韓國受精卵移植學會誌(2003) 第 18 卷 第 2 號
Korean J. Emb. Trans. (2003) Vol. 18, No. 2, pp. 97~108

성감별된 한우 체외수정란의 수정란 이식

김용준† · 이창민 · 정구남[1] · 이혜리 · 조성우[1] · 김용수[1] · 신동수[1] · 홍유미 · 유일정
전북대학교 수의과대학

Embryo Transfer with Sex-Determined Hanwoo Embryos Produced by *In-vitro* Fertilization

Y. J. Kim†, C. M. Lee, G. N. Chong[1], H. L. Lee, S. W. Cho[1], Y. S. Kim[1], D. S. Shin[1], Y. M. Hong and I. Yu

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

SUMMARY

In-vitro fertilized Hanwoo embryos were biopsied for sex determination by PCR. Biopsied embryos were incubated for 1~2 hours for the recovery.

Those sexed Hanwoo embryos were transferred to 49 Hanwoo and 16 Holstein recipients from February 2000 to February 2001. Of 65 recipients, 14 cows(12 Hanwoo and 2 Holstein) delivered the same offspring as sex-determined by PCR, therefore the conception rate was 21.5%.

1. Total 65 embryos(male 35, female 30) were transferred to recipients, and 14 calves (male 6, female 8) were delivered. In comparison between sex by PCR method and sex of calves born after embryo transfer, the accuracy of sex determination was 100.0%.
2. The conception rate after transfer with biopsied embryo between Hanwoo and Holstein was 24.5% and 12.5%.
3. The conception rate after transfer with biopsied embryo between fresh and frozen-thawed embryos was 23.5% and 14.3%.
4. The conception rate according to the season when embryo was transferred was 11.8, 29.4, 23.5 and 20.0% for spring, summer, autumn and winter, respectively.
5. The conception rate according to embryo quality after biopsy was 41.7, 30.0 and 0.0% for excellent, good and fair quality.
6. The conception rate according to thickness of uterine horn was 71.4, 18.9, 11.8 and 0.0% for 0, +, ++ and +++ thickness.
7. The conception rate according to the site in the uterine horn where embryo was put was 30.0, 20.0 and 10.0% for cranial, mid, and caudal part of uterine horn.
8. The conception rate according to the quality of corpus luteum ipsilateral to the uterine horn where embryos was transferred was 41.2, 14.3 and 15.4% for excellent, good and fair quality.

[1] 전라북도 축산진흥연구소 종축시험소(Livestock Breeding Station, Livestock Development & Research Institute of Chonrabuk-do)

† Correspondence : E-mail: yjk@chonbuk.ac.kr

9. The conception rate according to the time required for embryo transfer was 18.2, 30.0, 30.0, 0.0 and 25.0% for 10, 15, 20, 25 and 30 minutes.
10. The conception rate according to parity of recipients was 26.5, 19.1, 14.3 and 0.0% for the primiparous, the 2nd parous, the 3rd parous and the 4th parous recipients.

These results indicated that fresh embryos are more demanded than frozen-thawed embryos for good conception rate in embryo transfer with biopsied-sexed embryo. Also, it was indicated that we should consider embryo-recovering condition, recipient's uterine thickness, transfer site in uterine horn, quality of corpus luteum, time required for transfer and parity of recipient to achieve good conception rate in ET with biopsied-sexed embryos.
(Key words : Hanwoo, sex determination, embryo transfer)

서 론

성감별된 수정란의 이식은 수정란 단계에서 성을 판정하여 이식하기 때문에 축산 농가가 원하는 성의 산자를 얻을 수 있어 가축의 생산성을 향상시킬 수 있으며 축산 경영의 효율성을 도모할 수 있는 획기적인 방법중 하나이다.

정자의 성분리(X정자와 Y정자의 분리)에 의한 성감별이 여러 가지 방법(Schenk 등, 1999; Nagao 등, 1993; Binor 등, 1992; Brandriff 등, 1986; Kaneko 등, 1983; Landa 등, 1980)으로 시도되었으나 완벽하게 한쪽 성만을 분리하기가 어려울 뿐만 아니라 분리된 정자를 이용한 수태율이 낮아 산업적인 차원에서는 아직 실용성이 떨어진다고 인정되고 있다. 수정란에 대한 성감별 방법에는 성염색체 분석 방법(송시한 등, 1996; Iwaskai와 Nakahara, 1990; King, 1984; Esptein 등, 1978), 웅성특이항체(H-Y항체)를 이용한 진단법(유일정 등, 1999; 박영일 등, 1996; Utsumi 등, 1993), 수정란의 발달속도 차이에 의한 방법(Itagaki 등, 1995; Avery 등, 1989; Williams, 1986), 암·수 수정란의 대사활성 차이에 의한 특정효소 역가 측정법(X-linked enzymes 이용법), (이상영 등, 1987), Y-specific DNA를 검정하는 polymerase chain reaction(PCR) 방법 (Itagaki 등, 1996; Bredbacka 등, 1995; Kudo 등, 1993; Agrawala 등, 1992)등이 있다. 이중 PCR을 이용한 Y-specific DNA의 검정이 적은 양의 수정란 세포를 이용하여 정확한 성감별을 할 수 있어 최근 가장 널리 사용되고 있다.

