

## 한우 체외수정란의 이동 소요시간이 생존율에 미치는 영향

박 회 성

진주산업대학교 농학부 축산학과

### Effects of Transport Duration on Viability of *In Vitro* Produced Korean Native Cattle Embryos

H. S. Park

Dept. of Animal Science

Dept. of Animal Science, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea

#### SUMMARY

Experiments were conducted to assess the effect of quality and viability of bovine blastocysts derived from *in-vitro* culture (IVC) of *in-vitro* matured and fertilized (IVM-IVF) oocytes during their transport 2 hours. Follicular oocytes were collected from ovaries obtained at a slaughterhouse and were cultured for 24 hours in TCM-199. The IVM oocytes were fertilized *in vitro* with caudal epididymis spermatozoa. Fertilized oocytes were cultured for 7 to 9 days, and embryos that developed to the blastocyst stage were used for the experiment. The blastocysts, packed in straws with storage medium that consisted TCM-199 with HEPES equilibrated in air and supplemented with 10% FCS were transported at 39°C (2.0 h). The quality of blastocysts was assessed and ranked as A (excellent), B (Good), fair or poor after transportation.

The percentages of A and B grade blastocysts after transport duration for < 1 hours (97.7%) were similar to the result from transport duration for 1~2 hours (92.9%) and 2~3 hours (89.6%), but significantly ( $P < 0.05$ ) higher than transport duration for 3~4 hours (76.3%). The percentages of A and B grade blastocysts after transport duration for two hours from developed blastocyst at 7 day (100%) and 8 day (85.0%) were higher 9 day (96.6%) and >9 day (40.0%). And early to expanded blastocyst produced *in vitro* were transferred to recipient cow by additional embryos at 7 and 8th day after AI. Three of them were pregnant to term and produced four twin calves, and two calves was premature birth. The gestation lengths of male to female and female to female twin were 282 and 281 days, respectively. And birth weight of twin calves were male to female (22.5kg) and female to female twin (20.30kg), respectively.

(Key words : IVF, blastocyst, transportation, transfer, viability, twin calves, bovine)

#### 서 론

수정란이식 기술의 산업적 이용을 위해서는 적은

비용으로 수정란의 대량생산과 쌍자생산과 같은 방법으로 이식의 효율성을 높일 수 있어야 할 것이다. 체외수 기법은 도축장으로부터 미성숙난자를 확보함으로써 수정란의 대량생산이 가능하며, 체외수

## 재료 및 방법

정란의 이식에 의한 쌍자생산도 발정이 왔을 때 인공수정을 시킨 후 7~9일째에 체외수정란을 추가이식하는 기법은 이식된 수정란이 착상에 실패하여도 인공수정에 의하여 적어도 1마리는 수태가 되기 때문에 축산농가에 경제적 부담을 주지 않는 보다 안정적인 방법으로서 난자의 이용효율과 송아지 생산비용 측면에서 실용화 가치가 대단히 높다고 할 수 있을 것이다. 이러한 방법으로 쌍자를 생산한 보고도 다수 있다(Sreenan, 1975; Anderson 등, 1979; Davis, 1988; Sreenan과 Diskin, 1989; 오 등, 1996).

축산농가에 이식을 하기 위해서는 수란우가 준비된 장소까지 수정란을 장시간 운반해야 하므로 수정란을 동결보존하여 이동하는 방법이 있으나, 이 방법은 동결시의 물리화학적 손상에 의해 신선란에 비해 수태율이 비교적 낮은 실정이다. 반면 신선 수정란 상태로 운반하여 이식하는 방법이 보다 간편하면서도 수태율을 높일 수 있는 방법이나 수정란의 이식을 위하여 실험실에서 생산한 체외수정란을 수란우가 준비된 현장까지 이동하여야 하므로 많은 시간이 소요된다. 이때 transportable incubator와 같은 시설을 이용하지 않으면 CO<sub>2</sub> incubator내의 조건과 같은 상태로 조절이 불가능하므로 수정란의 생존율과 수태율이 떨어지는 것으로 알려져 있다(Takahashi 등, 1996). 국내에서는 거의 대부분이 수정란을 주로 보온병에 담아 CO<sub>2</sub>가 없는 상태에서 운반이 이루어지고 있는 실정이다. 이러한 운반과정에서의 수정란의 발달상태가 수태율에 많은 영향을 미칠 것으로 생각되지만 이에 관한 보고는 아직 없다

