

한우 체내, 체외 및 복제 수정란이 이식된 수란우의 임신과 분만 및 산자의 생존

박 용 수[†]
경상북도축산기술연구소

Effects of Different Blastocyst Production Techniques: *In Vivo*, *In Vitro* or Nuclear Transfer, on Pregnancy, Parturition and Viability of Hanwoo

Y. S. Park[†]

Kyoungbuk Livestock Research Institute

SUMMARY

The present study was to investigate the pregnancy rate, gestation length and abortion rate of the recipients which transferred blastocysts produced by *in-vivo* collection, *in-vitro* fertilization (IVF) and nuclear transfer (NT). In addition, we investigate the birth weight and survival rate of the calves derived from the same methods. The pregnancy rate was 56.3% in *in-vivo* blastocysts, significantly higher than 19.4% in NT blastocysts ($p<0.05$) but not significantly different from 30.0% in IVF blastocysts. The abortion rate and the gestation length did not differ among the treatment groups (abortion rate: 0, 22.2 and 16.7% respectively; gestation length: 278.8, 289.4 and 281.4 days respectively). The mean birth weight was significantly higher in NT calves (39.9kg) than *in-vivo* calves (25.5kg $p<0.05$). Recipients of *in-vivo* blastocysts (n=9) had all normal delivery and all of their calves survived on the 60th day from the birth. Recipients of IVF blastocysts (n=7) had all normal delivery but one of their calves died on the 48th day from the birth. Among recipients of NT blastocysts (n=5), three had normal delivery and two had Caesarean section. Among calves born through normal delivery (n=3) two died just after delivery but those born through Caesarean section all survived on the 60th day from the birth.

(Key words : bovine, embryo transfer, pregnancy, parturition)

서 론

가축의 번식, 개량 및 질병 통제 등을 위하여 인공수정법을 비롯한 각종 생명공학 기술이 개발·발전되어, 최근에는 고능력 가축을 단기간에 대량으로 보급하기 위하여 각종 수정란 생산 및 이식이 집중적으로 연구되고 있다. 또한 복제 및 형질

전환 기법을 이용한 산업화가 시도되고 있다. 한편 인공수정에 비하여 수정란이식은 가축의 생산성 증대와 품종개량에 효과적이며, 특히 가축의 복제는 동일한 형질을 가지는 우수한 개체를 대량 생산할 수 있다는 장점이 있어서 동물 생명공학 분야의 발달을 촉진시킬 뿐만 아니라, 멸종 위기에 처한 야생동물을 보존하는 데 유용할 것이다.

[†] Correspondence : E-mail : pys0112@chollian.net

복제수정란을 비롯한 각종 수정란 생산 과정에 대한 분자생물학적인 이해와 미세조작기술의 발전으로 이식 가능한 배반포를 안정적으로 생산하게 되었으나, 그 결과물인 산자 생산율은 저조한 수준이다. 이러한 원인들 중 하나는 각종 수정란의 이식과 분만 과정에 대한 부적절한 관리라고 하였다 (Wolf 와 Zelinski-Wooten, 2001). 또한 한우에서 수정란 기술을 이용한 산업화 측면에서 건강한 송아지의 대량 생산이 필수적이지만, 대리모의 임신, 유산, 분만 시 난산과 사산 및 생산된 송아지의 성장 등과 같은 기초 자료가 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 각종 수정란 생산 및 이식의 효율 증진을 위하여, 체내, 체외 및 복제 수정란을 이식하여 대리모의 수태율, 임신기간 및 유산율을 조사하였고, 또한 생산된 자축의 생존율을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 체외수정란

도축 한우에서 난소를 적출하여 25 μ g/ml gentamycin이 첨가된 0.9% 생리식염수(25~28 $^{\circ}$ C)가 들어있는 보온병에 담아 6~7시간에 실험실로 운반하였다. 수집된 난소는 penicillin G가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하여, 18G 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2~8mm의 가시난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 실체현미경하에서 난구세포의 부착상태가 치밀한 것만을 선별하여, 50 μ l의 TCM 199 용액 (0.2mg/ml pyruvate, 10% FBS), 1 μ g/ml FSH, 10 μ g/ml LH, 1 μ g/ml Estradiol-17 β)에 15개 난포란을 옮겨 22~24시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에 배양함으로써 체외 성숙을 유도하였다.

