

수정란 이식에서의 채란 및 이식

황 우 석

1. 수란우의 관리

가. 수란우의 선발

수란우군을 선발하는데 있어서 먼저 우군의 질적 평준화와 경제적 유용성을 고려하여야 한다. 공란우와 달리 혈통이나 능력을 기대할 필요가 없기 때문에 이식성적에 큰 영향을 미치는 수태능력과 산자관리 능력이 입증된 질병발생 경력이 없는 젊은 소가 수란우로 이용되어야 한다. 일반적으로 種의 차이는 별로 중요하지 않으나 순종보다 교잡종의 수태능이 더 좋으므로 실시목적에 적합한 형태의 수란우를 선발하기 위하여 다음과 같은 사항을 고려하여야 한다.

- 1) 적어도 1회 이상 정상발정주기를 유지해야 한다.
- 2) 2회 이상 인공수정하여 수태되지 않은 경력이 없어야 한다.
- 3) 건강하고 질병에 강하며 임신에 장애가 되는 질병이 없어야 하며 난산경력이 없어야 한다.
- 4) 체격이 크고 보육능력이 높아야 한다.
- 5) 연령이 10세 이하이어야 한다(임신유지능력의 저하때문에 10세 이상은 사용하지 않는다).

이와같은 사항을 고려해 볼때 가장 이상적인 수란우로서는 건강상태가 양호하며 정상발정주기를 보이는 약간 여윈 편인 15개월령 정도의 처녀우나 임신한 처녀우가 적당하다. 그 이유는 분만후 60일 정도에 이식가능한 상태로 되어 난산여부와 기타 수태

능을 확인할 수 있기 때문이다. 수란우의 수는 공란우 1두당 6~10두 정도 확보하는 것이 바람직하다.

나. 수란우의 발정동기화

수정란 이식을 위해서는 공란우와 수란우의 발정 차이가 ± 24 시간 이내일 때 높은 수태율을 얻게 되므로 발정동기화된 수란우를 선발하는 것이 중요하다. 발정동기화된 수란우 선발을 위해서는 수백마리의 자연발정 성주기의 우군에서 공란우와 같은 성주기의 소를 고르거나 $PGF_2\alpha$ 를 이용, 공란우와 발정 일자를 인위적으로 일치시키는 방법이 있다. 대다수의 경우 $PGF_2\alpha$ 나 $PGF_2\alpha$ 유사체 혹은 synchro-mate B를 사용하여 발정동기화를 시킴으로 수란우를 준비한다. 수란우가 수정란 이식시기에 황체가 축진되었다면 임신률은 자연발정우의 경우와 유사하다.

수란우의 발정동기화를 위한 일반적인 3가지 방법은 다음과 같다.

1) 수란우의 황체를 촉진하고 동일측에 $PGF_2\alpha$ 나 유사체를 투여한다. 발정은 48~96시간 후에 일어난다(평균 약 60시간 정도).

2) 황체의 여부에 관계없이 모든 수란우에 $PGF_2\alpha$ 를 투여한다. 11일 후에 같은 처치를 반복한다. 성행동이 2~3일 사이에 최고조에 달한다. 반응을 보이는 수란우들은 두번째 $PGF_2\alpha$ 주입시에 발정주기의 중기에 있는 경우이다. 발정주기의 첫 5일내에 있어 첫번째 투여에 반응을 보이지 않는 수란우들은 주기의 중·후반기에 이르게 되는 두번째의 투여에 반응하게 된다.

3) Synchronate B를 삽입하고, 수반물질을 근육내로 주입한다. 9일후 이식물을 완전히 제거한다. 대부분의 수란우들이 2~3일 후에 발정을 보이게 된다 (평균 45시간).

공란우의 처치에 의해 이식가능한 난이 평균 7개 정도가 회수되므로 공란우 당 6~10두의 수란을 준비하는 것이 적절하며, 수란우는 공란우보다 하루정도 일찍 PGF₂α를 투여해야만 한다. 대부분의 공란우는 성선자극호르몬의 처치로 인해 PGF₂α 투여후 36~60시간(평균 42시간)에 발정을 보이는 반면, 대부분의 수란우는 48~96시간(평균 60시간)에 발정을 나타내기 때문이다.

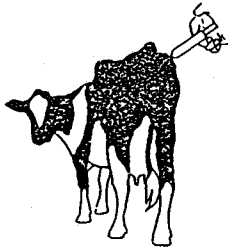
2. 수정란 이식

수정란을 이식하는 세가지 방법이 있는데 두 종류

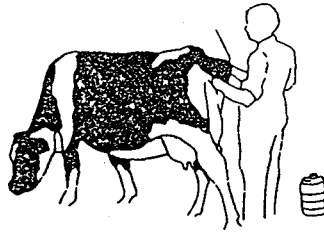
는 수술적 방법이며 다른 한가지는 비수술적 방법이다. 수술적 방법은 가장 높은 임신율을 보여준다. 그러나 술자에 따라 수술적, 비수술적 방법이 비슷한 결과를 보이는 경우도 있다.

