

한우 수정란의 Biopsy 후 배발달율과 동결-융해후 생존성 및 성비

조상래 · 최선호 · 김현종 · 최창용 · 진현주 · 조창연 · 손동수

농촌진흥청 축산연구소

Survival Rate, Developmental Competence and Sex Ratio of Post-thawed Hanwoo Embryo Following Biopsy

S. R. Cho, S. H. Choi, H. J. Kim, C. Y. Choe, H. J. Jin, C. Y. Cho and D. S. Son

National Livestock Reserch Institute, RDA

ABSTRACT

The present study was to conducted the sexing efficiency and accuracy of bovine embryo by LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) method, the development of the biopsied embryos into re-formation and the freezability of these blastocysts by slow-freezing and vitrification. *In vivo* embryos were superovulated with gonadotropin (Antorin R-10[®]) for 4 days combined with progesterone releasing intravaginal (CIDR[®]) insertion in Hanwoo donors, and *in vitro* embryos were used blastocyst embryos at Day 7 or Day 8 after post-insemination *in vitro*. The biopsy of bovine embryo was carried out in a 80 μ l drop with Ca²⁺-Mg²⁺ free D-PBS and the viability of biopsied embryos were evaluated in IVMD medium at over 12 h culture time in 5% CO₂ incubator.

For embryo sexing, about five or seven blastomeres were isolated from *in vitro* and *in vivo* embryos at blastocysts with microblade. and were then subjected to LAMP. The survivability of biopsied embryos were no difference in the development rate to re-formation of blastocysts between *in vivo* and *in vitro* embryos (100% and 90% respectively). The rates of sexed embryos were compared according to two groups, the female rate was lower than that the male in the *in vivo* and *in vitro* embryos (46% vs. 54% and 40% vs. 60%, respectively). However, there were no difference in the overall sexing ratio between the two groups. The survivability of frozen-thawed sexed embryos were lower in the *in vitro* than *in vivo* embryos in the slow-freezing (Group 1) and vitrification method (Group 2), (41.7% vs. 58.8% and 57.1% vs. 77.8. respectively).

(Key words : Bovine, Biopsy, Sexing, Slow-freezing, Vitrification)

I. 서 론

소 수정란 성관별에 대한 연구는 유전적으로 우수한 혈통의 수정란을 이식하기 전에 성관별을 실시하여 암컷 예측 수정란을 이식하여 암송아지를 생산하는 것으로서 수정란이식연구에 포함되는 중요한 연구 분야이다.

소 수정란의 성관별을 위해서 biopsy하는 방법은 대단히 중요한 사항이다. 왜냐하면 많은

양의 할구를 채취하게 되면 수정란의 생존율에 영향을 주기 때문에 적당량의 할구를 채취하는 것이 성관별 후의 수정란의 생존율 뿐만 아니라 성관별된 수정란의 동결, 융해 후의 생존성에도 중요한 요인이 된다. 이러한 생존율 향상을 위해서 적당량의 할구를 수정란으로부터 회수하여 성관별에 사용하게 되는데 기존의 할구 수보다 훨씬 적은 할구수를 이용하여 성관별을 실시하는 PEP-PCR (Primer Extension Preamplifi-

Corresponding author : D. S. Son, Animal Genetic Resources Station, National Livestock Research Institute, R.D.A. Jeonbuk, Namwon, 590-832, Korea. Tel : 036-620-3518, FAX : 063-620-3591, E-mail : sonds@rda.go.kr

cation-PCR) 방법(Chrenek 등, 2001)과 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 방법(Mori 등, 2001)을 최근에는 많이 사용하고 있다. 이와 같은 방법에 의해서 수정란의 성관별을 실시하는 주된 목적은 유전적으로 우수한 개체의 수정란을 성관별을 실시한 후 높은 생존율과 미리 예견된 암컷의 수정란을 이식하여 암송아지를 생산할 수 있기 때문에 상업적인 목적에 중요한 가치를 두고 있다(Rutledge와 Seidel, 1983).

