

소수정란이식과 접근방법

김갑수, 이성준, 김용성, 양종용,
김갑수동물병원, 지리산낙농업협동조합, 장수축산업협동조합

1. 소수정란이식의 개요

공란우의 생식기로부터 착상전의 수정란을 회수하거나 체외 배양하여 수란우의 생식기에 이식하여 착상, 임신, 분만케하는 첨단 생명공학의 기술이다. 수정란 이식은 1890년 영국의 Heape가 토끼를 이용해 최초로 성공한 이래 연구가 계속되다가 소수정란이식은 1950년대 폭발적인 인구증가에 따른 동물단백질 생산의 필요성과 장래 암컷에 의한 개량증식의 필연성에 의해서 개발된 것이다.

소수정란 이식은 70년대 미국, 캐나다에서 상업적으로 이용되기 시작하여 1980년대에는 이식두수가 미국의 경우 2만 5천두에서 1990년대에는 25만두로 증가하였다. 우리나라에서는 1980년대초부터 도입되어 1983년 최초의 송아지가 생산되고 그후 활발한 연구가 이루어져 1993년부터는 젖소 능력개량을 위한 우수한 능력의 수정란 이식 송아지가 생산되고 있으며, 수정란 미세조직에 의한 복제송아지등의 첨단기술이 실용화되고 있다.

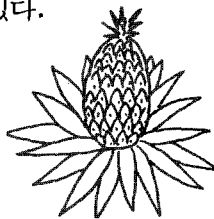
수정란이식의 장단점을 보면 :

가. 장 점

- 능력우로부터 많은 수정란을 채란하여 저 능력우에 이식함으로써 단기간에 우수한 송아지를 많이 생산하여 개량능력의 향상 폭이 넓어지고 개량기간을 단축할 수 있다.
- 젖소에게 한우의 수정란을 이식하여 자가 원하는 송아지를 생산할 수 있어 특정 품종이나 계통의 확대 생산을 할 수 있다.
- 유전자를 보존할 필요가 있는 특별한 소의 경우에는 수정란을 채란하여 동결보존시켰다가 필요시 이식하여 자손을 생산할 수 있어 특정 유전자원의 장기간 보존이 가능하다.

나. 단 점

- 수정란 채란 및 이식기술은 가축의 발생학, 생리학, 수의학, 약리학, 산과학 등의 학문과 기술의 집합체로써 고도의 기술을 요한다.
- 인공수정에 비하여 많은 비용과 기자재가 소요되고 가능한한 무균적인 상태에서 시술되어야 하기 때문에 별도의 위생적인 실험시설이 필요하다.
- 자연의 섭리를 벗어나 인위적으로 하나의 생명체를 조작함으로써 생명의 존엄성이 상실될 우려가 있다.



2 수란우의 발정동기화

모든 공란우 및 수란우는 최소한 30일동안은 균형된 영양소가 함유된 사료를 급여하고, 하루에 2회(오전 06:00 오후 06:00)의 발정을 파악하여 기록한다.

높은 수태율을 위해서는 수란우에 수정란이 이식될 때 공란우의 자궁환경과 가장 비슷하게 할 수 있도록 해 주어야 한다. 즉 다배란 처리된 공란우로부터 인공수정후 7일째(발정일=0)에 채란된 수정란을 수란우의 발정주기가 6, 7, 8일째 이식되어야 한다.

가. 자연발정을 이용한 발정동기화

나. 약품에 의한 발정동기화

- 1) Progesterone
- 2) Prostaglandin F₂ α

발정동기화후에도 수태율에는 차이가 없으나, 발정유도에도 불구하고 직장검사를 통하여 이식적격여부를 확인하면, 약25%는 이식하지 못하는 경우가 있기 때문에 25% 정도의 여유 있는 수란우를 확보해야 한다.

3 공란우의 과배란 처리 및 인공수정

수정란 이식과정에서 가장 중요한 부분은 과배란처리라고 할 수 있는데, 생리학적, 생화학적 이해없이는 이상적인 과배란 처리를 할 수

없다. 과배란 처리시 일반적으로 10~20개 정도의 난자가 배란되는데 이들 중 약50% 정도가 이식 가능한 수정란으로 발달된다.

과배란처리시 사용되는 약품으로는 FSH나 PMSG가 주로 이용된다. PMSG사용할 때는 반감기가 길기 때문에 난소낭종을 일으킬 수 있으며, 난자의 난관내 이동이 비정상화 될 수 있고, 유량이 감소될 수 있으나 FSH보다 가격이 싸고 처리가 간단하다.