일반적인 소의 수정란이식에 쓰이는 첫번째 방법은 전신마취법이다. 숙련자들이 있다면 이 방법은 믿을만하다. 그러나 좋은 설비와 적임자의 보조, 숙련된 술자의 필요 등이 이 방법의 실용성을 제한하고 있다.

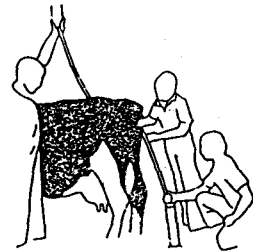
수정란 이식의 두번째 기법은 국소마취를 실시하여 소가 서있는 상태로 견부를 수술하는 방법이다. 이 방법은 농장이나 목장에서 사용되어질 수 있다. 임신율은 전신마취법에 비해 약간 떨어진다. 그러나 이식과정이 훨씬 빠르다는 장점이 있다. 이 방법의 문제점은 상처없이 자궁각을 노출시키는데 어려움이 따르며 추운날씨나 목장환경이 좋지 못한 곳에서



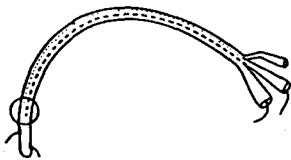
FSH를 이용한 공란우의 과배란 처치



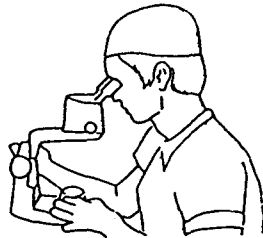
인공수정(과배란 처리후 5일경)



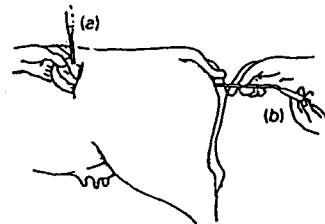
수정란의 비외과적 회수 (인공수정후 6~5일경)



수정란의 회수를 위한 Foley catheter



수정란의 검색 및 분류



수란우로의 수정란이식 (a) 외과적 (b) 비외과적

그림 1. 과배란처리된 공란우로부터의 수정란의 비외과적 회수와 수란우로의 수술적 및 비수술적 이식의 단계들. (Hunter, R.H.F.(1982) Reproduction of Farm Animals. New York, Longman.)

의 수술이라는데 있다.

세번째 수정란이식 방법은 자궁경관을 통한 비수술적 이식법이다. 일반적으로 많이 사용되나 보다 어려운 기술적 숙련도가 필요한 과정이다.

가. 검부를 통한 수술적 이식

직장검사로 황체의 위치를 확인한 다음 동측의 경부의 털을 깎고 물과 비누로 세척한 후 소독을 실시한다. 절개할 예상부위를 따라 2% procaine을 60ml 정도 주사한다. 술자는 소독후 약 15cm 정도의 피부를 절개하고, 근층을 분리하고 복막을 절개한다. 술자는 절개창을 통하여 대략 절개부의 25cm 후방에 위치하는 난소를 찾아 황체를 촉진한다. 자궁각의 광인대를 손으로 잡아 당겨서 자궁각을 노출시킨다. 자궁광인대는 자궁각의 정면에 위치한다. 노출된 자궁각의 전방 1/2 부위의 벽을 무딘 주사침을 사용하여 천공한다. 외경 1.5mm의 작은 유리관에 0.1ml 정도의 배지를 사용하여 보조자는 보존용기에서 수정란을 꺼낸 후 자궁의 내강안으로 피펫을 사용하여 수정란을 밀어넣는다. 수정란이 강내로 확실하게 들어갔는지의 여부는 약간의 숙련도가 요구된다. 그후 절개부위를 봉합한다. 숙련된 술자의 경우 약 15분 정도가 소요된다.

나. 비수술적 이식

미근부의 털을 깎고 세척한 후 술자의 소독과 경막외마취가 요구된다. 0.25ml의 French straw와 sheath를 ethylene oxide gas로 멸균하여 준비한다. Straw는 Cassou gun에 꼭 들어맞게 하기위해 약 1cm 정도를 자른다. 수정란은 1ml tuberculin 주사기를 이용하여 끝부분에 플러그를 가진 straw 내로 흡입한다. 수정란과 배지는 다음과 같은 방법으로 흡입한다. 먼저 2cm 정도의 배지를 흡입하고 0.5cm 정도의 air bubble을 만든 후 2.5cm 정도의 수정란을 포함한 배지를 흡입하고 다시 다른 air bubble층을 만든다. 그후 straw는 첫번째의 column과 마찬가지로 배지를 흡입한다. 수정란이 들어있는 straw를 이식시에 장착하고 plastic sheath를 씌운다. 시술자는 한