소 수정란의 이용방법으로서 수정란에 직접적으로 물리적인 처리 과정을 거치지 않고 직접 수란우에 이식하는 방법과 성관별을 실시한 후 암컷 수정란을 이식하는 방법 그리고 수정란을 동결보존하여 융해 후에 이식을 실시하는 방법 등이 이용된다(Bredbacka 등, 1994; Thibier와 Nibart., 1995; Roschlau 등, 1997; Shea., 1999). 이러한 다양한 이용방법에서 체외 수정란의 경우는 체내수정란에 비해서 상대적으로 효율성이 낮다. 그 원인으로서 체외수정란의 경우는 체외배양방법에 따라서 수정란의 질(quality) 평가에서 체내 수정란보다 상대적으로 떨어지기 때문에 수태율과 동결 그리고 융해 후의 생존성 평가에서도 낮은 결과를 보인다. 또한, 체외수정란은 성관별을 위해서 biopsy를 실시하는 과정 중 세포가 손상을 받기 쉬우며 동결의 경우에 있어서도 더 민감하게 작용을 하기 때문이다(Agca 등, 1998). 수정란의 동결은 얼음결정의 형성으로 수정란의 세포막과 미세소기관들을 변형시키거나 파괴시키는 작용을 하기 때문에 중요한 세포의 기능을 상실시키는 작용을 한다. 동결에 대한 연구는 멸종위기 동물이나 희귀품종 또는 우수한 품종의 유전자원보존 측면에서 수정란을 보존한다. 따라서 이러한 유전적으로 우수한 혈통의 수정란을 보존하는 방법으로서 동결온도를 점진적으로 일정한 온도까지 도달시킨 후 동결하는 완만동결(slow-freezing) 방법과 이보다 더 간편한 초자화동결(vitrification) 방법을 주로 이용하고 있다. 완만동결은 ethylene glycol을 동결보호제로 사용하는 동결법으로서 동결, 융해 후 수정란을 이식하였을 때 임신율이 우수하여 동결란

의 직접이식법으로 이용되고 있다(Pereira 등, 2002). 그러나 초자화동결 방법은 동결 후 융해하는 과정을 순차적이고 필수적으로 하여야 하므로 현장에 적용하는 것이 거의 불가능하기 때문에 이용되고 있지 않다. 동결 수정란 사용은 우선 수정란의 수송이 용이하며, 고유한 품종을 안전하게 보존할 수 있으며 그리고 자연 교미에 따른 질병전파를 방지하기 위한 장점을 지니고 있기 때문에 수정란의 동결보존에 대한 다양한 연구는 지속적으로 이루어지고 있다(Fahning과 Garcia, 1992). 성관별을 위해서 biopsy된 수정란과 핵이식된 수정란의 경우는 투명대의 소실 또는 세포질 일부의 손상으로 정상적인 수정란과 비교할 때 생존율은 더욱 더 낮은 수준이다.

본 실험은 한우 수정란의 성관별을 위해서 체내 및 체외수정란을 biopsy를 실시한 후 수정란의 발달능력과 그리고 성관별된 수정란의 동결, 융해 후의 생존성을 조사하여 효과적인 성관별 수정란이식 연구에 대한 기초 자료를 얻고자 본 연구를 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 체외수정란 생산

한우 도축 암소로부터 적출된 난소를 0.9% 생리식염수에 담아 실험실로 2시간 이내로 운반하였다. 가시난포의 직경이 2~6 mm의 난포로부터 난포란을 난포액과 함께 19 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 채취하였다. 체외성숙을 위한 난포란은 1등급 및 2등급(IETS 기준)만을 사용하였다. 그리고 난포란의 체외성숙을 위해서 TCM199(Sigma)를 기본 배양액으로 5% FBS(Gibco)와 LH(10 µg/ml) 그리고 FSH(35 µg/ml)를 첨가하여 5% CO₂, 95% 공기, 39°C 배양기에서 22시간 동안 체외성숙을 유도하여 체외수정을 실시하였다. 체외수정에 사용된 정액은 한우 동결정액(KPN)을 이용하였고 정자의 수정능 획득과 정자의 분리는 BO 배양액을 이용하였다. 정자의 회수를 위한 원심분리는 1,800 rpm으로 5분 동안 2회 반복적