따라서 본 연구는 체외에서 생산된 한우 수정란의 이식을 위하여 straw에 장착시켜 CO<sub>2</sub>가 없는 상태로 수정란을 보온병에 담아 수란우가 있는 장소까지 이동하여 이식직전에 수정란의 발달상태를 시간대별로 조사하여 적정시간을 확인하였으며, 소규모 축산농가에서 사육중인 자연발정이 온 한우에 인공수정을 시킨 후 발정 제 7~9일째에 체외수정란을 추가이식하여 쌍자를 생산함으로써 송아지 생산비용을 절감하여 축산농가의 소득향상에 기여하고자 본 연구를 수행하였다.

### 1. 난포란의 회수 및 체외성숙

도축장에서 도살된 한우의 암소에서 난소를 적출하여 난소 표면의 이물질과 조직을 제거한 후 penicillin G(100 µg/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 함유된 생리식염수(28~30℃)에 담아 2시간 이내에 실험실로 운반하여 항생제가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하였으며, 18 gauge needle이 부착된 10 ml 주사기로 2~6 mm 난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡입하였다. 채취한 난포란을 기본배양액(TCM-199 + 5% FCS)으로 4~5회 세척하여 도립현미경(Nikon, 일본)하에서 2~3층 이상의 난구세포층과 세포질이 충실한 것만 선별하여 사용하였으며, streptomycin(100 µg/ml), penicillin G(100 units/ml)와 LH(10 µg/ml), FSH(35 µg/ml) 및 estradiol-17 (1 µg/ml), 10% FCS가 첨가된 TCM-199(Sigma, U.S.A.) 성숙용 배양액을 4-well dish에 1 ml씩 분주하여 39℃ CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 98~99% 습도)에서 20시간 전배양을 실시하여 평형을 유도한 후 well 당 10~15개의 난포란을 옮겨 incubator내에서 24시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

### 2. 정자의 준비 및 체외수정

정소상체 미부로부터 채취한 정자를 B.O. 배양액으로 1시간 동안 swim-up 유도하여 상층액의 정자만을 취하여 500×g 로 원심분리한 후 수정능획득을 위하여 caffeine(5mM/ml), heparin(10µg/ml) 및 BSA(5mg/ml)이 첨가된 수정용 B.O. 배양액을 첨가하여 다시 500×g로 원심분리한 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 15분간 수정능획득을 유도하였다. 체외수정은 성숙된 난포란을 수정용 B.O. 배양액 80~100µl 당 10개 정도의 난자와 수정능이 획득된 정자의 최종농도가 2×10<sup>6</sup> sperms/ml 이 되게 첨가하여 약 20시간동안 CO<sub>2</sub> incubator 에서 수정을 유도하였다.

### 3. 수정란의 체외배양

#### 1) 난관 상피세포의 준비

도축장으로부터 수집한 난관을 생리식염수에 담아 얼음위에서 운반하여 항생제가 함유된 생리식염수로 2~3회 세척하여 결합조직과 지방덩이를 제거한 다음 70% 알코올로 소독한 후 난관 협부에서 누두부 쪽으로 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 2 ml를 관류시켜 난관상피세포를 회수하였다. 난관상피세포는 500×g로 5분간 2회 원심분리하여 세척하고 TCM-199 성숙용 배양액으로 재부유시켜 난관상피세포의 최종농도가  $2 \times 10^6$  cells/ml 이 되도록 조정하여 48시간동안 배양시켜 단층세포의 형성을 유도하였다.