다배란 처리 공란우의 인공수정은 질 좋은 수정란을 생산해내는데 중요한 영향을 미치므로 발정관찰, 정액의 질, 정액취급, 정액주입 등에 세심한 관심을 가져야 한다. 다배란 처리시 난자들은 24~48시간 동안에 배란되기 때문에 최소 2회이상은 수정을 해야한다. 보통 발정발견 12시간과 24시간후에 인공수정을 시킨다. 2회 수정후에도 승가허용이 지속되면 HCG 5000 IU를 주사하고, 12시간후에 재수정한다.

4 수정란의 채란

6일전에는 난관내에 머물고 있으며, 8.5일이 지나면 투명대가 벗겨져 동결하기에 너무 신속된 상태이기 때문에 7일째가 가장 적당하다.

관류액과 동결액은 채란 하루전날 실험실에서 제조하여 냉장보관하여 사용한다. 채란시 앞다리를 약간 높게하고 전후좌우가 안정되게 보정한다. 제1~2미추간에 2%의 리도카인을 5~6ml을 주사하고, 주사 1분후 꼬리를 보정한다. 직장내 분을 제거하고 외음부의 더러운

오물을 제거하는데 비눗물은 독성이 있으므로 깨끗하고 따뜻한 물로 씻은 후 건조시킨다.

초음파진단기,	관류액(1,000ml/1두), 동결용액
실체현미경,	petridish(두당 1개)
수정란동결기, 액체질소통,	pasteur pipettes,
Foly catheter(두당 1개),	국소마취제, 자궁이완제
수정란 여과기,	1ml, 10ml, 50ml주사기,
경관확장봉,	직장검사용 장갑,
알콜램프,	알박봉대,
비이커,	항생제,
메스실린더,	70% 소독용 알콜,
검자	0.25ml straw, 유성펜
	장화, 어깨보호대 및 앞치마
	Em-Con필터

한 마리 이상의 공란우를 채란할 때는 유성펜으로 Em-Con필터의 측면에 공란우 명호를 각각 기록한다. Foley catheter는 경산우의 경우 18호, 미경산우의 경우는 16호를 사용한다. 직장검사용 장갑을 끼고 윤활제를 바른후 직장에 손을 넣어 자궁경, 자궁각, 난소 등을 확인하고, 황체의 수를 확인하여 기록한다. 자궁경위에 부드럽게 손을 올려놓고 질을 벌린다음 철심이 들어있는 카테타를 30° 각도로 삽입한다. 부드럽게 자궁경을 감싸고, 카테타를 통과시키고 자궁경통과가 안될 경우 자궁경확장봉을 이용하거나, 카테타를 작은 것을 사용하기도 한다. 자궁경 통과시 자궁경을 움직이고 카테타의 이동을 최소화한다. 자궁경통과 후 철심을 약간 뒤로 후진시킨후 서서히 자궁각 선

단부로 밀어 삽입한다. 자궁각에 카테타가 난 관접합부에서 10~15cm정도 떨어진 곳에 위치한 후, 카테타의 풍선에 공기를 10~20ml 정도 넣고 부드럽게 뒤로 후진해 봐서 완전히 고정되면 겸자로 공기주입구를 잡고 철심을 완전히 제거한다. 외부의 카테타의 끝을 Y-tube에 연결한다. 채란용 튜브에 공기를 완전히 제거하고 Em-Con filter로 가는 튜브에 겸자로 고정후 50~100ml의 채란액을 자궁각으로 유입시킨다. 자궁각에 채란액이 충분히 들어간후 필터쪽의 겸자를 제거하고, 부드럽게 자궁각의 채란액을 자궁경쪽으로 훑어내는 것을 5~10회 반복한다. 채란액 회수가 끝나면 다시 공기를 자궁각에 넣어 남아있는 채란액을 회수하고 카테타를 꺼낸다음, 관류액으로 한번 더 씻어내어 수정란을 잃어버리지 않도록 한다. 수정란을 채란하는 동안 채란액이 Em-Con filter의 반이상을 항상 유지해야 한다.

5 수정란 다루기

채란된 모든 액은 75 μ m의 여과기구 Em-Con filter를 통하게 되며 항상 일정량의 채란액이 유지되어야 하며 16G 바늘이 부착된 주사기에 신선 채란액으로 수차례 여과기구를 행귀 채란된 모든 수정란이 검정 petri-dish에 있게 한다. 주사기로 행굴 때 거품방지를 위하여 BSA나 FCS가 없는 채란액을 사용해도 된다.

채란액은 실체 현미경하에서 세심히 찾아야 하며 수정란은 곧바로 신선 배양액에 옮겨져야

하며, 수정란을 배양액으로 최소한 3회이상 씻어(washing) 주어야 하며, 필요시 트립신 처리를 할 수도 있다. 아외작업시 petri-dish의 뚜껑을 닫아 과도한 빛으로부터 보호되어야 하며 수정란의 질, 발육단계 등을 평가한 후 이식 혹은 동결여부를 결정한다. 수정란 1~2등급의 경우는 신선란으로 이식하면 수태율을 높일 수 있다.