으로 실시한 후 정자의 펠렛을 회수하였다. 그리고 체외수정용 배양액인 IVF 100(IFP, Japan)에서 한번 더 원심 분리를 실시하여 체외수정에 사용하였다. 체외수정은 IVF 100 배양액을 60 mm petri dish(Nunc, Denmark)에서 50 μ l 미소적을 만들어 약 20개의 체외성숙된 난포란과 정자를 공동 배양하여 체외수정을 유도하였다. 체외수정액에 사용된 정자의 최종농도는 2×10^6 /ml로 하였으며, 체외수정은 CO₂ 배양기 내에서 6시간 동안 실시하였다. 수정란의 체외배양은 IVMD(IFP, Japan) 배양액에서 실시하였다. 체외수정 후 3일째와 5일째에 신선한 배양액으로 교환을 하였으며, 수정란은 수정 후 7일과 8일째 생산된 배반포기배 수정란을 실험에 공시하였다.

2. 체내수정란 생산

체내수정란 생산을 위해서 한우 공란우의 처리는 발정발현과 무관하게 progesterone releasing device인 CIDR®(InterAg, NZ)를 질내에 삽입하고 CIDR 삽입 4일째부터 FSH(Antorin R-10®, Kawasaki, Japan) 28 AU를 감량법으로 12시간 간격으로 4일간 나누어서 근육주사를 실시하였으며, FSH 투여량은 5회째에 PGF₂ α (Lutalyse® Belgium)를 25 mg, 6회째에 15 mg을 근육주사 하였고 CIDR를 제거하였다. 발정징후를 나타내는 공란우는 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시하였다. 인공수정 후 7일째 비외과적인 방법으로 수정란을 채란하여 수정란 성판별 실험에 공시하였다.

3. 수정란의 biopsy와 성판별

수정란의 biopsy는 inverted 현미경에 부착된 미세조작기에 Bio-cut blade(15°, Feather, Japan)를 장착하여 실시하였다. Biopsy 과정은 Ca²⁺, Mg²⁺ free D-PBS(Gibco) 용액을 petri dish(87 mm \times 20 mm, Corning)에 100 μ l의 미소적을 만들어 여기에 배반포기배 수정란을 하나씩 넣어 수정란의 영양막세포 일부를 biopsy하여 성판별에 사용하고, 나머지 수정란은 0.1% PVA(polyvinyl

alcohol, Sigma)가 함유된 D-PBS 용액에서 2~3회 세척한 후 배양하였다(조 등, 2005). 그리고 수정란의 생존율은 biopsy 후 12시간 이상 배양하였을 때 배반포기배의 재형성과 확장배반포기 단계까지 발달하는 수정란(Fig. 1)은 생존성이 있는 것으로 판단하였다. 수정란의 성판별은 Hiroki 등(2004a)의 방법에 의해서 실시하였다. Biopsy 된 수정란 할구로부터 DNA 증폭을 위해서 소 수정란 성판별 키트(Loopamp, EIKEN Chemical Co. LTD, Japan)를 사용하였다. 즉, 6 μ l DNA 추출용액과 biopsy한 수정란의 할구 6 μ l를 혼합하여 DNA를 추출한 후, 양성 특이적인 반응 튜브와 양성·자성의 동일한 반응을 일으키는 튜브에 각각 5 μ l씩 동일하게 DNA 튜브에 분주하였다. 그리고, 각 튜브에 20 μ l 반응 mixture를 혼합한 후 Turbidimeter LA-100 (Teramecs Co. LTD, Japan) 기기를 사용하여 DNA 증폭을 실시하였다. DNA 증폭은 63.5°C에서 40분, 그리고 80°C에서 2분간 실시한 후, 성판정은 양성특이 반응 튜브에서 negative(-) 그리고 일반반응 튜브에서 positive(+) 결과가 나오면 암컷으로 판정하였으며, 각 튜브에서 두 반응이 각각 positive(+) 일 때 수정란은 수컷으로 판정하였다.