한우 동결정액 1개를 실온에서 10초간, 37 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 30초간 처리하여 융해한 후 90% percoll, 2ml 용액이 담겨져 있는 15ml 원심분리관에 살며시 놓은 후 700g에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자피만을 회수하여, 2ml의 신선 sperm-TALP (6mg/ml BSA) 용액으로 350g에서 다시 10분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 정자농도는 25 \times 10⁶ sperms/ml가 되도록 조절

하였다. 난포란이 함유되어 있는 48 μ l의 fer-TALP (6mg/ml BSA와 10 μ g/ml heparin) 용액에 준비된 정자 2 μ l를 첨가, 최종 정자농도 1 \times 10⁶ sperms/ml가 되도록 조정하고 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 20시간 동안 체외수정을 유도하였다.

체외수정 후 15개의 수정란(배양 1일)을 CR1aa (3mg/ml BSA) 용액 50 μ l에 넣고, 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 배양 3일째부터 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액에서 난관상피세포와 공배양을 행하였으며, 배양 5일 및 7일째에 50%씩 신선 CR1aa 용액으로 교환하였다.

2. 체내수정란

선발된 공란우의 과배란 처리는 발정 확인 일을 0일로 하여 10일째부터 12시간 간격으로 4일간(8회) 50mg의 FSH (Folltropin-V, Veterpharm, Canada)를 근육 주사하였다. 발정은 FSH 주사 후 48시간째에 PGF_{2a} (Lutalyse, Upjohn) 25mg을 근육주사함으로써 유도하였다. 그리고 인공수정은 발정관찰 없이 PGF_{2a} 주사 후 48 및 60시간째에 2회 실시하였다. 인공수정 후 7일째에 비외과적 관류법으로 수정란을 회수하였다. 2% lidocaine을 제 1~3 미추 사이에 6~10ml 주사하여 경막외마취를 행하였고, 자궁각에 foley catheter를 고정시킨 후 2% FBS가 첨가된 D-PBS로 자궁을 관류하여 배반포를 회수하였다.

3. 복제수정란

복제수정란은 2001년 7월부터 2002년 11월까지 농촌진흥청 축산연구소에서 공급받은 7일째의 배반포(n=62)를 이용하였다. 복제수정란 운반은 이동용 CO₂ 배양기 (Dasol Scientific Co., Ltd)를 이용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 4시간 동안 이동하여 수란우에 이식하였다.

4. 수정란이식 및 임신진단

정상 발정주기의 7일째의 한우를 수란우로 선정하였고, 2개씩의 배반포를 일반적인 방법에 준하여 황체가 존재하는 쪽의 자궁각 선단부에 주입하였다. 임신진단은 이식 후 60일경에 직장검사법으로 행하였으며, 임신이 확인된 수란우는 60일 간격

으로 임신을 재확인하였다.

5. 분 만

분만은 정상 분만을 유도하였으며, 분만 징후가 나타나지 않는 수란우는 25mg PGF_{2α}를 근육주사하여 분만을 유도하였다. 한편 분만 유도 과정에서 난산의 징후가 발견된 수란우는 제왕절개 수술을 행하였다.

6. 통계처리

임신 기간과 송아지 체중에 대한 통계학적 분석은 SAS package(ver 8.1)를 이용하여 분산분석(GLM)을 실시하였고, 처리간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였으며, 수태율과 유산율은 χ^2 -test를 이용하였다. 유의성 검정은 $p < 0.05$ 수준에서 하였다.