## 2) 체외수정란의 체외배양

체외수정이 이루어진 수정란을 회수하여 TCM-199 배양액으로 3~4회 세척하여 난구세포와 정자를 제거하고 단층을 형성하고 있는 난관상피세포와 9일간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 공배양시켰으며, 48시간 간격으로 신선한 배양액으로 교환하면서 수정란의 체외발달을 유도하였다.

## 4. 체외수정란의 이동후의 생존율

### 1) 체외수정란의 이동 및 형태학적 조사

배반포에 있는 수정란을 등급별로 분류하여 0.5ml straw에 장착하고 한편 보온병은 30분전에 CO<sub>2</sub> incubator안에 두었다가 꺼내어 먼저 39℃ 물을 비닐봉지에 약 200ml 담아 넣고 그위에 수정란이 장착된 straw를 넣어 수란우가 있는 장소까지 이동하여 이식직전에 이동 소요시간대별로 현미경하에서 straw 장착전과의 형태학적 차이를 straw에 장착된 상태로 또는 straw를 cutting하여 dish에 담아 현미경하에서 관찰하였으며, 분류는 Kuwayama 등(1991)의 방법을 일부 수정하여 분류하였다.

### 2) 수란우의 준비 및 이식

수정란이식을 위한 수란우는 본 대학 사육장에서 사육중인 홀스타인 젖소와 경남 거창군 소재 소규모 한우 사육농가에서 사육중인 미경산 및 경산 한우를 사용하였으며, 자연발정이 발현된 한우에 인공수정을 시킨 후 7~9일째에 직장검사로 황체의 존재 여부와 크기를 확인하여 수란우를 선정하였

다.

이식은 상실배 및 배반포기에 있는 수정란을 0.5ml straw 장착후 이식을 위하여 수란우가 있는 장소까지의 이동시의 보관은 상기 4번)에서와 같은 방법으로 하였다. 수정란의 이식은 황체가 있는 반대쪽 자궁에 상실배 또는 배반포기에 있는 체외수정란을 1~2개씩 추가이식을 실시하였다.

## 5. 통계학적 분석

본 실험에서 얻은 결과는 Chi-square test를 실시하여 각 실험구간의 유의성 검정을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 이동소요시간에 따른 수정란의 생존성

배반포기에 있는 체외수정란의 이식을 위하여 0.5ml의 straw에 장착하여 CO<sub>2</sub>가 없는 상태로 보관. 이동하였을 때 이동소요시간과 수정란의 발달상태가 이동후의 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1 및 2에서 보는 바와 같다.

이식을 위하여 1.0 시간이내, 1.0~2.0 시간, 2.0~3.0 시간 및 3.0~4.0 시간이 소요되었을 때 생존율은 각각 100, 96.4, 93.4 및 92.1% 로써 소요시간에 따른 생존율은 유의적(P<0.05)인 차이가 없었다. 생존한 배반포기중에서 B등급이상에 속하는 수정란의 비율은 3.0~4.0시간 소요되었을 때 76.3% 로써 1시간 이내(97.7%) 및 1.0~2.0시간(92.9%) 보다는 유의적(P<0.05)으로 낮았으나 2.0~3.0시간 소요되었을 때의 89.6% 와는 유의적(P<0.05)인 차이가 없었다. 배반포기 수정란을 2시간동안 이동후 배반포기에 도달하는 소요시간에 따른 수정란의 생존율은 9일 이상 소요된 수정란은 60.0% 로써 7일째(100%), 8일째(95.0%) 및 9일째(91.0%) 보다는 매우 낮았으며, B등급 이상에 속하는 수정란도 7일째의 100%를 제외하고는 배반포기에 도달하는데 소요시간이 길수록 낮게 나타났다.