한편, 김 등(김용준 등, 2000) 등의 보고에서 성감별 수정란 이식시 수태율이 낮은 편인데 성감별 수정란 이식시 수태율은 수정란 biopsy 후 회복상태, 수란우의 상태, 이식기술, 가타 환경 요인 등에 달려있다고 볼 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 가장 신속하고 실용적인 PCR 기법을 이용한 성감별 방법을 통해 생산된 수정란을 수란우에 이식시 수태율에 영향을 미치는 여러 가지 요인들을 조사하여 수정란 이식시 수태율을 높일 수 있는 방향을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

전라북도 축산진흥연구소 종축시험소에서 사육하고 있는 0~3세의 한우 49두와 젖소 16두를 수란우로 사용하여 성감별 수정란 이식시 여러 가지 조건에 따른 수태율을 조사하였다.

2. 연구 기간

2000년 2월부터 2001년 2월까지 수행되었다.

3. 수정란 성감별

1) 난자의 회수/체외성숙

도축된 한우의 난소를 채취하여 항생제 penicillin G(100 IU/ℓ)와 streptomycin(100 ㎍/ℓ)이 함유된 25~30℃의 멸균 생리식염수에 넣어 3시간 이내에 실험실로 운반한 후, 37℃의 멸균 생리식염수로 세척후 37℃의 water bath에 보관하였다.

5 ml 주사기를 이용하여 FCS(fetal calf serum)

가 3%로 첨가된 D-PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco)를 1 ml 흡입한 후 7 mm 이하의 난포에서 난포액을 흡입하여 petri dish에 천천히 분주하였다.

분주후 실체현미경하에서 10배로 난자를 관찰하면서 pasteur pipette을 이용하여 FCS 3% 첨가 D-PBS가 담긴 petri dish내에 난자를 옮긴 후 FCS 10% 첨가 TCM-199내로 난자를 옮겨 2~3회 세척하였다.

Petri dish내 FCS가 10%로 첨가된 TCM-199을 100 ㎕ droplet으로 만들어 paraffin oil로 도포후 난자를 15~20개씩 droplet 내에 넣었고 38.5℃, 5 % CO_2 조건하에서 20~22시간 동안 체외성숙시켰다.

2) 체외수정/수정란 체외배양

동결 정액 straw를 37℃의 water bath내에서 30초간 융해후 3 mM의 caffein benzoate(Sigma)와 10 ㎍/ml의 heparin(Sigma)이 첨가된 세척용 BO액(Brackett & Oliphant)을 첨가하여 500 g에서 5분간 2회 원심분리하였다. 원심분리액의 상층액을 제거한 후 최종 정자농도가 5×10^6 /ml이 되도록 다시 BO액을 첨가하여 이중 100 ㎕를 취하여 droplet을 만들어 mineral oil로 도포하였다.

20~22시간 동안 성숙배양시킨 난자들을 꺼내 체외수정용 BO액으로 2~3회 세척후 정자 droplet에 넣어 38.5℃, 5% CO_2 Incubator에서 5~6시간 동안 체외수정시켰다.

체외수정 반응후 FCS 10% 첨가 TCM-199로 난자를 세척하였고 난자 성숙시 사용된 droplet내로 다시 옮겨 난구세포와 공배양하면서 7~9일간 38.5℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양시켰으며 수정란의 발달을 도와주기 위하여 체외수정 24시간 후에 수정란과 난구세포를 분리시켜 주었고, 24시간 마다 배양액의 1/2을 신선한 배양액으로 교환하여 주었다.

3) 체외수정란의 동결

1.8M의 ethylene glycol을 사용하여 직접이식법을 위한 동결방법으로 동결하였고 LN_2 탱트내에 보존하였다.

4) 체외수정란의 PCR기법에 의한 성감별

(1) 공시 수정란

신선수정란은 체외수정란중에서 배양후 7~9일에 초기배반포 (early blastocyst) 단계 이상으로 성장한 것을 이용하였고, 동결수정란은 융해한 후 TCM-199 배지에서 12시간 배양하여 확장배반포 (expanded blastocyst) 단계 이상으로 발달한 수정란을 공시하였다.

(2) 수정란 성감별을 위한 primer와 genomic DNA의 준비

성감별 실험에 사용된 primer는 bovine male-specific primer는 BRY.1(Bovine repeat, Y-associated)으로서 그 염기 서열은;

forward primer는 5'-GGATCCGAGACACAGAACAG-3',

reverse primer는 5'-CACGCTAATCCATGCATCCT-3'

이었고, 증폭된 PCR product의 크기는 304 nucleotides이었다.

소의 암·수의 혈액중 buffy coat로부터 genomic DNA purification kit(Promega®)를 이용하여 각각의 male과 female 대조군의 genomic DNA를 추출하였다.

