

초기 임신우의 공란우 활용이 초음파 유도 난자 채취 및 수정란 생산에 미치는 영향

진종인¹, 권태현¹, 최병현¹, 김성수¹, 조현태¹, 방재일¹, 김삼철^{1,2}, 조규완³, 이정규^{1,2}, 공일근^{1,2,*}
¹경상대학교 응용생명과학부 축산학전공(BK21), ²경상대학교 농업생명과학연구소, ³경상대학교 수의과대학

Effect of Early Pregnant Heifer as Donor on the Ovum Pick-Up Derived Oocyte Aspiration and Embryo Production

Jong-In Jin¹, Tae-Hyeon Kwon¹, Byeong-Hyun Choi¹, Sung-Soo Kim¹, Hyun-Tea Jo¹, Jae-Il Bang¹, Sam-Chul Kim^{1,2}, Kyu-Woan Cho³, Jung-Gyu Lee^{1,2} and Il-Keun Kong^{1,2,*}

¹Department of Animal Science, Division of Applied Life Science (BK21 Program), Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

³College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effect of early pregnant cow as donor for Ovum Pick-Up (OPU) derived oocyte aspiration and embryo production in Holstein heifers. Four non-pregnant and 2 pregnant Holstein heifers were used as donor and then carried out total 17 OPU session for 10 weeks (2 times per week). Recovered cumulus-oocyte-complexes (COCs) were classified into 4 grade by oocyte cytoplasm and cumulus cells and matured *in vitro* in TCM-199 supplemented with 10% FBS, 10 mg/ml FSH and 1 mg/ml estradiol in 5% CO₂ and over 99% humidity for 24 h. After 24 h co-incubation with post-thaw sperm, the presumed zygotes were cultured in CR1aa medium with 4 mg/ml BSA for 3 days and then changed CR1aa medium with 10% of FBS for another 3~4 days. The Mean number of aspirated follicles and collected oocytes in the early stage pregnant and non-pregnant heifers were 13.0 ± 4.3 and 10.6 ± 3.9, 5.4 ± 3.4 and 7.7 ± 3.6 per session, respectively. Rate of collected oocyte from aspirated follicles were 59.2% and 50.5%, respectively. The average number of good quality oocytes (Grade I and II) in the early stage pregnant and non-pregnant heifers was 3.7 ± 2.7 and 4.9 ± 2.6 (Mean ± SD). Cleavage and blastocyst developmental rates in Grade I and II were 22.2% and 25.5%, and then 1.7 ± 0.9 and 1.4 ± 1.1 blastocyst per session, respectively.

In conclusion, OPU technology can be used in early stage pregnant and non-pregnant heifers without any problem and so applied OPU derived embryo production to maximize the ability of genetically valuable females.

(Key words : OPU, Holstein, heifer, oocyte, pregnant donor)

서 론

가축의 개량기법은 종모우를 이용한 인공수정 기술을 이용하여 활발하게 이용되어 왔으며 근래에 Willett 등(1951)이 수정란이식 기술의 개발에 의해 능력이 우수한 공란우로부터 성선자극 호르몬을 이용하여 수정란을 생산 이용하나, 이 기술에 의해서는 고능력 유전력을 보유하는 개체의 수정란 생산을 위해 호르몬을 과다 투여에 대한 후유증, 생산 능력 등의 문제로 그 활용의 가치가 떨어진다. 경제적으로 대량의 난자를 얻기 위해 도축 난소를 이용, 체외수정에 의한 수정란 생산 기술이 가장 일반적인 방법으로 여겨지고 있으나, 도축된 암소의 난소는 능력 개량에 대한 문제와 반복 이용이 불가능

하다는 단점이 내포되고 있다. 이러한 문제를 해소하기 위해 근래 인간의 불임 치료를 위해서 개발 이용되고 있는 초음파 진단기를 활용하여 살아 있는 고능력 암소의 질을 통하여 난소의 난포로부터 난자 채취 기술(ovum pick-up: OPU)이 1988년 네덜란드의 Pieterse 연구진들에 의해 가축 개량의 목적으로 활용하기 위해 개발하여 최초로 성공되고 이 방법으로 생산된 난포란을 체외수정 기법을 접목하여 산자 생산에 성공한 이래 성선자극호르몬을 처리했거나 또는 처리하지 않은 소에서(Pieterse 등, 1988, 1991a, 1991b, 1992; Kruij 등, 1994; Walton 등, 1993; Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995; Meintjes 등, 1995; Stubbing와 Walton, 1995), 난소의 기능이 활성적이지 못한 소에서(Bols 등, 1995), 성성숙이 완성되지 않은 송아지에서

* 본 연구는 농림수산식품기술기획평가원(Grant 110020-3) 및 농촌진흥청 한우특화사업(Grant PJ 007752011)의 지원에 수행되었음.