Takahashi(1996) 등은  $\beta$ -mercaptoethanol을 100~150 $\mu$ M를 첨가배양하여 CO<sub>2</sub>가 없는 상태로 보관하여 18.3시간동안 이동하였을 100%의 생존율을 보였다고 하였다. Yang 등(1991)은 CO<sub>2</sub>가 없는 상태로 이동시의 보관온도를 4, 20 및 39℃로 조절

Table 1. Viability of bovine blastocyst embryos after long distance transportation for transfer

Transport duration(hours)	No. of blastocysts cultured	No. of blastocysts(%)	
		Surviving	Grade A and B
< 1.0	43	43(100) <sup>a</sup>	42(97.7) <sup>a</sup>
>1.0~2.0	56	54(96.4) <sup>a</sup>	52(92.9) <sup>a</sup>
>2.0~3.0	48	45(93.4) <sup>a</sup>	43(89.6) <sup>ab</sup>
>3.0~4.0	38	35(92.1) <sup>a</sup>	29(76.3) <sup>bc</sup>

Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05)

Table 2. Viability of blastocyst bovine embryos after 2 hours transportation by during blastocyst production

Day of produce blastocyst	No. of blastocysts cultured	No. of blastocysts(%)	
		Surviving	Grade A and B
Day 7	14	14(100)	14(100)
Day 8	20	19(95.0)	17(85.0)
Day 9	11	10(91.0)	7(63.6)
Day 9 >	10	6(60.0)	4(40.0)

하여 24시간동안 이동하였을 때 온도에 관계없이 모두다 생존율이 유의적으로 감소한다고 하였다. 박과 정(11997)은 이동후 A 및 B등급의 수정란은 소요시간이 2시간 이내의 경우 93.2%이상이었으며, 3시간이 소요될 경우 76.7%로 급격하게 떨어지며, 수정란의 발달단계에 있어서도 상실배부터 확장배반포기 수정란 보다는 부화배반포기 수정란이 이동후의 생존율이나 질적등급에서 떨어진다고 하였다.

이러한 결과로 볼 때 국내의 수정란이식시 거의 대부분 transportable incubator 또는 수정란이식용 전문차량이 없이 수정란을 보온병에 담아 장시간 보관·이동하여 수정란이식을 실시하고 있는 실정에서는 이동시에는 소요시간이 적어도 2시간 이내 이식을 완료하는 것이 적합한 것으로 생각되며, 배반포기에 도달하는데 소요되는 시간도 7 또는 8일째에 배반포기에 도달한 수정란을 이식에 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

## 2. 체외수정란의 이식에 의한 산자생산

체외에서 생산한 한우 배반포기 수정란을 한우 및 젖소 수란우가 준비된 장소까지 이동하여 자연발정우에 인공수정후 7~8일째에 1~2개의 배반포기 수정란을 이식하였으며, 쌍자생산 결과는 Table 3, 4 및 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

젖소 5두에 초기 배반포 또는 확장 배반포기 수정란을 황체가 없는 반대쪽 자궁각에 각각의 소요시간대 별로 이식하였으나 전혀 수태가 되지 않았으며, 한우 5두에 배반포기 수정란을 이식하여 이중 3두가 쌍자를 분만하여 모두 6두의 한우 쌍자 송아지를 분만하였다. 3두의 수란우중 1두는 조산과 분만시의 관리소홀로 분만후 폐사하였으며, 나머지 2두의 수란우가 생산한 쌍자 4두(97년 2월 11일 및 12일 분만)의 송아지는 정상적으로 분만하여 매우 건강하게 자라고 있는 것을 확인하였다.