Fig. 1. Morphology of embryo at over 12 h cultured after biopsy with microblade in bovine embryo (x 200 magnification).

4. 수정란의 동결보존

수정란의 완만동결을 위한 동결보호제로서는 1.8 M ethylene glycol(EG, Sigma) 그리고 평형

배양액은 D-PBS(Gibco, U.S.A) 배양액에 0.5% BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma)를 첨가하여 사용하였다. 수정란의 동결을 위해서는 프로그램화된 자동동결기(CL863, Cryogenic, Australia)를 사용하여 동결을 실시하였다. 수정란 동결 과정은 0.25 ml 스트로우에 장착 후 액체질소에 침지된 chamber내에 위치시킨 후, chamber 온도는 -7°C에서 시작하여 10분간 정치시키는데 약 3분 후에 스트로우 식빙을 실시한다. 그리고 -35°C까지 -0.3°C/분 속도로 냉각 시킨 후 -35°C에 도달하였을 때 액체질소에 바로 침지하였다. 동결, 보존 후 수정란을 2주정도 보관 후에 생존성을 확인하기 위하여 스트로우를 보관고로부터 꺼내어 공기 중에서 약 10초 동안 그리고 37°C의 항온 수조에서 약 20초간 용해 후 D-PBS 용액에서 2~3회 세척하여 체외배양액으로 옮겨 24시간 이상 배양하였다. 생존율은 배반포기배의 재형성과 확장배반포기배 및 부화 단계까지의 발달로서 평가하였다.

성관별 수정란의 초자화동결을 위한 VS1 (vitrification solution 1) 용액의 조성은 10% glycerin, 0.1 M glucose, 0.1 M sucrose, 1% polyethylenglycol(PEG)를 혼합하여 사용하였고, VS2는 10% glycerin, 10% ethylene glycol(EG), 0.2 M glucose, 0.2 M sucrose, 2% PEG, 그리고 VS3은 10% glycerin, 30% EG, 0.3 M glucose, 0.3 M sucrose, 3% PEG의 조성으로 동결을 실시하였다. 수정란의 초자화동결의 평형시간과 동결 방법은 VS1 용액에서 5분, VS2 용액에서 5분, 그리고 VS3 용액에서 0.25 ml 스트로우에 장착하기까지의 시간은 1분 이내에 완료하여 액체질소에 침지하였다. 초자화로 동결된 수정란의 용해 방법은 Pugh 등(2000)의 방법에 준하여 실시하였다.

5. 통계처리

수정란의 biopsy 후 체내 및 체외 수정란의 발달율과 성관별 후의 성비(sex ratio)에 대한 결과 비교는 Chi-square test 방법을 이용하여 유의성 검정(P<0.05)을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

Table 1의 결과는 공란우 과배란 처리 프로그램에 의해서 평균 7.5일째 생산된 체내 수정란과 도축난소의 난자를 이용하여 체외에서 수정 후 7, 8일째 생산된 수정란을 biopsy를 실시한 다음 생존한 수정란의 발달율을 조사한 것이다. 체내수정란의 성관별을 위해서 공시한 41개의 배반포기배 수정란을 biopsy를 실시한 후 생존율은 100%의 결과를 나타내었으나 체외수정란의 경우는 전체 50개의 공시한 수정란 중에서 생존한 수정란은 45개로서 90.0 %의 결과를 나타내었다. 나머지 5개(10%) 수정란은 biopsy 과정중에 세포막의 파열에 의한 손상을 받아 퇴행되었다.