손을 직장에 집어넣어 난소상의 황체의 위치를 확인한다. 보조자는 수란우의 음순을 벌리고 이식기를 음순이나 질의 후부에 닿지 않은 채로 질내로 삽입한다. 대부분의 수정란은 발정 후 6, 7 혹은 8일경에 이식되므로 특별히 처녀우의 경우 경관이 팽단혀있는 상태에서 이식기가 발정기의 그때보다 경관을 통과하기가 무척 어렵다. 일단 경관을 통과하면 이식기는 황체가 존재하는 동측의 자궁각으로 집어넣는다. 실제로 자궁의 분지는 경관의 1~2cm 앞부분에서 시작되므로 Cassou gun은 이식하려는 자궁각으로 즉시 향하여져야 한다. 이식하기 전에 자궁각을 들어 끈게 퍼, 이식기의 끝부분이 자궁각의 선단부까지 들어가게 하여 천천히 이식한다. 일단의 저항감이 느껴지면 수정란이 밀려나간 것이며 이때 이식기를 뺀다. 경험있는 시술자의 경우 약 1분 정도가 소요된다. 이 방법에서 접할 수 있는 문제점들은 처녀우의 경우 단혀있는 경관을 통과하기가 어렵다는 점과 자궁내막에 손상을 입히지 않고 비교적 자궁각 깊숙히 수정란을 이식해야 하며, 비숙련자의 경우 동일한 날에 여러번을 이식하면 팔이 쉽게 피로해질 수 있다는 점 등을 들 수 있다. 상당한 기술을 가진 경험자가 높은 임신율을 얻기위해 절대적으로 필요하다. 사실상, 수술적 방법에 비해 조금 낮은 수태율을 나타내나 시술자의 기술정도에 따라 거의 유사하게 나타나기도 한다.

1) 비수술적 이식시 필요기구

- 수정란 이식기(Cassou gun)-0.25ml 및 0.5ml용
- 외동-수정란이식기 위에 씌우는 플라스틱 sheath sheath cover-외동위에 씌우는 비닐로 질내통과시 감염요인 제거
- 수정란 장착용 스트로-0.25ml 및 0.5ml용

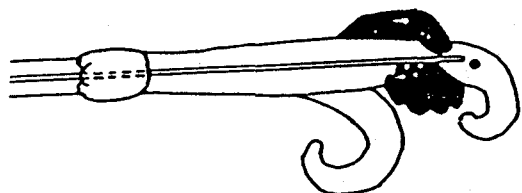


그림 2 비수술적 이식시의 수정란의 이식위치.

3. 수정란의 동결 및 융해 (Embryo Freezing & Thawing)

수정란을 초저온하(액체질소중 -196℃)에서 보존하면 세포내의 효소활성, 세포호흡, 대사, 발육, 증식 등을 완전히 정지시키고 생리활성을 최소한으로 줄이는 것이 가능하여 장기보존이 가능하다. 포유류에서의 동결보존 및 융해에 의한 산자생산은 1971년에 Whittingham에 의해 마우스에서 최초로 성공하였으며 소에서는 Wilmut와 Rowson이 1973년에 소 배반포를 DMSO 첨가에 의해 액체질소에 보존후 융해 및 이식을 실시하여 산자를 얻은 이후로 수많은 성공예가 보고되었다. 최근에 동결융해수정란의 비의과적 이식을 통한 산자생산율이 높아지면서 동결보존에 대한 중요성이 높아지고 있다. 수정란동결의 장점은 1) 반영구적인 보존의 가능; 2) 육우의 경우 공란우부터 년중 채란하여 수란우의 번식계절에 일괄적으로 이식이 가능; 3) 수란우만 확보된다면 충분한 수정란의 공급이 가능; 4) 멸종에 직면한 품종의 소의 번식가능; 5) 이식하고 남은 수정란의 보존 등이 있으며 단점으로는 1) 고가의 동결장비구입; 2)우수한 품질의 수정란만이 동결가능; 3) 10% 정도의 수정란은 동결 및 융해시 손상을 받는다는 점들이 있으나 동결보존에 의한 장점들이 단점에 의한 손실을 상쇄하고도 남는다.

가. 동결수정란의 선택

수정란의 등급을 excellent, good, fair, poor의 4등급으로 나누고 excellent 및 good으로 판정한 것만을 동결에 사용한다.

나. 완충액

보통 20%의 fetal calf serum(FCS)를 첨가한 phosphate-buffered saline(PBS)을 사용한다.

다. 동결보호제(cryoprotectant)첨가

1)동결보호제의 역할 : 동결과정에서 생기는 세포내의 수분의 빙정화에 의한 탈수와 단백질의 변성을

방지하고 수정란에 대해서는 무독성인 물질을 사용한다.

2)비투과성 동결보호제(PVP, sucrose) : 삼투압차이로 인해 세포내 수분을 탈수하지만 세포내에는 침투하지 않는다.

3)투과성 동결보호제(glycerol, DMSO, ethylene glycol) : 세포내 탈수 및 세포내에 침투하여 세포질을 보호하는 역할을 한다.