* Correspondence : E-mail : ikong7900@gmail.com

(Brogliatti와 Adams, 1996; Duby 등, 1996; Presicce 등, 1997), 수태가 되지 않는 불임우에서(Looney 등, 1994), 또는 임신된 육성우에서(Reinders 등, 1996; Guyader 등, 1997) 각각 난포란 채란하는 방법에 관련한 연구를 수행한 바 있다. 또한 난자 채취 및 회수된 수량의 개선을 위하여 초음파 진단기를 이용한 난포란 채란에 사용할 일회용 needle의 개발(Bols 등, 1995), 초음파 기기와 복강경간의 채란 효율성 비교, 발정 후 주 1회 또는 2회 난포란 채란법의 비교(Gibbons 등, 1994, 1995; Looney 등, 1994; Bungartz 등, 1995; Hasler 등, 1995) 및 채란 시 환경 온도와 습도가 채취된 난포란의 체외발달에 미치는 영향(Broussard 등, 1996), 초음파 기기를 이용하여 수정란을 생산하는 것을 신속하게 상업적으로 이용(Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995), 공란우 반복적 가능(Pieterse 등, 1988), OPU-IVP의 배아 생산 효율 개선(Van Wagtenonk-de Leeuw 등, 2000; Merton 등, 2003; Lonergan 등, 2006), 수정란을 반복적으로 생산 등에 관련한 일련의 연구가 다양한 방향으로 활발하게 진행되었다. 또한 소의 OPU는 잘 알려진 체외배양 생산 기술의 연구 분야와 상업적인 다양한 생산 체계를 만들어 내고 있다. 2007년 국제수정란이식학회(IETS)에서 보고된 체내 유래 난자에서 생산된 체외수정란이 245,000개를 이식되고 있다고 보고되었다(Thibier, 2008).

따라서 본 연구의 목적은 공란우로서 고능력의 임신우를 상정하여 불 때 생식생리학적으로 임신 중에는 수정란의 채취가 불가능하나, OPU 기법을 이용하여 임신 초기 개체에서 일정 기간 미성숙 난자의 반복 채취, 회수율, 등급을 분석하고, 이를 체외성숙 및 체외수정으로 임신된 공란우의 임신 초기에서 반복적이면서 효율적인 수정란 생산 방안에 대하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시축 선발

공란우 선발은 부산 경남 지역의 우유협동조합에서 제공된 6두의 Holstein 고등 등록된 자우로써 모체의 년간 비유량, 유지량, 유단백량의 검정 성적 자료를 이용한 능력을 분석하여 분만 경험이 없는 미경산우를 선발, 종축개량협회 선형심사 및 직장 검사에 의한 난소와 자궁 등의 번식 기능의 상태, 질병 감염 등의 기록을 검토하여 최종 선발 이용하였다. 또한 임신 공란우 2두는 인공수정 후 30일에 직장 검사 및 초음파 검사를 통하여 자궁에 태수 및 태아의 존재를 확인한 후 선발하였다. 공시된 임신 및 미임신 개체의 OPU는 실험 초기 난포를 제거한 다음 3일 또는 4일 간격으로 10주 동안 주 2회 실시하였고, 임신 유지 및 난소의 상태는 채란 시 직장 및 초음파 기기를 이용하여 임신 유지 여부 검사를 실시하였으며, 또한 최종 임신 상태의 검사는 임신 120일에 실시하였다.

2. 정액의 선정

선발된 공란우를 기준으로 근친도를 고려하고, 체형 및 유량, 유지방 개량 목적에 부합된 농협중앙회 개량사업소에서 제공되는 종모우 정액을 선정하였다. 선정된 종모우 중 체외수정을 및 배 발달률에 있어서도 각기 다르기 때문에 효율적인 수정란 생산을 위해서 6종류의 정액을 선정 후 최종 3종류의 정액을 선택하여 활용하였다.