결 과

체내, 체외 및 복제 수정란이 이식된 대리모의 수태율, 유산율과 임신기간 및 송아지의 체중을 조

사한 결과는 Table 1과 같다. 수태율은 체내수정란이 56.3%로서 복제 수정란의 19.4%에 비하여 유의하게 높았으나($p < 0.05$), 체외수정란과는 유의성이 인정되지 않았다. 유산율은 체내수정란이 22%로 높은 경향이었으나, 실험군 간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 임신기간은 실험군 간에 유사한 경향이었으나, 체외수정란이 이식된 수란우가 평균 289.4일로 가장 길었고, 체내수정란이 이식된 수란우가 평균 278.8일로서 가장 짧았다. 한편 송아지의 체중은 복제수정란 유래 송아지가 평균 39.9kg으로서 체내수정란 유래 송아지의 평균 25.5kg에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$).

체내, 체외 및 복제 수정란이 이식된 수란우의 분만 방법에 따른 송아지의 생존율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 체내, 체외 및 복제 수정란 이식 후 분만까지 도달한 수란우는 각각 9두, 7두 및 5두였다. 체내 수정란이 이식된 수란우는 정상 분만과 유도 분만된 것은 각각 5두 및 4두이고, 태어난 송아지는 모두 생존하였다. 체외 수정란이 이식된 수란우는 각각 5두 및 2두가 자연분만과 유도 분만하였고, 송아지는 모두 생존하였다. 그러나 복

Table 1. The pregnancy, gestation length and birth weight of the bovine blastocyst produced by nuclear transferred or *in vitro* fertilized

Source of embryo	No. / total (%) of		Gestation length (day)	Birth weight (kg)
	Pregnancy	Abortion		
<i>in vivo</i>	9/16(56.3) ^a	0/9(0.0)	278.8±1.8	25.5±0.9 ^b
<i>in vitro</i>	9/30(30.0) ^{ab}	2/9(22.2)	289.4±5.1	31.0±2.5 ^{ab}
Nuclear Transfer	6/31(19.4) ^b	1/6(16.7)	281.4±3.1	39.9±3.3 ^a

^{a,b}: Values in the same columns with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Effect of parturition methods on the viability of calves after the birth

Source of embryo	No. of recipients	No. of live / examined calves		
		Normal labor	Induced labor	C-sec ¹
<i>in vivo</i>	9	5/5	4/4	-
<i>in vitro</i>	7	5/5	2/2	-
Nuclear Transfer	5	-	1/3	2/2

¹C-sec: Caesarian section.

Table 3. Viability of calves derived from blastocysts produced by *in vivo*, *in vitro* or nuclear transfer at Day 1, 30 and 60 after parturition

Source of embryo	No. of calves	No. (%) of calves lived on Day 60	No. (%) of dead calves		
			- Day 1	- Day 30	- Day 60
<i>in vivo</i>	9	9 (100.0) ^b	-	-	-
<i>in vitro</i>	7	6 (85.7) ^{ab}	-	-	1 (14.3)
Nuclear Transfer	5	2 (40.0) ^a	2 (40.0)	1 (20.0)	-

^{ab}: Values in the same columns with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

제 수정란이 이식된 수란우는 분만 징후가 나타나지 않아 유도분만을 하였으며, 이중 2두에서 난산의 징후가 나타나 제왕절개를 실시하였다. 유도분만된 복제송아지 3두 중에서 2두는 분만직후에 사망하였으나, 제왕절개로 태어난 송아지는 모두 생존하였다.

체내, 체외 및 복제 수정란 유래 송아지의 분만 후 생존율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 체내 (n=9), 체외(n=7) 및 복제(n=5) 수정란에서 유래된 송아지로서 생후 60일까지 생존한 두수는 각각 9두, 6두 및 2두였다. 체내 수정란 유래 송아지의 생존율이 복제 수정란 유래의 송아지의 것과는 유의성이 인정되었다 ($p < 0.05$). 체외 수정란 유래 송아지 1두가 생후 48일령에 사망하였다. 복제 수정란 유래 송아지는 분만 직후에 2두가 사망하였고, 1두는 기립불능인 상태로 생후 18일령에 사망하였다.

고 찰

본 연구는 각종 수정란 생산 및 이식의 효율 증진을 위하여, 체내, 체외 및 복제 수정란을 이식하여 대리모의 수태율, 임신기간 및 유산율을 조사하였고, 또한 생산된 자축의 생존율을 검토하였다.