Takahashi(1996) 등은 B-mercaptoethanol을 150uM를 첨가배양하여 CO<sub>2</sub>가 없는 상태로 18.3시간동안 이동하여 이식하였을 때 53.8%의 수태율을 얻었다고 하였으며, Leibo와 Wnninger(1986) 및 Hasler등 (1987)은 CO<sub>2</sub>를 충전시켜 24시간 이동후 이식하였을 때 70%의 높은 수태율을 얻었다고 하였다. 오(1996)등은 체외 동결수정란을 직접이식하여 지역에 따라서 0~35.3%의 쌍자생산율을 보였다고 하였으며, 체내 수정란의 이식에 의한 쌍자생산은 Sreenan 등(1975)의 76.4%, Anderson 등(1979)의 70%, Davis 등(1988)의 15.6% 및 Schmidt 등(1996)의 64%로 수태율에 많은 차이가 있었으며, 이식시의 다양한 요인들에 의한 것으로 생각된다. Phillipson(1976)이 미경산우를 수란우로 사용할 경우 분만시 난산 등의 위험성 때문에 적

Table 3. Twin production of bovine IVF embryos by transfer following artificial insemination

Recipient cow	Parity	Day of estrous	Side of uterine horn(C L)	Stage of embryo transferred	transportation time(hours)	Diagnosis
Holstein						
1	3	7	L	EB	2.10	Non-pregnant
2	1	8	R	EB	2.30	Non-pregnant
3	3	7	R	Exp	0.30	Non-pregnant
4	1	7	L	Exp	0.30	Non-pregnant
5	4	7	L	Exp	0.30	Non-pregnant
KNC*						
1	1	8	R	EB	1.00	Non-pregnant
2	2	8	R	Exp	2.00	Pregnant
3	2	8	L	Exp	1.50	Pregnant
4	1	8	R	Exp	1.45	Pregnant
5	1	8	R	Exp	2.30	Non-pregnant
Total	10					3

\* KNC : Korean Native Cattle

Table 4. Sex, gestation and birth weight of twin calves produced by transfer following artificial insemination

Recipient cow(KNC)	Parity of recipient	Sex of twin calf	Gestation length(days)	Birth weight(kg)	Parturition
3	2	M : F	282	22.50	Normal
4	2	F : F	281	20.30	Normal
5	1	M : F	272	—	Premature birth



Fig. 1. Korean Native twin calves born following transfer of in vitro produced bovine embryo.

합지 않다고 하였으며, Hasler(1977) 등은 15세까지의 수란우는 수태율에 차이가 없다고 하였다. 한우의 쌍자생산 자연발정우를 이용하여 인공수정 후 7~9일째에 추가이식하는 방법이 보다 안정적인 생산방법일 것이다(오 등, 1996). 젖소에서 전혀 수태가 되지 않은 이유는 알 수 없으나 한우의 이식에 있어서도 소규모 축산농가에 사육중인 소를 이용할 경우 수란우로 엄격하게 선발하기가 곤란하였을 뿐만 아니라 사육농가의 무관심으로 이식후의 사양관리가 제대로 되지 않는 등의 어려움이 많았다. 앞으로 소규모 축산농가에 이식할 경우 이러한 문제점을 충분히 고려되어야 할 것으로 생각된다.

## 적 요

본 연구는 체외에서 생산한 한우 배반포기 수정란을 0.5ml straw에 장착하여 CO<sub>2</sub>가 없는 상태로 보관하여 수란우가 준비된 현장까지 이동후 이동소요시간과 수정란의 발달상태가 이동후의 생존율에 미친 영향을 조사하였으며, 소규모 축산농가에서 사육중인 자연발정이 발현된 젖소 및 한우에 인공수정시킨 후 발정 제 7~8일째에 체외수정란을 추가이식하여 쌍자생산 성적은 다음과 같다.

이식을 위하여 이동소요시간이 1시간이내일 때 100%의 생존율과 B등급 이상의 수정란은 97.7%로써 가장 높게 나타났으며, 3~4시간의 생존율 92.1%와는 유의적(P<0.05)인 차이는 없었으나 B등급이상의 수정란비율 76.3%보다는 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났다.