4)동결보호제 첨가방법

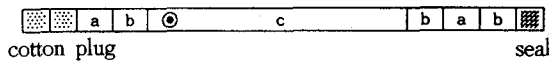
a. DMSO 6단계 희석방법 : 완충액내에 DMSO를 0.125M, 0.25M, 0.5M, 0.75M, 1M, 1.25M의 6단계로 첨가한 후 25℃에서 수정란을 각각의 단계마다 5분씩 정치시켜 순차적으로 이동시킨 다음, 최종 1.25M 내에서 20분간 유지한 후 냉각, 동결을 개시한다.

b. Glycerol 5단계 희석법 : 완충액내에 glycerol을 0.18M, 0.33M, 0.57M, 0.88M, 1M의 5단계로 첨가한 후 25℃에서 수정란을 각각의 단계마다 5분씩 정치시켜 순차적으로 이동시킨 다음, 최종 1M 내에서 30분간 유지한 후 냉각·동결한다.

* 이 밖에도 학자별로 동결보호제의 종류 및 첨가방법이 다양하다.

라. 동결전 수정란의 straw의 장착

수정란이 봉입후에도 실제현미경하에서 관찰이 가능하고 양단부에 붙지 않도록 양쪽으로 공기(air bubble)을 넣는다.

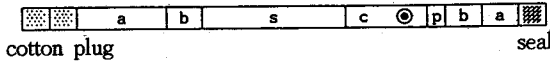


- a. 동결배지
- b. 공기층
- c. 수정란+동결배지

그림 3. 동결을 위한 수정란의 straw내 장착.

* 직접이식(direct transfer)을 위한 장착법 : 아직 확립되어 있지는 않으나 최근 동결보호제 제거과정을 거치지 않고 동결정액과 마찬가지로 동결수정란의

straw를 용해후 바로 이식기에 장착하여 수란우에 이식하는 직접이식법이 많은 연구자들에 의해 연구되고 있다. 직접이식의 경우 아래의 그림과 같이 straw를 장착한다.



- a. PBS배지
- b. 공기층
- c. 수정란+동결배지
- p. 파라핀 요일
- s. sucrose 완충액

그림 4. 직접이식을 위한 수정란의 straw내 장착.

마. 냉각·동결장치

주로 alcohol 및 액체질소를 냉매로 이용한 computerized freezer가 쓰인다.

바. 식빙(seeding)

식빙이란 과냉각상태에서의 큰 빙정발생으로 인한 수정란의 손상을 막아주고 잠열발생에 의한 급격한 온도상승을 막기위해 미리 작은 빙정을 강제로 만들어주는 과정으로 정액동결의 경우 강제식빙을 실시하지 않아도 양호한 생존성이 얻어지는 반면 수정란의 경우 세포질 함량이 많고 세포수가 많으며 투명대라는 특수한 막을 가지기 때문에 이 과정이 반드시 필요하게 된다. 최근에는 -7℃에서 실시하는 것이 보편적이며 이 온도에서 10분간 정치시키는 것으로 식빙과정이 끝나게 된다.

1) 식빙방법의 종류

- a. 질소탱크내에서 얼린 겹자로 straw를 집어 빙정 형성을 관찰한다.
- b. 냉기를 straw 표면에 내뿜는다.
- c. straw에 가벼운 진동을 준다.

사. 냉각속도

현재 주로 쓰이고 있는 방법은 다음과 같다

- 1)실온에서 -1℃/min으로 식빙온도(-7℃)까지 냉각시킨다.
- 2)-7℃에서 10분간 식빙과정을 거친다.
- 3)-30℃까지 0.3℃/min으로 냉각시킨다.
- 4)액체질소에 침적한다.

* 최근 보고에 의하면 식빙전의 냉각속도는 큰 문제가 되지 않는 것으로 알려져 있다.

아. 보존기간

위의 과정을 거쳐 액체질소 중에 보관하는 수정란의 보존기간에 대한 확실한 보고는 없으나 방사선폭량 측정에 의한 간접계산에 의하면 200~1,000년 정도가 지나도 큰 변화는 없다고 생각되고 있다. 물론 액체질소의 손실 및 용기의 개폐가 빈번한 경우는 장기적인 보존이 불가능하게 된다.

자. 용해 및 동결보호제의 제거

- 1) 37~38℃의 수조에서 15~20초간 실시한다(액체질소통에서 수조로의 이동이 2초이상 걸릴 경우는 이동시 작은 액체질소 box를 이용하여 상온으로의 노출을 줄인다).
- 2) 동결보호제를 첨가할 때의 역순으로 행하거나 osmotic buffer인 0.5/1.0M의 sucrose를 이용, 단계를 줄여(1~4단계) 희석을 실시한다.

차. 유리화동결(Vitrification)

고가의 computerized freezer를 필요로 하지 않고 시간을 단축하기위해 비교적 고농도의 동결보호제를 이용하여 동결하는 급속동결법으로 빙정이 형성되지 않고 동결후 용액이 마치 유리와 같은 구조를 갖게 되므로 유리화동결(vitrification)이라 불린다. 이러한 유리화동결에 의해 빙정에 의한 세포손상 및 냉각중 용액의 삼투압 상승에 의한 장애를 방지하는 것이 가능하다. Rall 등이 1985년에 마우스 수정란의 유리화동결에 처음으로 성공하였으며 소에서는 Massip 등이 1986년에 첫보고가 있었다. 유리화동결은 투과성 동결보호제를 고농도로 포함하고 있으므로 수정란에 독성작용을 보이는 것과 배반포의 경우

생존율이 떨어지는 것이 보완해야할 점으로 보고되어 있다.