또한 UV/spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 control로 사용할 genomic DNA의 농도를 10 ng이 되도록 희석하여 사용전까지 4℃에서 보관하였다.

(3) 수정란의 생검/배양

Petri dish 안에 sucrose가 0.2 M로 첨가된 PBS (Ca^{++}, Mg^{++} free)로 50 ㎕의 droplet을 만든 후 체외수정란을 droplet내에 옮겨 inverted microscope(Nikon)에 부착된 micromanipulator (Narishige) 및 blade(Bio-Cut, Feather Safety Razor Co., LTD)를 이용하여 수정란의 ICM(inner cell mass) 부분의 반대극에서 10~40%를 생검하였다(Fig. 1).

생검된 수정란중 ICM부분은 체외 성숙 배지인 TCM-199 droplet내에서 1~2시간 동안 배양하였고(Fig. 2), 나머지 절단된 부분은 PCR기법을 이용한 성감별에 공시하였다.

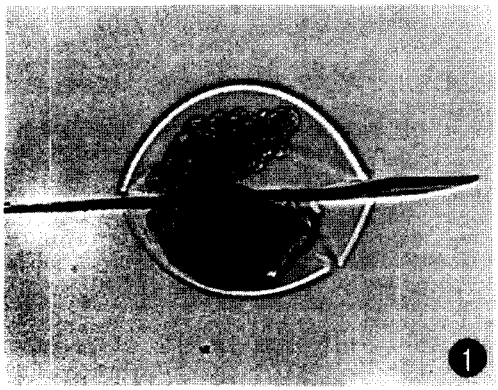

Fig. 1. A bovine embryo biopsied into two parts. Inverted microscope × 200.

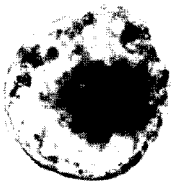

Fig. 2. A biopsied frozen/thawed embryo incubated for 3 hours in TCM-199 after biopsy. Fully recovered blastocoele and trophectoderm Inverted microscope × 200.

(4) PCR기법에 의한 성감별

PCR을 위해 생검된 수정란 일부세포를 mineral oil이 도포된 4 ㎕의 embryo lysis buffer(ELB : 20 mM Tris, 0.9% Tween 20, 0.9% Nonidet, 0.4 ㎎/ml proteinase K)가 들어있는 PCR tube에 넣고 55℃에서 30분간 처리하고 DNA thermal cycler(Ericomp)를 이용하여 95℃에서 15분간 처리하여 수정란의 DNA를 추출하였다.

PCR을 위한 반응액(10×Reaction buffer, 25 mM $MgCl_2$, 25 mM dNTPs, 10 pmol primer, 5 IU Taq DNA Polymerase)을 수정란이 들어있는 tube에 혼합한후 증류수를 첨가하여 50 ㎕가 되도록 하였다.

PCR 반응조건은 94℃에서 3분간 primary denaturation을 실시하였고, denaturation, annealing, extension을 각각 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간 35 cycle을 수행하였고 마지막 extension은 72℃에서 10분간 실시하였다.

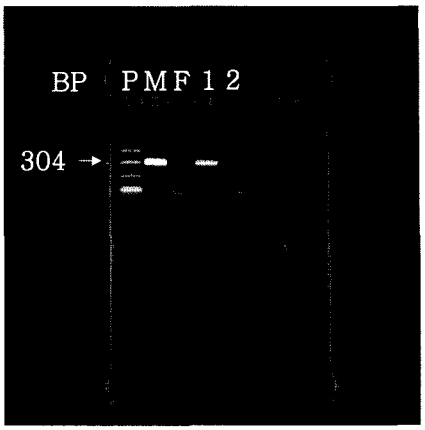

Fig. 3. Agarose gel electroporesis of PCR products from Hanwoo embryos.
P : PCR marker(Molecular size marker)
M : genomic DNA from blood sample of male cattle, positive control
F : genomic DNA from blood sample of female cattle, negative control
Lane 1 : male
Lane 2 : female

증폭된 PCR product의 size를 확인하기 위해서 PCR product 10 ㎕에 loading dye 2 ㎕를 혼합하여 2% agarose gel의 slot에 넣고 120 V에서 40분간 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide(0.5 ㎍/ml)로 염색하여 UV transilluminator하에서 관찰하여 304 bp band 유무에 따라 수정란의 성을 판정하였다(Fig. 3).

(5) 수정란 이식

PCR과정을 위해 공시된 수정란 세포를 제외한 나머지 수정란을 TCM-199에서 1~2시간 배양한 후 straw에 장착하여 한우 49두와 젖소 16두에 이식하였다.

4. 수정란의 이식 조건에 따른 수태율 비교/조사

1) 수란우 품종간 수태율 비교

한우 49두와 젖소 16두에 성감별 수정란을 이식 후 수태율을 비교하였다.

2) 신선 수정란과 동결 수정란의 이식후 수태율 비교

신선 수정란은 성감별 처리후에 이식하였고, 동결수정란은 동결-융해후에 성감별 처리하여 이식하여 수태율을 비교하였다.