지난 10년간 체외 배반포의 수태율이 평균 $30 \pm 10\%$ 정도라고 하였고(Peterson과 Lee, 2003), 체내 배반포의 수태율이 체외의 것보다 높다고 보고하였으나(Hasler 등, 1995; Enright 등, 2000), 차이가 없다는 보고도 있다(Lonergan 등, 1999). 한편, Sakaguchi 등(2000)은 복제수정란을 이식하여 25%

의 수태율을 보고하였다. 본 실험 결과도 이전의 보고와 유사한 경향으로서, 체내 배반포의 수태율이 56.3%로서 가장 높았으며, 특히 복제수정란의 19.4%와는 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$).

Sakaguchi 등(2000)은 복제수정란이 이식된 수란우가 임신 223일에 유산이 나타났음을 보고하였다. 본 연구에서 체내 수정란은 유산이 나타나지 않았으나, 체외수정란은 임신 120~180일 사이에 1두가 유산하였다. 한편 복제수정란이 이식된 수란우 1두는 임신 235일령에 유산하였으며, 유산 태아는 체중이 6.3kg으로서 동일 연령의 한우 태아 체중인 12~13kg에 비하여 낮은 수준이었다. 이러한 원인은 유산된 수란우가 임신 6개월 령부터 양수과다증 증상이 나타났고, 이에 따라 태아의 발육이 느린 것으로 생각된다.

체외 생산된 배반포에서 유래된 송아지의 체중이 체내의 것과 비교하여 무거웠으며 (Farin과 Farin, 1995) 임신기간도 길다 (Behboo 등, 1995)고 하였다. 한편 복제수정란에서 유래된 송아지의 체중이 37~50kg, 임신기간은 286~295일이었고(Sakaguchi 등, 2000), Wilson 등(1995)은 복제 송아지의 체중이 수정란이식 또는 인공수정 송아지보다 20% 이상 크고, 체중의 변이가 4배~12배까지로 심하다고 하였다. 또한 체외수정과 체세포 복제 유래 수정란의 이식은 수태율이 현저히 낮을 뿐만 아니라 산자의 대부분이 과도한 체중(large offspring syndrome)을 나타낸다고 하였다(Wrenzycki 등, 2004). 본 실험 결과도 이전의 보고와 같이 복제 수정란 유래 송아지의 체중이 평균 39.9kg으로서 large offspring syndrome의 경향을 나타냈으며, 이것은

체내 수정란 유래의 송아지에 비하여 유의하게 높았다($p<0.05$).

임신기간은 체내, 체외 및 복제 수정란이 이식된 수란우에서 각각 평균 278.7, 289.4 및 281.4일로서 유사한 경향이었다. 본 실험에서 복제수정란이 이식된 수란우는 유도분만을 실시하였기 때문에 임신기간이 체내수정란이 이식된 수란우와 비슷하였다. 그러나 비슷한 임신기간에도 불구하고 송아지의 체중은 복제 송아지가 체내 송아지에 비하여 유의하게 높았다($p<0.05$). 따라서 복제수정란 유래의 송아지 체중은 임신 기간과 관계가 없는 것으로 생각된다.

체외 생산된 배반포의 이식 후 유산율과 사산율이 체내의 것보다 높은 경향인 것을 보고하였고(Sakaguchi 등, 2002; Young 등, 1998), Sakaguchi 등(2000)은 유도분만과 제왕절개를 통하여 복제송아지 분만을 성공하였다고 보고하였다. 본 실험에서 복제 수정란 유래 송아지가 유도분만으로 1두, 제왕절개로 2두가 태어났으나, 제왕절개로 태어난 1두는 전지의 기형으로 인하여 기립불능인 상태였다. 분만 직후에 사망한 복제송아지 2두에 대한 부검과 병성감정에서 특이한 이상은 없었으며, 그 원인은 분만 과정의 부적절한 처치인 것으로 생각된다. 따라서 복제송아지의 생존율 향상을 위해서는 분만 과정에 나타나는 난산과 같은 이상을 제왕절개를 통해서 극복한다면 효과적일 것으로 사료된다.