4. 체외수정(In-vitro Fertilization)

생체내에서 일어나는 수정과정을 체외에서 인위적으로 재현시키는 일을 체외수정이라 한다. 체내에서 일어나는 과정은 난관내에서 일어나는 정자의 생리적 변화, 난자의 생리적 변화 및 정자와 난자간에 발생하는 상호작용으로 나눌 수 있다. 이러한 수정 과정은 체내에서 일어나는 연속적인 과정이기 때문에 현미경적 관찰이 어렵지만 체외수정은 이의 관찰을 용이하게 한다. 또한 수정과정에 미치는 요인과 수정란의 발달에 미치는 요인 등 수정을 지배하는 요인규명에 중요한 수단이 된다.

이나 체외배양에서 일어나는 정자의 변화를 말한다.

수정에 쓰이는 정자는 초창기 체외수정에 많이 이용되었던 교미후 회수한 정자, 정장을 제거하고 일정시간 배양하여 수정능획득한 것으로, 사람이나 대부분의 가축에서 이용되는 사출정자, 사출정자의 채취가 어려운 설치류의 경우 성숙한 웅축을 도살하여 정소상체 미부에서 정자를 채취하고, 체외에서의 일정시간 배양을 통해 수정능을 획득하는 정소상체 정자 및 최근 소에서 주로 사용하는 것으로, 연구자에 따라 수정능획득방법이 조금씩 다른 동결정자 등이 있다.

수정능획득 정자 준비시 동물종마다 배양시간, 배양액의 종류, pH, 배양온도, 첨가제의 효과가 다르기 때문에 많은 반복실험을 통해 각 동물종에 알맞은 조건으로 정자준비체계를 잡아야 한다.

표 1. 체외수정과 산자생산에 성공한 동물종

동물종	체외수정	연구자	산자생산
토끼	+	Thibault 등(1954)	+
마우스	+	Whittingham(1968)	+
사람	+	Edwards 등(1969)	+
원숭이	+	Gold 등(1973)	-
랫트	+	Miyamoto 등(1973)	+
개	+	Mahi 등(1976)	-
소	+	Iritani 등(1977)	+
돼지	+	Iritani 등(1978)	+
양	+	Bondioli 등(1980)	+
염소	+	Hanada (1985)	+

가. 체외수정의 방법

1) 정자의 준비

정자는 수정능획득(capacitation) 과정을 거쳐야만 수정이 가능하다. 정자의 수정능획득이란 난자의 투명대와 난황막을 통과하여 수정할 수 있는 능력을 얻는 것을 말한다. 이것은 자성생식도관에서 수시간 체류하면서 정자가 받게되는 변화이며, 기능적으로는 침체반응을 유발하기 위한 준비로 자성생식도관

2) 난자의 준비

난자는 감수분열 중기 I에서 발달이 정체되어 있다가 배란시기가 되면 성숙을 재개하여 중기 II단계까지 분열을 하며 배란된다. 이 시기에 수정이 되면 제 2극체를 방출하고 비로소 수정란이 된다. 수정률을 높이기 위해서는 세포질과 핵성숙이 이루어진 중기 II상태의 난자를 준비해야 하고 이 난자가 퇴화되기 전에 수정이 이루어져야 한다. 이용하는 난자는 자연배란되거나 과배란 처리후 회수한 난자 및 난소 표면의 미성숙난포(소에서는 3~8mm)에서 채취한 것 등이 있다. 일반적으로 다수의 난자를 저렴하게 얻기 위해 난소에서 채취한 미성숙 난자는 배양시 배양온도, 배양액의 종류, 첨가제의 종류, pH, 배양시간, 난구세포의 부착정도, 공배양유무 등에 따라 성숙률이 달라지므로 적절한 체계를 잡아야 한다.

3) 체외수정

체외수정방법에는 적당한 농도로 희석된 정자 부유액내에 난자를 도입하는 방법과 난자가 준비된 배양액내에 적절히 전처리한 정자부유액을 소량 첨가하는 방법이 있다. 첨가된 정자수가 너무 많으면 다

정자침입증(polyspermy)이 일어날 수 있으므로 정자수를 적절하게 조절해야 한다. 또한 너무 오랫동안 수정시키면 수정률이 저하되기 때문에 수정배양시간을 적절히 조절해야 한다.

