하였다(Scott 등, 1994; Ward 등, 2000; Galli 등, 2000). 난포란 채란 회수에 따른 난모세포의 전체평균은 약 9.1개의 결과를 보였다. Chaubal 등(2007)은 공란우에 CIDR+FSH+LH 처리구에서 11.44개 CIDR+FSH만 처리된 공란우에서 회수된 난포란수는 8.33개의 난포란을 회수하였다고 보고하였다. 이는 본 연구에서는 공란우에 호르몬을 처리하지 않고 발정주기가 정상적인 공란우를 대상으로 난포란을 회수한 9.1개를 회수한 것과 유사한 결과를 보였다. 과배란 처리를 하였을 때 호르몬의 반응 결과로 미루어 볼 때 난소의 발정주기를 인위적으로 유도하

여 회수하는 것보다는 자연적인 발정주기를 지니고 호르몬을 처리하지 않은 것이 더 효과적으로 공란우를 활용할 수 있을 것으로 보인다. Table 2에서는 각 공란우에서 회수된 난모세포를 사용하여 체외성숙과 체외수정을 유도하여 이식가능한 수정란을 생산한 결과이다. 전체적으로 체외성숙에 사용된 난모세포는 451개를 사용하였다. 체외성숙 22시간 후에 체외수정을 유도하여 24시간이 경과한 후 분할된 수정란은 70.9%의 결과를 보였으며, session당 평균 분할된 수정란은 3.3개 였다. 그리고 이식가능한 배반포 수정란은 체외수정후 7~8일째에 생산된 수정란은 24.4%의 결과를 보였으며, 평균 수정란 수는 0.9개 수준으로 나타났다. 개체간의 분할율과 session당 분

Table 1. Comparison on grade of OPU - derived oocytes different in Hanwoo donors

No. of donor	No. of session	No. of follicle aspirated (Mean±SD)	No. (%) of recovered OPU-oocytes	No. (%) of oocyte quality		
				G1+G2	G3	G4
1	16	211(13±1.8)	108(51.1)	83(76.9)	16(14.8)	9(8.3)
2	14	198(14±2.0)	112(56.6)	76(67.9)	28(25.0)	8(7.1)
3	18	174(9.7±1.3)	108(62.1)	85(78.7)	16(14.8)	7(6.5)
4	13	136(11±4.1)	72(52.9)	50(69.4)	14(19.4)	8(11.1)
5	16	141(8.8±1.3)	83(58.9)	58(69.9)	20(24.1)	5(6.0)
6	20	209(10±2.2)	129(61.7)	99(76.7)	21(16.3)	9(7.0)
Total	97	1069(178±33.46)	612(57.2)	451(73.7)	115(18.8)	46(7.5)

Table 2. Effect of *in vitro* embryo produced of OPU- derived oocytes in different Hanwoo donors

Donors	No. of IVM oocytes	No. (%) of developed to			
		Cleavage	Mean±SD per OPU	Blastocyst	Mean±SD per OPU
1	83	62(74.7) ^b	3.8±1.0	18(29.0)	1.1±0.9
2	76	53(69.7) ^{bc}	3.7±1.0	14(26.4)	1.0±0.6
3	85	62(72.9) ^b	3.4±0.7	16(25.8)	0.9±0.6
4	50	41(82.0) ^{ab}	3.2±1.0	12(29.2)	0.9±0.8
5	58	42(72.4) ^b	2.6±0.6	12(28.5)	0.6±0.6
6	99	60(90.6) ^a	3.0±0.7	18(30.0)	0.9±0.6
Total	451	320(70.9)	3.3±0.4	78(24.4)	0.9±0.2

^{a,b} Within a column, means without a common superscript differ($P<0.05$)

Table 3. Effects of different culture medium on cleavage rate and embryo development of OPU- derived oocytes

Medium	No. of used oocytes	No. (%) of Cleavage (Mean±SD)	No. (%) of blastocyst (Mean±SD)
CR1aa	109	84(77.1) (9.3±0.8)	22(26.2) ^a (2.4±0.7)
SOF	114	89(78.0) (9.8±1.2)	33(37.1) ^b (3.6±0.9)

^{a,b} Within a column, means without a common superscript differ($P<0.05$)