3) 이식계절에 따른 수태율 비교

성감별 수정란을 봄(3~5월), 여름(6~8월), 가을(9~11월), 겨울(12~2월)에 각각 17, 17, 21, 10두에 이식하여 계절간 수태율을 비교하였다.

4) 수정란의 성감별 처리를 위한 생검후 회복율에 따른 수태율 조사

체외 수정란을 생검후 회복상태에 따라 각각 excellent(생검후 완전 회복된 상태), good(생검후 대부분 회복된 상태), fair(생검후 반정도 회복된 상태)군으로 나눠 각각의 이식후 수태율을 비교하였다.

5) 수란우의 자궁각 두께에 따른 수태율 비교

직장 검사를 통해 자궁각의 중심부의 두께를 엄지와 중지를 이용하여 측정하여 0(직경이 1.5 cm 이하), +(직경이 2.5 cm 정도), ++(직경이 3 cm 정도), +++(직경이 4 cm 이상)군으로 나누어 이식에 따른 수태율을 비교하였다.

6) 수정란의 자궁내 이식부위에 따른 수태율 비교

수정란 이식시 수정란의 주입은 황체가 존재하는 방향의 수란우의 자궁각을 선단부(cranial part), 중간부(mid part), 미부(caudal part)로 구분하여 부위에 따른 이식후 수태율을 비교하였다.

7) 수란우의 황체 상태에 따른 수태율 비교

수란우의 황체상태를 excellent(황체가 crown을 형성하고, 완전 성장한 상태), good(황체가 난소표면에 돌출되고, 크기가 중간 정도인 상태), poor(단순히 황체가 인정되는 상태)군으로 구분하여 수정란 이식후 수태율을 비교하였다.

8) 수정란을 straw에 장착한 후 수란우에 이식시까지 소요된 시간에따른 수태율 비교

성감별 수정란을 straw에 장착한 후 이를 수란우에 이식시까지 10, 15, 20, 25, 30분 경과에 따른 수태율을 비교하였다.

9) 수란우의 산차에 따른 수태율 비교

초산에서 4산까지의 각 산차에 따른 수란우의 수정란 이식후 수태율을 비교하였다.

결 과

PCR 기법에 의해 성감별된 수정란의 성비와 이를 이식하여 생산된 산자의 성비는 Table 1과 같다.

Table 1에서와 같이 PCR에 의해 성감별된 총 65개의 수정란중 male로 판정된 수정란은 35개, female로 판정된 수정란은 30개 였으며, 이를 수란우에 이식한 후 분만된 14두의 산자중 수컷은 6두, 암컷 8두였다. 분만된 산자의 성은 PCR에 의한 성판정과 모두 일치하여 PCR 기법에 의한 성감별 정확도는 100.0%를 나타내었다.

Table 1. Sex ratio of embryos determined by PCR and sex of calves delivered after ET

Total no. of sexed embryos	Sex by PCR		Total no. of offspring by ET with sexed embryos	Sex of calves		Rate of accuracy compared by PCR(%)
	Male	Female		Male	Female	
65	35	30	14	6	8	100.0

ET : Embryo transfer.

Table 2. Result of ET with sex-determined Hanwoo embryos transferred to two different recipient breeds

Recipient breed	No. of animals	Result of ET	
		Offspring delivered(%)	No offspring delivered(%)
Hanwoo	49	12(24.49)	37(75.51)
Holstein	16	2(12.50)	14(81.50)
Total	65	14(21.54)	51(78.46)

ET : Embryo transfer.

Table 3. Result of ET with fresh or frozen-thawed Hanwoo embryos which were sex determined

Embryo	No. of ET	Result of ET	
		Offspring(%)	No offspring(%)
Fresh	51	12(23.53)	37(76.47)
Frozen-thawed	14	2(14.29)	12(85.71)
Total	65	14(21.54)	51(78.46)

ET : Embryo transfer.

성감별된 체외수정란의 수란우 품종간 이식후 수태결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서와 같이 한우는 수란우 49두중 12두가 수태되어 24.3%를, 젖소는 수란우 16두중 2두가 수태되어 12.5%의 수태율을 나타내어 한우에서 더 높은 수치를 나타내었고, 전체 수태율은 21.5%를 나타내었다.

신선 수정란과 동결-융해 수정란의 이식후 수태결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서와 같이 신선 수정란은 수란우 51두중 12두가 수태되어 23.53%를, 동결 수정란은 수란우 14두중 2두가 수태되어 14.29%를 나타내어 신선 수정란에서 더 높은 수치를 나타내었다.

성감별 수정란의 이식 계절에 따른 수태결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서와 같이 봄, 여름, 가을, 겨울에 각각 17, 7, 21, 10두의 수란우에 이식되었고 각각의 수태율은 11.8, 29.4, 23.4, 20.0%를 나타내어 여름에 이식된 경우에서 가장 높은 수치를 나타내었다.