4) 체외배양

소의 수정란은 이식할 수 있는 단계인 배반포까지 자라는데 수정후 7~8일 정도가 걸린다. 그러나 체외에서 배양시 발생되는 8~16 cell block을 극복하지 못하면 더이상 난분할이 진행되지 않는다. 이러한 block현상을 극복하기 위한 방법으로는 ① 난구세포, 과립막세포, 난관상피세포, 영양막세포 등의 공배양을 이용, ② 양난관, 생쥐난관 등의 조직배양을 이용, ③ 배양액의 조성을 변경, ④ 여러 첨가제들의 사용 등이 있다.

이렇게 생산된 배반포는 발정동기화된 수란우에 이식하여 산자를 얻거나 동결보존한 후 적절한 시기에 수란우에 이식하여 산자를 생산한다.

나. 체외수정의 실용적 측면

생체내에서 성숙된 난자의 체외수정은 원래 수정의 기본적 연구를 위해 개발되었으나 최근에 사람의 불임문제 등의 치료법으로써 임상적으로 쓰인다.

소에 있어서 임상적으로 적용하는 부분은 난관폐쇄의 경우, 자궁내막 질병, 유전자 주입에 응용, 난자의 등급판정에 응용 및 실험실적 연구에 응용 등이 있다.

5. 수정란의 성감별 및 쌍자생산

성감별에 의한 수정란이식은 회수된 수정란을 미세조작을 통해 二分 또는 하나의 할구만을 생검(biopsy)후 염색체 검사에 의해 성을 판별하고, 나머지 부위는 체외배양후 동결 또는 체내이식하여 원하는 성의 산자만을 생산하는 것을 말한다. 또한 수정란 이식의 매력 중의 하나는 바로 쌍자생산이다. 쌍자생산은 수정란이식시 2개의 수정란을 이식하는 방법, 인공수정에 의해 임신된 수란우에 1개의 수정란

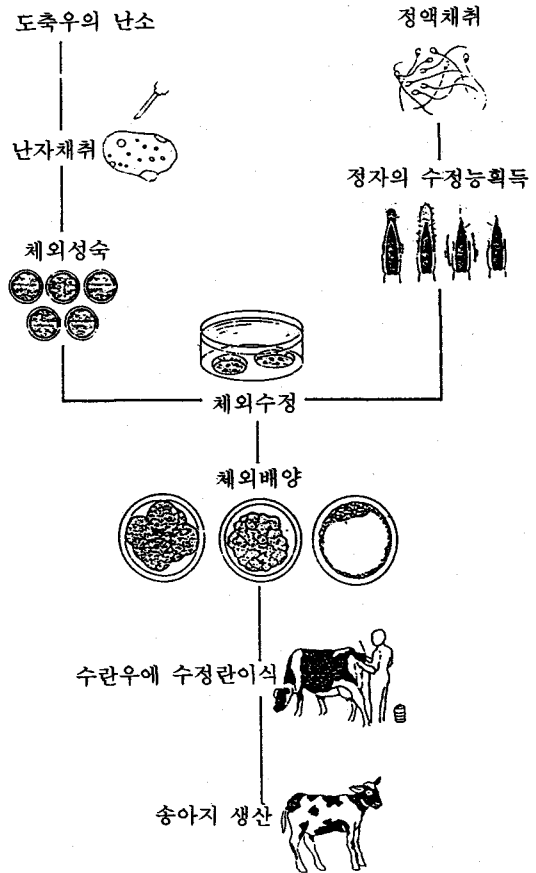


그림 5. 시험관 송아지의 생산개요.

을 다시 이식하여 쌍자를 얻는 방법 그리고 수정란의 인위적 분할 후 이식하여 일란성 쌍자를 얻는 방법 등이 있다.

특히 젖소에서 고기값이 소독의 중요한 부분을 차지하고 있는 우리나라에서는 성별에 관계없이 쌍자생산은 매우 중요하다고 볼 수 있으며, 이에 대한 연구가 국내에서도 수행된 바 있다.

쌍자생산으로 인한 잇점은 다음과 같다.

첫째, 분만두수에 대한 산자수의 증가를 얻을 수 있다. 일본의 경우 '86~87년 사이에 106두의 수란우가 164마리의 송아지를 생산했다. 쌍자생산율은 54.7%였다. 각종 비용 또한 하나의 수정란 이식과 별 차이가 없었으므로 경비가 절감되었다.

둘째, 생산송아지의 체중증가를 들 수 있다.

일반적으로 쌍자는 체중이 정상보다 미달인 경우가 많으나 체격이 작은 한우의 수정란을 Holstein 등의 체격이 큰 수란우에 이식했을 경우 정상적인 한우 송아지보다도 큰 쌍자를 얻을 수 있어 모체의 혈통보다 체격이 큰 송아지의 생산도 가능하다. 즉, 모체보다 유전적으로 큰 품종의 동결정액을 사용하여 인공수정을 실시할 경우 더 큰 수란우에 수정란 이식을 행함으로써 난산을 극복할 수 있다.

셋째, 고능력의 형질을 지닌 소의 두수를 증가시킬 수 있다. 공란우의 신중한 선발을 통해 쌍자를 생산할 경우 고능력우를 단기간에 다수 생산할 수 있다.

이와같은 장점에 반하여 아래와 같은 기술적인 문제들이 남아 있다.