활율에서는 1번 개체에서 유의적으로($P<0.05$) 높은 발달율을 보였으나 배반포 수정란 발달율에 있어서는 유의적인 차이는 보이지 않았다. OPU 유래 난자에서 발생한 체외수정란의 비율은 체외수정 후 7일째 약 20~30% 수준으로 보고 되고 있는 이들 수정란 중 약 50%는 동결과 이식이 가능한 수정란으로 보고 하였으며 (Holm and Callesen, 1998), 본 연구에서 생산된 배반포 수정란의 발생률 20.6%와 유사한 결과였다. OPU 유래 난포란의 수정란 생산을 위해서는 개체별 배양시스템 구축이 무엇 보다 필요하다. 회수되는 난포란 수가 적기 때문에 수정란의 생산 효율이 저하되기 때문이다. 생산된 수정란 중 이식 가능 수정란의 효율성을 높이기 위해서는 수정란의 질적인 개선 (Hasler 등, 1987; Abe 등, 2004; Lopez 등, 2005; Sakagami 등, 2010)과 수란우의 관리상태 상태 (Hasler 등, 1987; Sreenan과 Diskin, 1989), 시술자의 자질 (Scheider 등, 1980), 등에도 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 수정란의 발달율 결과를 보면 우선 분할율에서는 평균 70.9%, 배반포 발달율은 24.4%의 결과를 보였다. 이러한 결과는 Ward 등(2000)이 보고한 난포란의 1등급 기준 보고에서 분할율은 75.4% 그리고 배반포 발달율 21.7% 과 유사한 결과를 보였으며, 등급간에는 유의적인($P<0.05$) 차이를 보였다. 배반포 생산율에 있어서 등급별의 차이는 OPU 채란시 소실되는 난구세포의 부착비율에 따라 수정율에 차이가 있는 것으로 보이며, 또한 채란된 난포란의 그룹배양과 개별 배양간의 차이에 따라서 수정율과 배반포 발달율에도 유의적인 차이가 있었다 (Ward 등, 2000). 수정란의 분할율에 있어서는 6번개체가 다른 개체들 보다 유의적인($P<0.05$) 차이를 보였으나, 배반포 발달율에 있어서는 25%~30% 수준의 결과를 보였다. OPU session 당 분할율은 3.3 ± 0.44 개 였으며, 배반포 발달율에 있어서는 0.9 ± 0.2 개의 결과를 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다. Table 3에서는 OPU 유래 난포란의 체외성숙에 따른 분할율과 체외발달율을 서로 다른 두 종류 배양액에서 조사한 결과이다. CR1aa 배양액에서는 분할율이 77.1% 그리고 SOF 배양액에서 분할율은 78.0% 의 결과를 보여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 체외발달율에 있어서는 수정 후 7일째 생산된 배반포 발달율은 CR1aa 배양액에서는 26.2%, SOF 배양액에서는 37.1로서 SOF 배양액에서 수정란의 발달율이 유의적으로($P<0.05$) 높은 발달율을 나타내었다. 따라서 OPU 방법에 의한 체외수정란 생산과 수정란이식을 위해서 그리고 우수한 공란우의 선발과 적절한 영양수준에 맞는 적절한 사양관리와 그리고 체외수정란 생산을 위한 배양시스템을 구축하는 것이 무엇보다 필요할 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 논문은 농촌진흥청연구사업 초음파유도 생체채취 난포란에 의한 동기우 생산기술개발 : (PJ01029103)의 지원에 의해 이루어진 것임

REFERENCES

- Abe H, Shiku H, Aoyagi S and Hoshi H. 2004. *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J. Mamm. Ova. Res.* 21:22-30.
- Broadbent PJ, Dolman DF, Watt RG, Smith AK and Franklin MF. 1997. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. *Thriogenology* 47:1027-1040.
- Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PJ, Rezamand PTX and Yang X. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU - IVP system. *Thriogenology* 67:719-728
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R and Lazzari G. 2000. Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Thriogenology* 55:1341-1357.
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Foote RH. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Thriogenology* 27:139-168.
- Hasler JF. 1998. The current status of oocytes recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on bovine. *J. Anim. Sci.* 76(Suppl.3):52-74.
- Holm P and Callesen H. 1998. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod. Dev. Nutr.* 38:579-594.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocytes retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Thriogenology* 41:67-72.
- Lopez AS, Larsen LH, Ramsing N, Lovendahl P, Raty M, Peippo J, Greve T and Callesen H. 2005. Respiration rates of individual bovine *in vitro*-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction* 130:669-679.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruij TA and Taverne MA. 1988.

- Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30:751-762.
- Sakagami N, Yamamoto T, Akiyama K, Nakazawa Y, Kojima N, Nishida K, Yokomizo S, Takagi Y, Abe H, Suzuki C and Yoshioka K. 2010. Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films. *J. Reprod. Dev.* 56:279-284.
- Scheider HJ, Castleberry RS and Griffin JL. 1980. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* 13:73-85.
- Scott CA, Robertson L, de Moura R.T.D, Paterson C and Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet. Record*, 134:440-443.
- Sreenan JM and Diskin MG. 1989. Effect of a unilateral or bilateral twin embryo distribution on twinning and embryo survival rate in the cow. *Biol. Reprod.* 87:657-664.
- Ward FA, Lonergan P, Enright BP and Boland MP. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54:433-446.
-
- Received August 18 2017, Revised September 13, 2017,
Accepted September 15, 2017