성감별을 위한 수정란의 생검후 회복율에 따른 수태결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Result of ET with Hanwoo sexed embryos according to quality of embryos recovered after biopsy

Quality of embryo	No. of ET	Result	
		Offspring (%)	No offspring(%)
E	12	5(41.67)	7(58.33)
G	30	9(30.00)	21(70.00)
F	23	0(0.00)	23(100.00)
Total	65	14(21.54)	51(78.46)

ET : embryo transfer.
E : excellent(totally recovered after biopsy).
G : good(mostly recovered).
F : fair(half-recovered).

Table 4. Result of ET with Hanwoo sexed embryos among different seasons

	Season				
	Spring	Summer	Autumn	Winter	Total
No. ET	17	7	21	10	65
No. of conception	2	5	5	2	14
Rate of conception	11.76	29.41	23.38	20.00	21.54

ET : Embryo transfer.

Table 6. Result of ET with Hanwoo sexed embryos according to the size of uterine horn of recipients

Size of uterine horn	No. of ET	Result	
		Offspring (%)	No offspring(%)
0	7	5(71.43)	2(28.57)
+	37	7(18.92)	30(81.08)
++	17	2(11.76)	15(88.24)
+++	4	0(0.00)	4(100.00)

ET : embryo transfer.

Diameter of uterine horn : 0 - <1.5 cm
+ - 2.5 cm
++ - 3 cm
+++ - >4 cm

Table 5에서와 같이 회복상태에 따른 excellent, good, fair 군으로 분류한 후 각각 12, 30, 23두의 수란우에 이식하였고, 수태율은 각각 41.7, 30.0, 0.0%를 나타내었고, excellent 군에서 가장 높은 수치를 나타내었다.

수란우 자궁각의 두께에 따른 이식후 수태 결과는 Table 6과 같다.

Table 6에서와 같이 0, +, ++, +++군으로 분류한 후 각각 7, 37, 17, 4두의 수란우에 이식하였고, 수태율은 각각 71.4, 18.9, 11.8, 0.0%를 나타내었고, 0군에서 가장 높은 수치가 나타났다.

성감별 수정란의 자궁내 이식부위에 따른 수태

Table 7. Result of ET with Hanwoo sexed embryos according to the transfer site of uterine horn of recipients

Site of uterine horn	No. of ET	Result	
		Offspring (%)	No offspring(%)
Cranial	20	6(30.00)	14(70.00)
Mid	35	7(20.00)	28(80.00)
Caudal	10	1(10.00)	9(90.00)

ET : embryo transfer.

Table 8. Result of ET with Hanwoo sexed embryos according to the quality of corpus luteum of recipient

Quality of C.L	No. of ET	Result	
		Offspring(%)	No offspring(%)
E	17	7(41.18)	10(58.2)
G	35	5(14.29)	30(85.71)
P	13	2(15.38)	11(84.62)

ET : embryo transfer, CL : corpus luteum.

Quality of embryos : E - excellent(crown-shaped, fully grown).
G - good(protruded, half size).
P - poor(C.L recognizable).

결과는 Table 7과 같다.

Table 7에서와 같이 황체가 존재하는 방향의 자궁각의 cranial, mid, caudal 부위로 분류하여 각각 20, 35, 10두의 수란우에 수정란이 이식되었고 수태율은 각각 30.0, 20.0, 10.0%을 나타내었고, cranial part에 이식된 군에서 가장 높은 수치를 나타내었다.

성감별 수정란의 이식시 수란우의 황체상태에 따른 수태결과는 Table 8과 같다.

Table 8에서와 같이 excellent, good, poor 군으로 분류한 후 각각 17, 35, 13두의 수란우에 수정란이 이식되었고 수태율은 각각 41.2, 14.3, 15.4%를 나타내어, excellent군에서 가장 높은 수치를 나타내었다.

성감별된 수정란을 straw에 장착한 후 수란우에 이식시까지 소요된 시간에 따른 수태결과는 Table 9와 같다.

Table 9에서와 같이 10분, 15분, 20분, 25분, 30분 소요군으로 분류하여 각각 10, 15, 20, 25두의 수란우에 수정란이 이식되었고 수태율은 각각 18.2, 30.0, 30.0, 0.0, 25.0%를 나타내었고, 15분과 20분 소요군에서 가장 높은 수치를 나타내었다.

수란우의 산차에 따른 수태결과는 Table 10과 같다.

Table 10에서와 같이 1산차, 2산차, 3산차, 4산

Table 9. Result of ET with Hanwoo sexed embryos according to the time-elapse for transfer after loading the embryo into straw

	Time required for transfer(min.)					Total
	10	15	20	25	30	
No. ET	22	20	10	9	4	65
Offspring(%)	4(18.18)	6(30.00)	3(30.00)	0(0.00)	1(25.00)	14
No. of offspring	18(81.82)	14(70.00)	7(0.00)	9(100.00)	3(75.00)	51

ET : embryo transfer.

Table 10. Result of ET with Hanwoo sexed embryos according to the parity of recipient

Parity of recipient	No. of ET	Result	
		Offspring (%)	No offspring(%)
Nulliparous	0	0	0
Primiparous	34	9(26.47)	25(73.58)
2nd parous	21	4(19.05)	17(80.95)
3rd parous	7	1(14.29)	6(85.71)
4th parous	3	0.(0.00)	3(100.00)

ET : Embryo transfer.