3. 초음파 난포란 채취 기구 및 채란 방법

생체 내 미성숙난자 채란을 위한 난포란의 초음파 관찰은 MyLab™ 30 VET GOLD(Esaote, Genova ITALY) 및 탐촉자(EC123; Micro-Convex 9-3 MHz)는 6.6 MHz convex scanner를 사용하였고, 미성숙 난자 흡인에는 일회용 주사침(18 G)을 사용하였으며, 난자 흡인용 10 IU/ml Heparin이 첨가된 기본 배양액(HEPES+10 IU Heparin)으로 주사침 및 흡인관 내를 충전하였다. 공란우는 본 연구소에서 개조한 보정틀에 고정시켜 움직임을 최소화하였으며 직장 내의 분변 제거 및 꼬리를 고정하고, 흐르는 물을 이용하여 회음부와 외음부의 오물을 세척한 다음 2%로 희석된 povidone iodine 및 70% alcohol로 외음부를 소독하였다. 복부 및 질벽의 긴장을 완화시키기 위해서 lidocaine HCl(2% 염산리도카인, 광명제약, 화성) 마취제를 약 3~7 ml를 미근부의 제 1, 2 미추 간에 주사하여 부분 마취를 유도하였다.

초음파 탐촉자는 condom을 이용하여 보호하여 질을 통해 삽입하였으며, 자궁경부의 좌측 또는 우측에 밀착 위치하도록 하였다. 난소는 다른 손으로 직장벽을 통해서 상태, 위치를 확인 및 견인하여 질 내에 있는 탐촉자 선단부에 위치하여 초음파의 모니터 상으로 난포의 상태가 뚜렷한 흑점이 나타나도록 조정 및 고정 후 난포의 개수를 확인하였으며, 채란 가능한 난포를 monitor 상의 biopsy line이 난포를 횡절단할 수 있도록 위치시켜 난포외벽선이 뚜렷하도록 난소를 조작하여 채란 준비를 하였다. 난소의 천자는 일회용 long 주사침(18 G)으로 질벽을 관통하여 복강 내로 들어가고 monitor image의 난소에서 확인된 2~6 mm 크기의 난포 내 및 시술자 감각에 주사침이 난소 및 난포강으로 진입되는 것이 감각적으로 전달됨과 동시에 regulated vacuum pump의 foot switch를 작동시켜 즉 needle의 끝이 난포강으로 진입하는 것을 감각과 monitor image 상으로 확인할 수 있었으며, 검게 나타난 난포강의 부위가 monitor 상에서 완전히 사라지고 주사침의 끝이 난포벽에 닿아 음압이 차단될 때까지 계속하여 실시하였다. 흡입 시 주사침을 회전 및 압을 유지하여 잔존 난포액 및 난포란이 모두 흡입되도록 하였다. 흡입이 완료 후 주사 바늘을 후진한 다음 난소를 조작하여 동일한 방법으로 다른 난포에서 난포액을 흡입하였다. 채란에 의한 유입되는 혈액의 응고 방지를 위해 2~3개의 난포 흡입 후에 배지로 주사침 내강을 세척하였으며, 이러한

과정으로 모든 난포의 흡입이 끝날 때까지 반복하였다. 이때 60~70 mm Hg(10~15 ml/min)의 음압을 유지하였다. 채취 기술에서의 핵심은 주 2회에 소량의 미성숙 난자를 채취함에 있어서 한 개의 유실없이 채취하는 것이다. 이를 위해서 유입된 혈액과 유착 현상을 방지하기 위해 배지에 10 IU Heparin을 첨가하였고, 반복적으로 배지로 세척하였다. 채란은 가능한 정확하고 신속하게 작업을 완료하도록 하였다. 이와 같은 방법으로 연속하여 난포란을 흡입하여 모니터상에서 난포가 완전히 흡입되는 것을 확인하고 needle을 다음 난소로 이동시켜 반복적인 방법으로 채란하였다. 난포 천자 후 잔류된 난포액 회수를 위해 주사침과 연결 튜브를 흡입용 10 IU/ml Heparin이 첨가된 기본 배양액(HEPES+10 IU Heparin)으로 세척하였다. 흡입한 난포액 및 난은 채란 시 외기 온도에 의한 충격 최소화를 위해 온도가 일정한 가온기에 보관 및 보온병에 보관하여 실험실로 옮겼다.