첫째, 수란우의 유산율이 증가할 수 있다.

통상적으로 인공수정에 비해 수정란이식에 의한 쌍자생산의 경우 유산이 다발하는 것으로 알려져 있다.

둘째, 분만송아지의 사고율이 증가할 수 있다.

조산, 질식사, 허약, 기형 등의 사고가 쌍자생산 시 높게 나타난다.

셋째, 프리마틴(Freematin)의 발생이다.

이성 쌍자의 경우 Freematin이 발생하기 때문에 이식전 성감별 등의 발전된 기술이 요구되고 있다.

6. 소 수정란의 핵이식

소 수정란의 핵이식은 실험을 위한 유전적으로 동일한 산자의 생산 뿐만 아니라 우량품종에서 동일한 유전자형을 지닌 개체를 단기간에 대량으로 육종, 증식 및 개량생산하는 측면에서 매우 유용한 분야이다. 그 효과는 핵이식의 반복을 통해 수많은 우수개체의 핵을 체외배양한 다수의 난포란에 이식하여 다수의 복제동물체를 생산가능하게 하며 인위적 성지배와 더불어 축산분야의 생산성을 현저히 향상시킬 수 있다. 필요사항은 동일한 핵들을 공급할 수 있는 공핵란과 이를 이식할 수핵란 및 세포융합 후 체외배

양과 체내이식에 의한 산자생산기술 등이다.

가. 수핵난자의 준비

난소의 미성숙난자를 채취하여 TCM 199 배지에서 24시간동안 성숙배양시켜 metaphase II의 난자를 준비한다. 준비된 성숙난자의 난구세포를 완전히 벗겨낸 후 제 1극체가 보이는 것만을 선별하여 실험에 사용한다. 이후 수핵란을 미세조작도립현미경에 장착하여 절개용 피펫과 고정용 피펫사이에 위치시킨 후 마찰에 의해 문질러 투명대를 절개한다. 미세조작시 난세포질의 손상을 최소화하기 위하여 $7.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 의 cytochalasin B를 첨가시킨다.

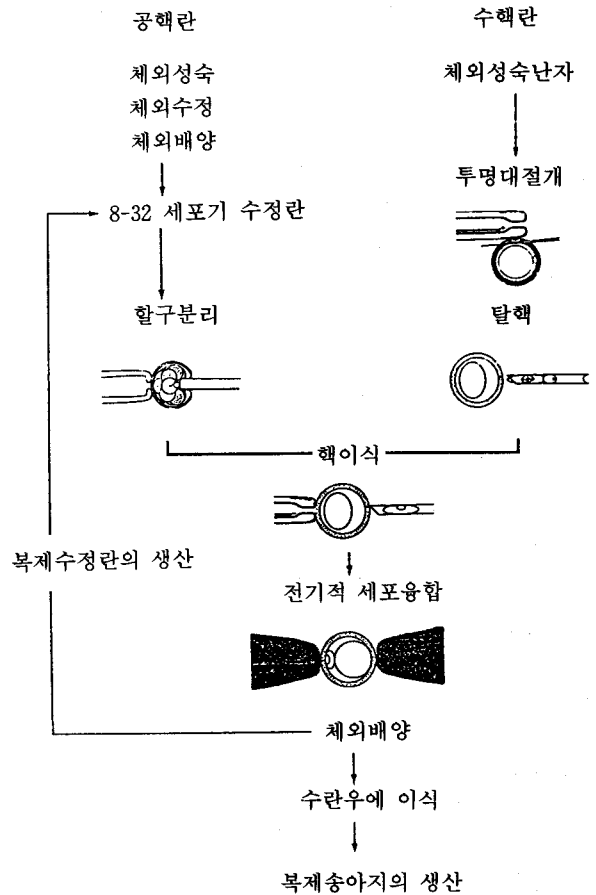


그림 6. 핵이식(복제)송아지의 생산개요 I.