수정란의 성관별을 실시하기 위해서 가장 중요한 점은 수정란의 biopsy하는 시간과 방법이 가장 적절하게 이루지는 것이다. 이러한 방법과 시간의 단축은 biopsy 후 수정란의 발달율과 동결, 용해 후의 생존성에 많은 영향을 주기 때문이다(Tominaga와 Hamada, 2004). 성관별을 위해서 실시하는 수정란의 biopsy 방법은 보고자들마다 서로 다른 방법을 사용하였다(Lewis, 1994; Forell, 2001; Hiroki 등, 2004b). 각자 다른 방법을 사용하는 것은 biopsy 방법에 따라서 수정란의 발달에 영향을 미칠 수도 있기 때문이다. Biopsy후 수정란이 퇴행되는 비율은 본 연구에서는 체외수정란의 경우 10.0%의 결과를

Table 1. Survivability of biopsied embryo for sexing in bovine embryos

Embryo*	No. of embryos*	No. of biopsied embryo	No. of survivability(%)
<i>In vivo</i>	41	41	41(100.0)
<i>In vitro</i>	50	45	45(90.0)

* embryos : blastocysts and expanded blastocysts stage. Replicates 4.

보였다. 이러한 biopsy 후의 결과에 대해서 Hasler 등(2002)은 수정란의 생존성과 질(quality) 적인 저하를 초래하게 되어 수정란을 이식한 후에도 임신율 저하의 원인이 될 수도 있다고 보고하였다.

수정란으로부터 분리된 할구의 수는 성관별의 정확성에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 PCR 또는 LAMP(Hiroki 등, 2004a) 방법 등에서 DNA 추출을 위해서 사용되는 적당한 할구수는 2~10개를 필요로 한다. Biopsy 된 수정란 할구로부터 DNA 증폭을 위해서 소 수정란 성관별 키트(Loopamp, EIKEN Chemical Co. LTD, Japan)를 사용하였다. 즉, 6 µl DNA 추출용액과 biopsy한 수정란의 할구 6 µl를 혼합하여 DNA를 추출한 후, 양성 특이적인 반응 튜브와 양성·자성의 동일한 반응을 일으키는 튜브에 각각 5 µl씩 동일하게 DNA 튜브에 분주하였다. 그리고, 각 튜브에 20 µl 반응 mixture를 혼합한 후 Turbidimeter LA-100(Teramecs Co. LTD, Japan) 기기를 사용하여 DNA 증폭을 실시하였다. 이렇게 DNA 추출을 위해서는 되도록이면 수정란에 손상을 적게 주는 방법으로 biopsy를 실시하여야 한다. 본 연구에서 체외수정란을 이용하여 biopsy후 생존한 수정란의 비율은 90%로서 Tominaga와 Hamada (2004)는 체외 수정란을 이용하여 biopsy를 실시한 후 65.9~80.0%의 발달율을 보고한 내용보다 높은 결과를 나타내었다. Biopsy 후 수정란의 생존율에 영향을 주는 원인으로서는 수정란의 발달 단계에 따라서도 차이가 나타난다고 Hiroki 등(2004b)은 보고하였다. 즉, 수정 후 4일째 수정란에 비해서 7, 8일째 생산된 수정란이 biopsy 후에 생존성이 더 높은 것

으로 나타났다. 한편, 본 연구에서 체내 수정란을 biopsy하였을 때는 100%의 생존율을 나타내어 체외 수정란보다 더 높은 생존율을 얻을 수 있었다. 이러한 결과를 볼 때 수정란의 발달 단계와 수정란의 생산 방법 그리고 수정란의 배양 조건에 따른 수정란의 질 등은 biopsy 후 수정란의 생존성에 중요한 영향을 미치는 것으로 사료 된다.