차로 수란우를 분류하여 각각 34, 21, 7, 3두에 수정란이 이식되었고, 수태율은 각각 26.5, 19.1, 14.3, 0.0%를 나타내었고, 1산차 수란우에서 가장 높은 수치를 나타내었다.

고 찰

성감별된 한우 수정란을 한우와 젖소에 이식시 수태율은 한우에서 젖소보다 높은 수치를 나타내었다. 이는 생검을 하지 않은 신선 수정란과 동결-융해란 이식시 비육우가 젖소보다 높은 수태율을 보고한 John(2001)의 결과와 유사하게 나타났다.

한우 체외수정란에서 신선 수정란과 동결-융해 수정란의 생검후 이식시 수태율은 각각 23.53, 14.29%를 나타내어 신선 수정란의 수태성적이 더 높게 나타났다.

신선 수정란의 생검후 이식시 수태율은 Utsumi 등(1993)은 38.8%, Shea(1999)는 58%, Itagaki 등(1993)은 43%, 김 등(2000)은 22.6%로 보고하였고, 동결-융해란을 생검후 이식시 Shea(1999)는 37%, Kameyama 등(1996)은 15.1%, 김 등(2000)은 20%의 수태율을 보고하여 본 연구의 결과는 김 등(2000)의 결과와 유사하였고 다른 연구자들의 보고에서 보다 낮은 편이었다. 이와 같은 결과는 수란우의 가임능력 상태와 이 실험에서 사용된 수정란은 모두 체외수정란이었던 점이 요인이 될 수 있는 것으로 추측된다. 이 연구에서 동결-융해 수정란의 수태율이 낮게 나타난 것은 동결-융해과정 중 발생되는 수정란의 손상이 수태율에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 동결-융해란의 수태율을 높이기 위해서는 동결-융해시 생존성을 높일 수 있는 방법이 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

이 연구에서는 여름에 성감별 수정란 이식시 가장 높은 수태율을 나타낸 수치를 보였으나, John (2001)은 이식 계절에 따른 수태율이 상호간에 유의성이 없다고 보고하였다. 이 연구에서 여름, 가을, 겨울에 이식된 수태율이 서로 비슷한 수치였고 봄에 이식된 경우 낮은 수치여서 계절에 따른 기온 스트레스를 예상할 경우 다소 상반된 결과를 나타낸 것과 이식 두수의 범위가 7~21두로 변동이 큰점으로 볼 때 John(2001)의 보고와 같이 계절에 따른 유의성은 없을 것으로 사료된다.

이 연구에서 수정란의 생검후 회복상태가 좋을수록 높은 수태율을 나타냈는데 이는 John(2001)이 수정란의 상태가 좋을수록 이식후 높은 수태율을 보고한 것과 유사한 결과이며, 이식시 수정란의

상태가 수태율과 밀접하게 연관이 있음을 알 수 있다.

이 연구에서 성감별 수정란의 이식시 수란우 자궁내 주입 부위가 자궁각 선단부일 경우 가장 높은 수태율을 나타냈는데 이것은 이식된 수정란이 팽대 배반포이며 이 배반포가 자궁내 존재하게 되는 부위와 일치하기 때문인 것으로 판단된다. 이 결과를 통해 이식시 되도록 catheter를 자궁내 선단부로 깊이 삽입하여 이식하여야 좋은 수태율을 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다.

이 연구에서 수란우의 황체 상태에 따른 수태율은 excellent군에서 가장 높은 수태율(41.2%)을 나타내었다. 이는 Dochi등[6]이 수정란 이식시 excellent 황체의 경우 45.9%의 수태율을 보고한 결과와 유사하다. 그러나, 수태율과 수란우 황체 상태 사이에는 상관관계가 없다는 보고(Elsden, 1988; Looney 등, 1984; Nagao 등, 1993)도 있으며, 오히려 황체 상태보다 이식 당일 혈중 progesterone 농도가 수태에 영향을 더 미친다는 보고(Nagao 등, 1993)도 있다. Humblot 등(1987)은 직장검사를 통한 황체 촉진으로 황체의 기능을 평가하는 것이 수정란 이식전 수란우의 상태를 평가하는데 적합하지 않다고 보고하였다. 그러나 이 연구에서 good과 fair군에서 각각 5두, 2두의 수태가 인정되었으나 이식된 두수에 비해 각각 14.3과 15.4%의 낮은 수태율은 excellent군의 경우 41.2%의 수태율과 크게 비교가 된다고 하겠다. 따라서 수란우의 황체 상태는 Remsen과 Rousell(1982)의 보고에서의 혈중 progesterone 농도를 가늠할 수 있는 중요한 지표가 되므로 간과할 수 없는 중요한 조건이며, 특히 실제 이식 현장에서는 중요한 임상적 판단 조건이라고 판단된다.