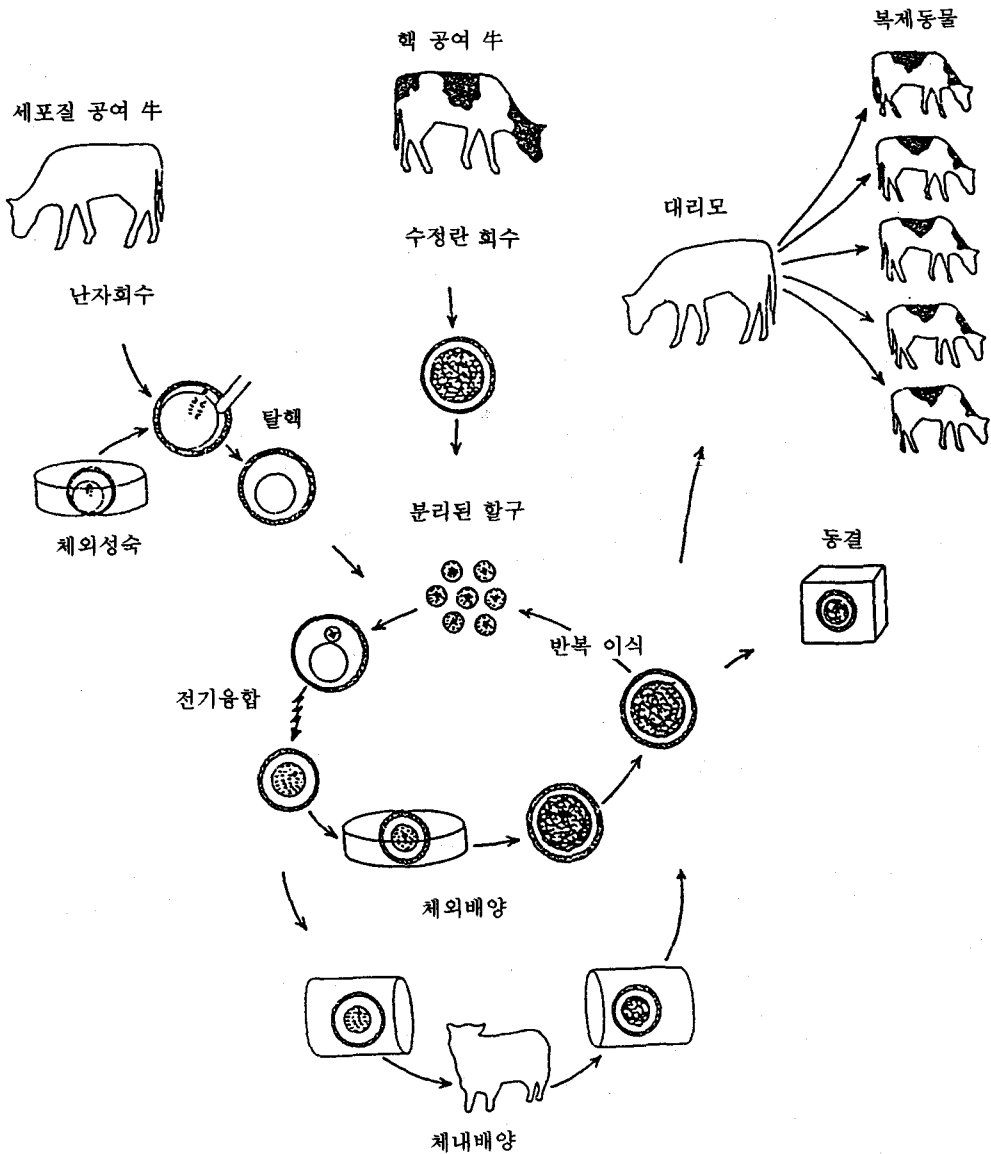


그림 7. 핵이식(복제)송아지의 생산개요 II.

나. 공핵수정란의 준비

핵공여 수정란으로서 32세포기 정도의 상실배기의 수정란을 이용하며 0.5% pronase를 첨가시켜 투명대를 녹인후 각각의 할구를 분리하여 공핵을 준비한다.

수핵난자는 절개되어진 투명대를 통하여 직경 20 μm 정도의 피펫을 삽입한 후 제 1극체와 난세포질을 30~40% 정도 흡입하여 핵을 제거한다. 이와같은 탈핵과정을 마친후 미리 준비된 공핵을 탈핵된 수정란의 절개부위를 통하여 주란강에 주입하여 핵이식 수정란을 작성한다.

다. 수핵난자 및 공핵수정란의 미세조작(핵이식)

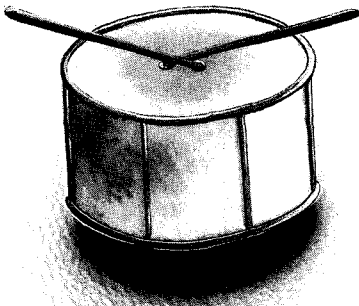
라. 전기융합(Electrofusion)

이식된 할구의 핵이 수핵난자에 융합되도록 하기 위하여 전기융합을 실시한다. 전기세로융합장치를 이용하여 1.5~2.0kV/cm 직류전압에 150μsec 동안 1회 전원을 공급한다. 이후 CO₂ incubator에서 1시간 배양후 할구의 융합여부를 현미경하에서 검사한다.

마. 핵이식수정란의 배양 및 이식

난관상피와의 co-culture를 이용하거나 미세조작을 가하지 않은 일반적인 체외배양방법과 동일하게 실시한다. 체외발육후 상실배기나 배반포기로 된 수정란을 발정동기화가 이루어진 수란우에 이식한다.

“Veterinarian Oath”



장엄한 행진곡
“콰이강의 다리”가
가슴을 두드립니다

“인생의 활력을 찾는 수의사”

그리고 나는 말합니다.
“나는 동물을 고통으로부터 해방시키는 수의사
입으로 안티펜을 처방한다”고.....



수의사의 권위와 품위를 존중하는
주식회사 과학축산
수신자부담 080-023-2361
전화서비스