Table 2의 실험 결과는 체내 및 체외 수정란을 성관별하여 암, 수의 성비율을 조사한 결과이다. 한우의 체내수정란의 경우 암컷과 수컷의 비율이 각각 46.3%와 53.7%의 성비를 보여 수컷의 비율이 다소 높은 경향을 나타내었으며, 마찬가지로 체외수정란에서도 수컷의 비율이 60.0%로서 40.0%인 암컷 보다 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 일반적으로 소 수정란에 있어서 수컷과 암컷의 비율은 거의 1:1의 비율로 나타나는데 Jafar와 Flint (1996)의 보고에 의하면 암컷보다는 수컷의 비율이 약 2~3% 높은 결과를 보고하였으나 Carvalho 등 (1996)은 7일째 생산된 소 체외수정란에 있어서는 정상적인 1:1의 비율을 넘어서 수컷 보다는 암컷의 비율이 다소 높은 결과를 보고하였다. 한편 Bredbacka 등(1996)이 보고한 수컷의 비율이 암컷의 비율보다 유의적으로(P<0.05) 높다고 보고한 내용과는 유사한 결과를 보였다. 체외 수정란에서 수컷의 비율이 암컷의 비율보다 높게 나타나는 이유로서는 oxidative stress로 유도된 gene expression의 결과로 인하여 암컷 수정란보다 수컷의 수정란이 더 빠른 발달을 보이기 때문으로 보고하였다(Sohal와 Allen, 1990). 따라서 체내수정란 보다는 체외수정란에서 oxidative stress 손상을 더 많이 받은 결과 수컷

Table 2. Sexing rates according to *in vivo* and *in vitro* embryo production in Hanwoo

Embryo	No. of embryos	No. of sexed embryo (%) ¹⁾		Ambiguity
		Female	Male	
<i>In vivo</i>	41	19(46.3)	22(53.7)	0
<i>In vitro</i>	45	18(40.0)	27(60.0)	0

¹⁾ X² 0.05(1) = 3.841.

Replicates 4.

Table 3. Comparison of survivability after frozen-thawed according to different embryo freezing methods in sexed embryo

Methods*	Embryo	No. of embryos	No. of embryos (%)	
			Survivability*	Degeneration
Slow-freezing	<i>In vivo</i>	17	10(58.8)	7(41.2)
	<i>In vitro</i>	48	20(41.7)	28(58.3)
Vitrification	<i>In vivo</i>	9	7(77.8)	2(22.2)
	<i>In vitro</i>	42	24(57.1)	18(42.9)

* re-expanded and hatched blastocysts.
Replicates 4.

의 비율이 증가하는 것으로 추측할 수 있다.

한편, 성관별이 실시된 수정란의 정확도는 분리된 할구의 DNA를 추출하여 사용하게 된다. DNA 추출 후 암, 수의 성비 판정에서 정확하게 암, 수의 구분이 되지 않는 비율이 Agca 등(1998)은 약 15%, Hasler 등(2002)은 수정란 성관별을 위한 처리방법에 따라서 3~10% 정도는 성관별이 정확히 되지 않았으며, 성관별 과정중의 실수로 판별이 되지 않은 비율은 약 7% 수준으로 보고하였다. 하지만 본 연구에서 사용한 LAMP 방법에 따른 성관별에서는 체내 및 체외 수정란에서 부정확하게 판정되거나 오류가 발생하는 비율은 나타나지 않았다.

Table 3은 biopsy 후의 성관별된 체내 및 체외수정란을 이용하여 완만 동결 방법과 초자화 동결 방법으로 수정란을 동결 보존하여 생존율을 비교 조사한 결과이다. 성관별된 체내 및 체외수정란을 완만동결 방법으로 동결 보존 후의 생존성 결과를 보면 체내수정란은 58.8%, 그리고 체외 수정란은 41.7%로서 체내수정란에서 보다 높은 생존율을 얻었으며, 초자화동결 방법에서는 체내수정란의 생존율은 77.8%, 체외수정란은 57.1%의 결과를 보여 완만동결 방법에서와 같이 체내수정란에서 더 높은 생존율을 보였다. 그리고 수정란을 용해하였을 때 발달되지 못하고 퇴행되는 비율에서도 체외수정란에서 높은 결과를 나타내어 체외수정란이 체내수정란에 비해서 biopsy 과정 중에 세포의 손상뿐만 아니라 동결에 따른 세포의 손상으로 퇴행율이 증가되는 것으로 사료된다. 또한 성관별한 수정란을 초자화동결 방법으로 동결을