황체의 수는 많은데 1차 채란에서 수정란이 적게 또는 채란이 전혀 안되었을 때 3시간후 재차 채란을 하는 것이 유용하다. 난소반응이 좋고 채란이 정상적으로 잘되었어도 배란된 수정란이 회수되지 못하는 경우도 있는데, 이는 외과적으로 채란을 하여도 거의 같은 결과를 나타낼 수 있다. 채란이 완전히 끝나면 자궁에 자궁내막염 방지제를 40ml 주입하여 자궁의 세균오염 및 스트레스를 완화하고 조속한 발정재귀를 위해서 PGF₂ α 를 근육 주사한다.

소 수정란의 직경은 두께가 12~15 μ m인 투명대를 포함하여 150~190 μ m정도이다.

- 1등급(Excellent)

수정란들이 98%이상 거의 완벽할 만큼 세포체들이 건강하고 돌출된 할구를 보이지 않으며, 수정란의 형태가 균일하게 원형을 이루고 있다.

- 2등급(Good)

좋은 수정란으로 70~98% 정도 세포들이 매우 건강한 상태로 약간 돌출되어 보이는 하지만 원형 형태를 이루지 못한 수정란들이다.

- 3등급(Fair)

수정란의 형태가 다소 불량한 상태로 70% 이하로 세포체가 건강하지 못한 상태의 수정란을 말하며 돌출된 할구가 많고 극도로 불균형한 형태를 보인다.

- 퇴행란

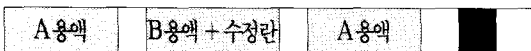
세포의 발육단계가 16세포기 이전의 것들과 세포막들이 거의 손상되었거나 납작한 상태, 반달모양의 할구세포를 지닌 이식 불가능한 수정란들이다.

6 수정란의 동결

수정란은 실온에서 24시간, 4°C에서는 48시간 정도 보존이 가능하지만 시간이 지날수록 생존성이 급격히 떨어지므로 회수된 수정란은 준비된 이식대상 소가 있으면 이식을 하고 그렇지 못할 경우에는 동결시켜 보존해야 한다.

동결시에는 50ml PBS+200mg BSA(4mg/ml)-A용액-과 4.2ml Ethylen glycol (Sigma E912G)+A용액+B용액-을 사용하며, 수정란을 B용액이 담긴 petri dish로 옮긴후 10분간 실온에서 정제하여 용액 변경시 수정란의 충격을 완화하며 수정란의 손실을 방지한다.

수정란을 스트로우에 아래와 같이 장전을 하여,



급속동결기를 이용하여, -7°C에서 유리화

(seeding)시켜, 5분간 평형시킨다. 이어서 분당에 0.5°C씩 온도를 내려 -32.5°C까지 동결시킨후 액체질소통에 보존한다. 동결시에는 정확한 정보를 기록하는 것이 수정란 이동 및 이식시 혼란을 막을 수 있다.

7. 수정란 이식

도구 및 재료

초음파진단기, 수정란 이식기, 경관 확장봉, 수정란 용해기, 액체질소통	동결 및 신선수정란, 슬리버, 수정란이식기 sheath(두당 1개) 70% 소독용 알콜, 장화, 어깨보호대 및 앞치마, 자궁이완제
---	--

신선란으로 이식할 것은 채란시 곧바로 이식하고 동결란으로 이식할 것은 발정주기에 맞추거나 호르몬 처리를 한다. 수란우에 경막외 주사로 미근부 마취를 시킨후, 분을 제거하고 꼬리를 묶고, 질 및 직장 주위를 닦아준다. 질소통에서 꺼내어 5~10초간 공기중에서 흔든 다음, 30°C 따뜻한 물에 20초간 용해하여 장전한다. Sheath의 외무오염을 막기위해 슬리버를 씌운다. 수정란 이식시 공란우의 명호와 이식할 수란우와 일치하는지 확인한다. 보조자는 질을 벌려주고 시술자는 질을 통과하여 자궁경관을 통과할 수 있도록 조작한다. 자궁경에 도달하면 슬리버를 제거하고, 주입기를 고정하고

자궁경관을 가볍게 움직여 주입기를 통과시킨다. 자궁경관의 통과가 어려울시 자궁경확장봉을 이용하기도 한다. 황체가 있는 쪽의 자궁각 선단부 깊숙히 주입기를 부드럽게 밀어넣어 주입한다. 하지만, 더 깊은 쪽에 이식한다고 계속하여 자궁각을 만지는 것은 자궁벽 조직에 자극을 주고 임신에 실패하는 경우가 있다.