Emcon Embryo filter(Agtec, USA)를 이용하여 혈액 등을 여과시켜 실제 현미경으로 난자를 회수하였고, 난포란의 등급 분류는 세포질의 색깔과 난구세포 부착 정도에 따라 평가 기준 Grade I~IV까지 설정하여 분류하였다(Merton 등, 2003; Petyim 등, 2003; Jeong 등, 2009). 회수된 모든 난자를 체외성숙에 제공하였다. 본 실험에 공시된 임신 초기 공란우의 임신황체가 존재하는 난소의 OPU는 황체 조직 외에 존재하는 난포를 puncture하여 난포란을 흡입하였다.

4. 난포란의 체외성숙

회수된 난자의 성숙용 배양액은 TCM-199에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), Hormone(FSH 10 mg/ml, Estradiol 1 mg/ml)과 항생제(100 IU/ml penicillin G, 100 ug/ml streptomycin)를 첨가하여 39°C, 5% CO₂와 99% 이상의 습도가 유지된 CO₂ 배양기에서 18시간 이상 전배양으로 평형을 유도하였다. 체외성숙은 TCM-199 배양액에 회수된 모든 난포란을 난자 세포질의 상태, 난구 세포의 충실도에 따라 Grade I, II, III, IV로 구분하여 배양기에서 24시간 동안 배양을 실시하였고, 난구세포의 팽창과 세포질의 충실도 등으로 체외성숙을 판정하여 체외수정에 공시 여부를 판단하였다.

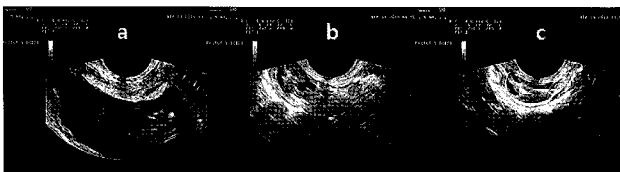


Fig. 1. Ultrasound photograph of fetus and follicle on the ovary of pregnant heifer. a) Picture of pregnant 120 days in donor after AI(artificial insemination), b) Right-ovary (existence the corpus luteum of pregnancy), and c) Left-ovary.

5. 체외수정

체외수정 배양액에 6 mg/ml BSA를 첨가하고 항생제(100 IU/ml penicillin G, 100 ug/ml streptomycin)를 첨가한 배양액을 5 ml 분주하여 배양기에서 18시간 전배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 젓소 동결 정액 straw를 38°C 온수에서 30초간 용해 후, 10 ml tube의 정자 세척액(D-PBS, Gibco)에 넣은 다음 1800 rpm에서 5분간 원심분리하였다. Tube 하단 부분의 펠렛화된 정자를 회수하여 20 ug/ml heparin으로 CO₂ 배양기에서 약 15분간 수정능을 획득하였으며, 정자의 최종 농도가 1×10⁶ sperms/ml가 되도록 하였고, 99% 이상의 습도, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 성숙이 완료된 난포란과 같이 24시간 동안 체외수정을 유도하였다.

6. 체외 배양

체외배양은 CR1aa 배양액에 3 mg/ml BSA, 10% FBS를 첨가하여 이용하였다. 체외수정 18~22 시간 후 3 mg/ml BSA 첨가된 CR1aa 배양액으로 2~3회 세척하여 3일간 체외배양을 실시하였으며 분할이 일어난 수정란 만을 선발하여 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액으로 3일간 2차 체외배양을 실시하여 이식 단계의 배반포가 되도록 유도하였다.

7. 통계 처리

본 실험에서 얻어진 결과들의 값은 mean±SD으로 표시하였으며, 두 그룹 간의 통계학적 분석은 SPSS package(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 비 임신과 임신 초기우의 채란 및 난자 회수율

임신된 개체는 인공수정 후 30일에 직장 및 초음파 진단기를 이용하여 임신을 확인하고 3~4일 간격으로 주 2회 채란으로 흡입된 난포 및 난자의 회수율은 Table 1과 같다.