이식을 위하여 2시간동안 이동하여 체외수정후 배반포기에 도달하는 소요시간에 따른 수정란의 생존율은 9일 이상 소요된 수정란은 60.0% 로써 7일째(100%), 8일째(95.0%) 및 9일째(91.0%)보다는 매우 낮았으며, B등급 이상에 속하는 수정란도 7일째의 100%를 제외하고는 배반포기에 도달하는데 소요시간이 길수록 낮게 나타났다.

체외에서 생산한 한우 배반포기 수정란을 수란우가 준비된 장소까지 이동하여 인공수정후 7~8일째에 1~2개의 배반포기 수정란을 젖소 수란우 5두에 각각의 소요시간대 별로 이식하였으나 전혀 수태가 되지 않았으며, 한우 5두에 배반포기 수정란을 이식

하여 이중 3두가 쌍자를 분만하여 모두 6두의 한우 쌍자 송아지를 생산하였으나 이중 1두는 조산후 폐사하였다. 정상적으로 분만한 쌍자의 생시체중 및 임신기간은 각각 20.30~22.5kg 및 281~282일 이었다.

## 사 사

본 연구를 위하여 많은 협조를 해주신 정장용 교수님, 박성진 교수님, 동물 발생공학실험실의 김정혁군, 정승렬군, 김성희양, 이진분양, 기창축협외의 김정원씨, 황성호씨, 문남식 인공수정사와 수란우를 제공해주신 정형무씨의 축산농가 여러분들께 깊은 감사를 드립니다.

## 참고문헌

- Anderson GB, Cupps PT and Drost M. 1979. Induction of twinning in cattle with bilateral and unilateral embryo transfer. J. Anim. Sci., 49:1037-1042.
- Davis ME, Harvey WR, Bishop MD and Gearheart WW. 1988. Use of embryo transfer to induce twinning in beef cattle: Embryo survival rate, gestation length, birth weight and weaning weight of calves. J. Anim. Sci., 67:301-310.
- 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. Theriogenology, 27:139-168.
- Kuwayama M, Hamano S, Sato M, Nagaoka S Tanaka Y and Abe M. 1991. Embryo transfer of *in vitro* derived embryos after transportation, 5th Jpn. Anim. Reprod. Technol. 28 abstr.
- Leibo SP and Winninger D. 1986. Production of bovine pregnancies from embryos transported at 0 °C by air. Theriogenology, 25:165 abstr.

- Phillipson J. 1976. Studies on calving difficulty, stillbirth and associated factors in Swedish cattle breeds. I. General introduction and breed averages. Acta. Agric. Scand. 26: 151-164.
- Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J and Hansen HB. 1996. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. Theriogenology, 46:527-539.
- Sreenan JM, Beehan D and Muulvehill P. 1975. Egg transfer in the cow: Factors affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfers. J. Reprod. Fert., 44:77-85.
- Sreenan JM and Diskin MG. 1989. Effect of a unilateral or bilateral twin embryo distribution on twinning and embryo survival rate in the cow. J. Reprod. Fert., 87:657-664.
- Takahashi H, Kuwayama M, Hamano S, Takahashi M, Okano A, Kadokawa H, Kariya T and Nagai T. 1996. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on the viability of IVM /IVF /IVC bovine embryos during long-distance transportation in plastic straws. Theriogenology, 46:1009-1015.
- Yang Ns, Duff R, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1991. Effect of storage temperature and time on the viability of bovine embryos production *in vitro*. Theriogenology, 35:297 abstr.
- 박희성, 정장용. 1997. 한우 체외수정란의 체내이식 시 이동시간에 따른 생존성. 진주산업대학교 농업기술연구소보. 10:189-14.
- 오성종, 양보석, 이명식, 엄정열, 이수윤, 이인형. 1996. 인공수정후 수정란 추가이식이 수태율 및 쌍태생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지. 11:301-307.

---

(접수일자 : 1997. 11. 18 / 채택일자 : 1997. 12. 20)