각종 수정란 유래의 송아지 중에서 생후 60일 이후까지 생존한 두수는 체내, 체외 및 복제에서 각각 9두, 6두 및 2두로서 체내 수정란이 복제 수정란에 비하여 유의하게 높은 경향이었다($p<0.05$). 복제수정란에서 유래된 송아지 2두가 분만 직후에 폐사하였으며, 1두는 생후 18일째에 사망하였다. 한편 체외 수정란 유래의 송아지 7두 중에서 6두가 생후 60일령까지 생존하였으나, 1두는 생후 45일령에 사망하였다.

이상의 결과로부터 생명공학 연구의 결과물인 자축의 생존율을 높이기 위해서는 수태율을 향상을 위한 고품질의 배반포 생산 연구와 더불어 임신유지 및 분만과정에 대한 적절한 관리가 동시에 수반되어야 한다고 생각된다.

적 요

본 연구는 체내, 체외 및 복제를 통하여 각각 생산된 배반포를 이식하여, 수란우의 수태율, 임신기간 및 유산율과 더불어 송아지의 생시 체중과 이후 생존율을 조사하였다. 그 결과, 수태율은 체내 수정란이 56.3%로서 복제 수정란의 19.4%에 비하여 유의하게 높았으나 ($p<0.05$), 체외수정란의 30.0%와는 유의성이 인정되지 않았다. 유산율과 임신기간은 처리군 간에 유사한 경향이었다(유산율 0, 22.2 및 16.7%; 임신기간 278.8, 289.4 및 281.4일). 한편 송아지의 체중은 복제수정란에서 유래된 송아지의 평균 39.9kg은 체내수정란에서 유래된 송아지의 평균 25.5kg에 비하여 유의하게 높았다 ($p<0.05$). 체내수정란이 수태된 수란우($n=9$)는 모두 정상 분만하였으며, 그 송아지는 생후 60일령까지 모두 생존하였다. 한편 체외수정란이 수태된 수란우($n=7$)도 모두 정상 분만하였으나, 그 송아지 가운데 1두는 생후 48일에 사망하였다. 복제 수정란이 수태된 수란우($n=5$)는 정상 분만 3두 및 제왕절개 2두를 하였다. 정상 분만된 복제송아지($n=3$) 중에서 2두는 분만 직후 사망하였으나, 제왕절개로 태어난 송아지는 생후 60일까지 모두 생존하였다.

참고문헌

- Behbooi E, Anderson GB, Bondurant RH, Cargill SL, Kreusher BR, Medrano JF and Murlay JD. 1995. Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 44:227-232.
- Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X and Boland MP. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 54:659-673.
- Farin PW and Farin CE. 1995. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. *Biol. Reprod.*, 52:676-682.

- Hasler JF, Henderson WB and Hurtgen PJ. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF-embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-152.
- Loneragan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P and Boland MP. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 117:159-167.
- Peterson AJ and Lee RSF. 2003. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology*, 59:687-697.
- Sakaguchi M, Yotsushima K, Kakei T, Nakahara H, Takahashi S, Imai H and Izaike Y. 2000. Cloned calves produced by transfer of reconstituted embryos derived from fibroblast cells of a female fetus. *J. Reprod. Dev.* 46:265-269.
- Sakaguchi M, Geshi M, Hamano S, Yonai M and Nagai T. 2002. Embryonic and calving losses in bovine mixed-breed twins induced by transfer of *in vitro*-produced embryos to bred recipients. *Anim. Reprod. Sci.*, 72:209-221.
- Wilson JM, Williams JD, Bondioli KR, Looney CR, Westhusin ME and McCalla DF. 1995. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear and natural mating. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:73-83.
- Wolf DP and Zelinski-Wooten M. 2001. Assisted fertilization and nuclear transfer in mammals. Human Press Inc. New Jersey. pp. 3-20.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lemme E, Korsawe K and Niemann H. 2004. Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83: 593-603.
- Young LE, Kevin D, Sinclair KD and Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, 3:155-163.

(접수일: 2004. 8. 3 / 채택일: 2004. 10. 11)