초음파 유도 Holstein 미경산우 생체 내에서 주기적으로 4두로부터 채란한 결과는 주 2회 총 68회 반복 채란으로 monitor image에 관찰된 가시난포 721개(회당 10.6±3.9)를 흡입하여 364개(회당 5.4±3.4)의 난자가 회수되어 50.5%의 채란율을 보였으나, 임신된 미경산 임신 초기우 2두에서 34회 채란으로 441개(회당 13.0±4.3)의 가시난포 흡입으로 261개(회당 7.7±3.6)의 난자가 회수되어 59.2%의 채란 효율로 임신우가 유의적으로 높게 나타나는 것은 임신된 개체의 초기에 가시난포가 발생하고, 채란 가능하다는 결과가 나타나므로 이로써 임신 초기에 주 2회 연속적 반복적으로 임신 초기 고능력우로부터 생체 내 난포란의 채란이 가능하며, 그 활용의 가치가 높을 것으로 사료된다.

주 2회 채란하는 것이 주 1회 채란하는 것보다 주당 난포

Table 1. Recovery rates of follicular oocytes aspirated by OPU session from non-pregnant and pregnant Holstein heifers

Pregnant status	No. of sessions	Total No. of follicle aspirated (Mean \pm SD)	No. of oocytes (Mean \pm SD)	% of oocytes/total follicles aspirated
Non-pregnant	68	721 ^a (10.6 \pm 3.9)	364 ^a (5.4 \pm 3.4)	50.5
Pregnant	34	441 ^b (13.0 \pm 4.3)	261 ^b (7.7 \pm 3.6)	59.2

Values with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$). (Mean \pm SD) denotes mean \pm SD per session.

란의 채란 수가 많았다고 Gibbons 등(1994)이 보고하였고, Reinders 등(1996)이 육성 임신우 19두에서 총 171회(두당 3~17회) 채란하여 17두가 자우를 분만하여 임신 초기 3개월 동안 초음파 유도 채란에 의한 자극으로 임신 유지에는 영향을 주지 않는다는 보고하였으며, 이 등(1998)은 6두에서 35일에 임신 확인 후 40일부터 10일 간격으로 OPU를 실시하였으며, 또한 임신 유지 여부 확인은 임신 40일 이후부터 10일 간격으로 실시하였고, 임신 50일의 임신 유지 여부 확인에서 1두가 유산하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 공란우에 인공수정을 실시 후 30일에 직장 검사 및 초음파 진단기를 이용하여 임신 여부를 확인한 다음 초기 2회 우점난포 제거와 함께 매주 2회 총 19회 반복 채란을 실시하였으며, 최종 인공수정 후 120일에 임신 여부를 확인하였다.

임신 초기우의 채란에서 회수된 난자의 수에서 이 등(1998)은 임신 후 10일간격 1회 채란으로 임신 40일, 50일, 60일, 70일, 80일, 90일에 각 공란우에서 8.2개, 8.8개, 9.2개, 6.8개, 8.0개, 2.7개의 난포를 흡입하고, 70일 이전 군보다 이후의 군이 유의적으로 낮았다고 보고하였다. Guyader 등(1997)은 임신 초기 4주 동안 주 2회 채란 및 다음 4주 동안 난자 회수 3일전에 FSH를 이용한 감량법으로 과배란 처리군과 무처리군의 비교에서 채란 회수당 13 \pm 0.9개 및 7 \pm 0.9개의 난자를 회수하였다. 본 연구에서는 매주 3~4일 간격의 비임신군 및 임신군에서 1회 회수 평균 10.6 \pm 3.9개 및 13.0 \pm 4.3개의 난포

흡입으로 평균 5.4 \pm 3.4개 및 7.7 \pm 3.6개의 난자를 회수한 결과는 Scott 등(1994)이 보고한 주 2회 채란으로 7.7 \pm 4.5개의 난자를 회수하여 45.2%의 회수율을 보여 본 연구의 1회 회수 난자의 평균수와 유사하였으나, 난자의 회수율에서는 비임신군(50.5%)과 임신군(59.2%)보다 낮았으며, Gibbons 등(1994)이 비임신우에서 주 1회 및 2회 채란 각각 6.8 \pm 2.0개 및 6.3 \pm 1.1개를 회수한 보고는 본 연구와 유사하였다. Chaubal 등(2006)은 호르몬 무처리우에 1회/주와 2회/주 1~5일 간격으로 10주 동안의 채란으로 각각 7.8 \pm 2.4와 6.5 \pm 2.4의 난포를 흡입하여 회수된 난자는 4.6 \pm 1.9개 및 3.9 \pm 2.1개로 보고하였다. 이러한 결과는 소에서 초음파 기기를 이용한 채란에서 채란을 위한 과도한 난소자극, needle 및 마취제 등에 의한 스트레스 등을 donor가 수용할 수 있는 범위에 대한 개체 간의 차이와 시술자의 숙련도에 의해 임신 유지 및 각 채란 방법에 따라 회수되는 난자의 수량이 다른 결과가 나타날 것으로 사료된다.