이 연구에서 수정란을 straw에 장착후 이식시까지 소요되는 시간이 30분이 소요된 경우에도 수란우 4두중 1두가 수태되어 25%의 수태율을 보여 30분까지도 가능한 것을 보였으나 이 연구에서 20분 이내일 때 높은 수태율을 나타내었으므로 수정란이 이식을 위해 준비된 후 되도록 빨리 수란우에 이식되어야 좋은 수태성적을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

이 연구에서는 미경산우를 수란우로 사용하지 않은 상태에서 1산차 수란우가 가장 높을 수태율을 나타내었다. 이는 Dochi 등[6]이 수란우가 미경산우일 때 또 수란우 산차가 적을수록 높을 수태율을 보고한 것과 유사한 결과이다. 한편, 경산우와 미경산우 사이의 수태율에는 상관관계가 없다는 주장[28]과 미경산우가 경산우보다 자궁강이 좁기 때문에 수태율이 낮다는 견해[21]도 있다. 그러나 이 연구의 결과는 우리나라의 소 사육여건상 산차가 적은 경산우가 산차가 많은 수란우보다 자궁 질병 및 기타 질병에 노출이 적고 신체적으로 노령우에 비해 더 건강한 상태이므로 보다 건강한 자궁을 가지고 있기 때문인 것으로 판단되어 성감별 수정란 이식시 수란우로 더 적합할 것으로 사료된다.

또한, 수란우의 산차가 많을수록 자궁이 비후되므로 상기의 결과는 이 연구에서 자궁각의 직경 크기가 적을수록 좋은 수태 성적을 나타낸 Table 6에서의 결과와 밀접한 연관성이 있는 결과인 것으로 사료된다.

상기 결과들을 종합해 볼 때 성감별된 수정란 이식시 높은 수태율을 얻기 위해서는 가능한 신선 수정란을 이용하고 수정란의 생검후 회복상태가 양호한 수정란을 가능한 빠른 시간 내에 수란우의 자궁각 선단부에 이식해야 하며, 되도록 분만 경험이 적고 황체 상태가 좋은 수란우를 선택해야 한다는 것을 알 수 있었다.

적 요

체외수정된 한우 수정란을 PCR 기법에 의한 성감별을 위해 생검하여 회복시까지 1~2시간 동안 배양하였다.

이 성감별된 한우 수정란을 2000년 2월부터 2001년 2월까지 한우 49두와 젖소 16두에 이식하였다. 수정란이 이식된 65두의 수란우중 14두(한두 12두, 젖소 2두)가 성감별 결과와 동일한 성의 산자를 생산하였고, 전체 수태율은 21.5%를 나타내었다.

1. 총 65두의 수란우중 웅성 수정란은 35두에 자성 수정란은 30두에 이식되었고 이중 분만된 산자 14두중 웅성은 6두, 자성은 8두였으며 PCR에 의한 성감별 정확도는 100.0%를 나타

내었다.

2. 성감별된 한우 수정란은 한우와 젖소에 이식한 후 수태율은 각각 24.5, 12.5%를 나타내었다.
3. 성감별된 한우의 신선수정란과 동결-융해된 수정란의 이식후 수태율은 각각 23.5, 14.3%를 나타내었다.
4. 성감별된 한우 수정란의 이식 시기에 따른 수태율은 봄, 여름, 가을, 겨울에 각각 11.8, 29.4, 23.4, 20.0%를 나타내었다.
5. 성감별된 한우 수정란의 상태에 따른 이식후 수태율은 excellent, good, fair군에서 각각 41.7, 30.0, 0.0%를 나타내었다.
6. 성감별된 한우 수정란의 이식시 수란우의 자궁각 두께에 따른 이식후 수태율은 0, +, ++, +++군에서 각각 71.4, 18.9, 11.8, 0.0%를 나타내었다.
7. 성감별된 한우 수정란이 주입된 수란우 자궁각 부위에 따른 이식후 수태율은 자궁각 선단부, 중심부, 미부에서 각각 30.0, 20.0, 10.0%를 나타내었다.
8. 성감별된 한우 수정란의 이식시 수란우의 황체의 상태에 따른 이식후 수태율은 excellent, good, poor군에서 각각 41.2, 14.3, 15.4%를 나타내었다.
9. 성감별된 한우 수정란을 straw에 장착후 이식시까지 10, 15, 20, 25, 30분 경과에 따른 이식후 수태율은 18.2, 30.0, 30.0, 0.0, 25.0%를 나타내었다.
10. 성감별된 한우 수정란의 이식시 수란우의 산차에 따른 이식후 수태율은 1산차, 2산차, 3산차, 4산차에서 각각 26.5, 19.1, 14.3, 0.0%를 나타내었다.

이상의 결과에서 성감별된 수정란의 이식시 양호한 수태율을 얻기 위해서는, 신선수정란이 동결수정란 보다 유리하다는 점과 생검후 수정란의 회복상태, 수란우의 자궁각 두께, 수정란의 수란우 자궁각 주입부위, 수란우의 황체 상태, 이식시까지 소요시간, 수란우의 산차를 고려해야 한다는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

Agrawala PL, Wagner VA and Geldermann H. 1992. Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. Theriogenology, 38 :969-978.