실시하여 용해하였을 때 재확장된 생존성의 결과를 Vajta 등(1997)은 대조구 그룹이 85%, 성관별한 수정란에서는 77%의 결과를 보고하여 본 연구에서 체내 수정란을 초자화동결 방법으로 동결, 용해 하였을 때의 78% 결과와 비슷하였다. 이러한 결과를 볼 때 초자화동결 방법이 성관별한 수정란의 생존성 향상에 더 효과적인 것으로 사료된다.

체외수정란의 성관별에서 생존율이 저하되는 주된 원인으로서 biopsy 한 수정란은 투명대 소실로 인하여 동결 전, 후의 동결 보호제에 의한 삼투압의 손상 또는 biopsy 방법으로 인한 세포의 기계적인 손상의 원인이 작용하는 것으로 Gustafsson 등(1994)은 보고하였다. Biopsy한 수정란을 동결하였을 때 생존율은 60%의 결과를 보고하였다. 그리고 투명대가 손상된 수정란의 동결, 용해 후의 생존성은 52% 수준으로 보고하여 본 연구에서 실시한 biopsy 후의 동결, 용해 한 결과인 58.8%의 생존율과 비슷한 경향을 보였다. 이상의 실험 결과를 종합해 볼 때 biopsied 수정란은 투명대의 소실과 동결보호제의 노출에 의한 삼투압의 손상 그리고 할구 분리를 위해서 micro blade 조작시 세포에 직접적인 손상을 주어 생존율이 저하되는 결과를 가져온 것으로 추측된다. 따라서 수정란의 생존성 향상을 위한 biopsy 방법과 성관별된 수정란의 동결, 용해 후의 생존율 향상 그리고 수정란이식 후 수태율 향상을 위해서는 보다 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

IV. 요약

성관별을 위한 biopsy 후 수정란의 발달을 및 동결-융해 후의 생존율을 조사는 다음과 같다. 한우 체내 및 체외 수정란의 성관별을 위해서 영양막 세포의 일부를 채취하기 위해서 수정란을 biopsy 하였다. biopsy된 수정란의 생존율을 조사의 결과는 체내 수정란이 100% 그리고 체외 수정란이 90.0%의 결과를 나타내어 체내 수정란이 체외 수정란 보다 biopsy 후의 생존율이 높게 나타났음을 알 수 있었다. 수정란의 성관별 비율은 체내 수정란에서는 암컷과 수컷의 비율이 46.3%와 53.7%로 각각 나타나 수컷의 비율이 암컷 보다 다소 높은 경향을 보였으며, 체외 수정란에 있어서는 암컷과 수컷의 비율은 40.0% 와 60.0%로 수컷의 비율이 높게 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 성관별된 수정란의 동결-융해 후 생존성은 완만동결 방법에 의한 수정란의 생존율은 체내 수정란에서 58.8 %, 체외 수정란에서는 41.7% 그리고 초자화동결 방법에서는 체내 수정란의 생존율이 77.8%, 체외 수정란은 57.1%로의 결과를 보여 체내 수정란을 이용한 초자화동결 방법에서 상대적으로 더 높은 생존율을 보였다.

V. 사 사

이 연구는 2006년도 농촌진흥청 축산연구소 박사 후 연수과정 지원사업에 의하여 수행되었음.