8 결론 및 고찰

WTO체제하에서 축산 농가의 경쟁력이라는 것은 육종개량하에 우수한 종축을 생산해야 한다는 것은 사실이다. 이러한 축산 농가의 절실한 요구에 부응하기 위하여 반드시 고능력우 수정란이식의 현장보급이라는 것 역시 물론 잘 알고 있다.

1996년 귀국하여 수정란이식에 관련된 논문이나 보고서를 보고, 또한 학회를 참석하였을 때 유럽이나 미국 일본 등의 학회보다는 훨씬 많은 인원, 많은 논문들이 발표되는 것을 보고

놀라지 않을 수 없었다. 지금 거의 2년이 지난 지금 국내 생명공학 특히 수정란이식에 관련된 제분야를 재조명해 볼 때 국내의 생명공학 관련 기초산업 특히 소 수정란 기초관련 모든 산업분야가 아직도 태어나지 못한 초기배 (Embryo) 상태에 머물러 있다는 사실을 보고 놀라지 않을 수 없다. 수많은 연구비를 대학, 연구기관 및 관계단체에 투자했지만, 국내 수정란이식 농가 보급율은 아직도 10%도 안되는 것 같은 인상을 준다. 그보다 더 큰 문제는 그나마 수정란이식을 경험한 축산농가들이 수정란이식을 바라보는 시각은 매우 부정적이라는 사실이다. 그 이유를 나름대로 분석을 해보면 외국의 경우에는 실무 수정란이식으로 출발하여 수정란 이식팀이 농가를 직접 방문하여 수정란의 채란 및 이식을 하여 주며, 그때 생기는 문제를 해결하기 위한 실험실내 연구를 하는 경우가 보편적인 현상인데 반하여, 국내에서는 갑작스럽게 수정란이식 분야에 정부로부터 연구비 지원이 용이해지자, 그때까지 소수정란이식이나 번식생리 외는 별로 관심이 없던 학계나 연구기관이 수정란이식 관련연구에 참여하게되며, 실제로 현장가는 무관한 실험실내 연구도 수행되어졌으며, 그러다 보니 도살장에서 무작위로 암소의 난소를 채취하여 실험실에서 IVF 수정란을 생산하여 전염성 및 비전염성 질병에 관한 검사도 없이, 대체로 어느 수란우에 이식했는지조차도 모르는 농가를 대상으로 수태율 실험사업을 지난 몇년간 해왔으며, 또한 실질적인 이해 득실의 계산없이 단순논리로 한우쌍태를 생산하여 축산농가의 경쟁력을 높인다는 계획아래, 그나

마 어려운 국가예산만 낭비했다는 것은 부인할 수 없는 사실이며, 일선 지도직 공무원들은 아직도 “쌍태-Syndrom”을 벗어나지 못하고 있는 것 같다. 또한 일부에서는 젖소에 마저 인공수정을 하고 7일후에 수정란을 이식하는 “수정란이식 편법”을 사용하여, WTO체제하에서의 농가 경쟁력을 키워 줄 수 있는 육종 및 번식의 도구로써의 수정란이식이 아닌 단순히 그 시대의 “애물단지”인 수정란이식으로 전락해 버린 것 같으며, 정말로 반갑게 받아들여야 할 축산농가를 외면한 대학 및 연구소의 재정만을 채워주는 그러한 생명공학 기술로 타락해버린 것 같은 감이 들어 못내 아쉬운 감이 없지 않다. 그러므로 공공연구소 및 대학위주의 사업으로부터 민간인이 참여할 수 있는 실제로 경쟁력이 있는 수정란이식 관련정책이 시급한 과제인 것이다.

지금까지 약2년동안의 저희 팀이 실행한 사업을 토대로 소 수정란이식의 발전방향을 보면, 앞에서 제시한 것과 같이 농가에서 직접 채란을 하여 수란우에 이식하는 실무 수정란 이식

이 보다 더 활성화되어야 하며, 이를 위한 국가 지원정책이 절실하게 요구되어 지고 있다.

예를들어 수정란이식에 관련된 제비용을 정산을 하며

농가에서 보유하고 있는 공란우를 과배란처리하여, 채란, 동결시키기까지 농가가 부담해야 하는 총비용은 260,000원(환율변화에 따른 변동가능)이며, 여기에는 수의사인건비 및 수정란이식비용은 포함되어 있지 않다. 그러므로 정부로부터 실제로 수정란이식을 하고자하는 농가를 대상으로하는 직접적인 지원정책이 필요할 것이다. 그러므로서 실제로 현장수정란이식이 활성화되고, 축산농가는 대내외 경쟁력이 생기며 그러한 바탕위에 보다 더 현실성이 있는 연구가 이루어지지 않을까 생각한다.

문의 및 질문이 있으신분을 위하여 :

김갑수 동물병원

경기도 안성군 서운면 신흥리 산25

전화 : 0334-74 03 00

송신 : 0334-74 78 08