Avery B, Bak A and Schmidt M. 1989. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. Theriogenology, 32:139-147.

Binor Z, Rao R and Hans van der Ven, *et al.* 1982. The effect of albumin gradients and human serum on the longevity and fertilizing capacity of human spermatozoa in the hamster ova penetration assay. Fertil. Steril., 38:222-226.

Brandriff BF, Gordon LA and Haendel S, *et al.* 1986. Sex chromosome ratio determined by karyotypic analysis in albumin isolated human sperm. Fertil. Steril., 46:678-685.

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

Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N and Maeda J, *et al.* 1998. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. Theriogenology, 49: 1051-1998.

Elsden RP. 1988. Success rate with cryopreserved bovine embryos. In: Seidel GE Jr(ed). Techniques for freezing mammalian embryos short course proceedings. Fort Collins: Colorado State University, 76-81.

Esptein CJ, Smith S and Travis B, *et al.* 1978. Both X- chromosomes function before visible W-chromosome inactivation in female mouse embryos. Nature, 274:500-503.

Humblot P, Perrin J, Jeanguyot N, Nibart M and

Thibier M. 1987. Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function of pregnancy rates of bovine embryo recipients. Theriogenology, 27:240.

Itagaki Y, Kimura N and Yamanaka M, *et al.* 1995. Developmental rate differences and sex of bovine preimplantation embryos generated *in vitro*. J. Mamm. Ova. Res., 12:73-78.

Itagaki Y, Kimura N and Yamanaka, *et al.* 1996. PCR sexing and survival following embryo biopsy-bisection of *in vitro* produced bovine embryos. J. Mamm. Ova. Res., 13:48-51.

Itagaki Y, Sato S and Shitanaka Y, *et al.* 1993. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex. J. Reprod. Dev., 39:65-72.

Iwaskai S and Nakahara T. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. Theriogenology, 33:669-675.

John FH. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. Theriogenology, 56:1401-1415.

Kaneko S, Yamaguchi J and Kobayashi T, *et al.* 1983. Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. Feril. Steril., 4:661-665.

Kameyama K, Numabe T, Sekizawa F and Takada N, *et al.* 1996. Direct transfer of bovine frozen-thawed embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. Theriogenology, 45;45:227.

King WA. 1984. Sexing embryos by cytological methods. Theriogenology, 21:7-17.

Kudo T, Sato S and Sutou S. 1993. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction : Cloning and characterization of bovine male-specific repetitive DNA. Reprod. Develop., 39:55-63.

Landa CA, Almouist JI and Amann RP. 1980. Factors influencing Sephadex separation of bovine and ovine spermatozoa. J. Dairy. Sci., 63:277-282.

Looney CR, Oden AJ, Massey JM, Johnson CA and Godke RA. 1984. Pregnancy rate following hCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. Theriogenology, 21:246.

Nagao Y, Saeki K, Hoshi M and Kainuma H. 1993. Effect of oxygen concentration on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in a protein-free medium. Theriogenology, 9:273.

Newcomb R and Rowson LEA. 1980. Investigation of physiological factors affecting non-surgical transfer. Theriogenology, 13:41-19.

Remsen LG and Roussel JD. 1982. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. Theriogenology, 18:365-372.

Schenk JL, Suh TK and Cran DG, Seidel GE Jr. 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. Theriogenology, 52(8):1375-1391.

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

Utsumi K, Hayashi M and Takakura R, *et al.* 1993. Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos. Mol. Reprod. Develop., 34:25-32.

Williams TJ. 1986. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase. Theriogenology, 25:733-739.

Wright JM. 1981. Nonsurgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interaction. Therioge-

nology, 15:34-56.
김용준, 정구남, 이해이, 조성우, 김용수, 유일정. 2000. 한우 체외수정란 Biopsy 후 PCR 기법을 이용한 성 판정과 성감별 수정란의 이식. 한국수정란이식학회지, 15(3):219-230.
박영일, 임경순, 한재용 등. 1996. Y 염색체 특이성 DNA 분리와 단일 H-Y 항체 개발에 의한 토끼의 수정란 성감별에 관한 연구 I. 정소를 항원으로한 H-Y 항혈청에 의한 토끼 수정란의 성판별. 한국가축번식학회지, 20:53-63.
송시한, 박충생, 송한현. 1996. Y 염색체 특이성 DNA 분리와 단일 H-Y 항체 개발에 의한 토끼의 수정란 성감별에 관한 연구 I. 정소를 항원으로한 H-Y 항혈청에 의한 토끼 수정란의 성판별. 한국가축번식학회지, 20:53-63.
유일정, 김용준, 이경광. 1999. 햄스터 H-Y항체와 중합효소연쇄반응을 이용한 소 수정란의 성감별. 대한수의학회지, 39 (1):189-203.
이상영, 양부근, 김정익. 1987. Mouse 초기배의 발육속도에 따른 성비에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 11:218-222.

(접수일: 2002. 12. 2/ 채택일: 2003. 8. 2)