VI. 인용 문헌

1. Agca, Y., Monson, R. L., Northey, D. L., Peschel, D. E., Schaefer, D. M. and Rutledge, J. J. 1998. Normal calves from transfer of biopsied sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology*. 50:129-145.
2. Bredbacka, P., Veimala, R., Peippo, J. and Bredbacka, K. 1994. Survival of biopsied and bovine demi-embryos. *Theriogenology*. 41:1023-1031.
3. Bredbacka, K. and Brebacka, P. 1996. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 106:169-172.
4. Carvalho, R. V., Del Campo, M. R., Palasz, A. T., Plante, Y. and Mapletoft, R. J. 1996. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stage on day 7. *Theriogenology*. 45:489-498.
5. Chrenek, P., Boulanger, L., Heyman, Y., Uhrin, P. and Laurincik, J. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology*. 55:1071-81.
6. Fahning, M. L. and Garcia, M. A. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*. 29:1-18.
7. Forell, F. 2001. Producao *in vitro*, biopsia sexagem de embrioes bovinos. [*In vitro* production, biopsy, and sexing of bovine embryos] M. Sc Dissertation in Cellular and Molecular Biology. Porto Alegre, RS, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 33-42.
8. Gustafsson, H., Jaakma, U. and Shamsuddin, M. 1994. Viability of fresh and frozen-thawed biopsied bovine embryos. *Acta. Vet. Scand.* 35(3): 217-222.
9. Hasler, J. F., Cardey, E., Stokes, J. E. and Bredbacka, P. 2002. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology*. 58:1457-1469.
10. Hiroki, H., Satoru, M., Satoru, M., Takahashi, H., Yoshikazu, S., Naohiko, K., Mutsumi, I., Ken, S., Sadao, O. and Akira, M. 2004a. Genetic diagnosis of claudin-16 deficiency and sex determination in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. 50(6):613-618.
11. Hiroki, H., Soichi, K., Satoru, M., Ken, S., Sadao, O., Yoshiyuki, T., Seiji, K., Keiko, T., Keibo, T., Keibo, W., Tsugunori, N., Hidenari, Y., Sigenori, M. and Akira, M. 2004b. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos usng loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*. 62:887-896.

12. Jafar, S. I. and Flint, A.P.F. 1996. Sex selection in mammals: a review. *Theriogenology*. 461:91-200.
13. Lewis, I. M. 1994. Splitting cattle embryos commercially: the effect of sucrose, embryo stage and the duration between embryo recovery and biopsy. *Theriogenology*. 41:237.
14. Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:150-154.
15. Pereira, P. V., Dayan, A., Watanabe, M. R., Avila, F. M., Marchizeli, J. C., Accorsi, M. F. and Watanabe, Y. F. 2002. Pregnancy rate following transfer of cryopreservation *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*. 57:475.
16. Pugh, P. A., Tervit, H. R. and Niemann, H. 2000. Effect of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 58:9-22.
17. Roschlau, K., Roschlau, D., Roselius, R., Dexne, U., Michaelis, U., Stress, R., Unicki, P. and Rink, N. 1997. Over 5 year experience in sexing of bovine morulae and blastocysts during routine embryo transfer. *Theriogenology*. 47:273.
18. Rutledge, J. J. and Sidel, E. J. 1983. Genetic engineering and animal production. *J. Anim. Sci.* 57:265-272.
19. Shea, B. F. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology*. 51: 841-854.
20. Sohal, R. S. and Allen, R. G. 1990. Oxidative stress as causal factors in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp. Gerontology*. 25:499- 522.
21. Thibier, M. and Nibart, M. 1995. The sexing of bovine embryos in field. *Theriogenology*. 43: 71-80.
22. Tominaga, K. and Hamada, Y. 2004. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine *in-vitro* produced blastocysts. *Theriogenology*. 61:1181-1191.
23. Vajta, G., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. 1997. Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology*. 47:501-509.
24. 조상래, 최선호, 김현중, 한만희, 최창용, 정연길, 손동수. 2005. LAMP 방법에 의한 소 수정란의 성 판별과 Biopsy에 따른 수정란의 체외발달. *한국수정란이식학회지*. 20(2):169-176.
(접수일자 : 2007. 1. 17. / 채택일자 : 2007. 4. 12.)