2. 임신 및 비임신우의 난자 등급

임신 초기의 임신우와 비임신우에서 회수된 난자의 등급은 Table 2와 같다. 난자 등급은 비임신우 및 임신우에서 평균 5.4 \pm 3.4개 및 7.7 \pm 3.6개, 회수된 난자의 Grade II(평균 2.1 \pm 2.1개 및 2.4 \pm 2.2개)와 Grade IV(평균 0.8 \pm 1.3 및 1.2 \pm 1.5개)에서는 유의적인 차이가 없었으나, Grade I(평균 1.6 \pm 1.2 및 2.4 \pm 1.3

Table 2. Number and grade of follicular oocytes collected by OPU from non-pregnant and pregnant Holstein heifers

Pregnant status	Total No. of session	Total No. of oocytes collected (Mean \pm SD)	Grade of oocytes collected (Mean \pm SD)				
			G I	G II	G III	G IV	Grade I+II
Non-pregnant	68	364 ^a (5.4 \pm 3.4)	107 ^a (1.6 \pm 1.2)	143 (2.1 \pm 2.1)	63 ^a (0.9 \pm 1.4)	51 (0.8 \pm 1.3)	250 ^a (3.7 \pm 2.7)
Pregnant	34	261 ^b (7.7 \pm 3.6)	83 ^b (2.4 \pm 1.3)	82 (2.4 \pm 2.2)	56 ^b (1.6 \pm 1.9)	40 (1.2 \pm 1.5)	165 ^b (4.9 \pm 2.6)

Values with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$). (Mean \pm SD) denotes mean \pm SD per session.

개)과 Grade III(평균 0.9 ± 1.4 및 1.6 ± 1.9 개)으로 회수된 난자의 등급은 유의차가 있었으며, Grade I, II 등급의 출현율은 각각 평균 3.7 ± 2.7 개 및 평균 4.9 ± 2.6 개로 임신우에서 유의적으로 높게 나타났다. Garcia 등(1998)이 Holstein 육성우를 이용하여 주 1회 및 2회 반복적 채란의 효과에서 주당 2회 채란이 효과적이며, 또한 회수된 1, 2 등급 난자의 평균 수 및 품질이 3, 4등급보다 높은 결과는 본 연구의 주당 2회 채란으로 회수된 난자의 등급 비율과 유사하였다.

3. 임신 및 비 임신우의 난포란 분할률 및 배반포 발달률
임신 초기 및 비 임신우로부터 채취한 난포란을 각 개체별 체외성숙 및 체외수정 후 배반포의 발생율을 Table 3에서 나타낸 결과와 같다. 비 임신우의 수정 및 분할률에서 221개(3.3 ± 2.4), 임신우는 158개(4.8 ± 2.3)로 유의적으로 높게 나타났으나, 이식 가능한 배반포 발달이 93개 및 58개, 발달률은 25.5% 및 22.2%로 임신 초기 개체에서 낮은 비율을 보였으나 유의차는 없었으며, 평균 배반포 발달은 평균 1.4 ± 1.1 개 및 1.7 ± 0.9 개로 채란 회수당 비 임신우보다 임신우의 평균 수가 높았으나 유의차는 없었다. 임신 초기우에서 Guyader 등(1997), Reinders 등(1996) 및 이 등(1998)에 의한 임신 초기우에서 난포란 채란과 Chaubal 등(2006)이 호르몬 무처리군에서 주 1회 및 2회 채란으로 이식가능한 수정란이 0.9 ± 0.9 및 0.8 ± 0.9 개와 이 등(1998)은 인공수정 후 40일부터 90일까지 10일 간격 채란으로 0.4~1.0개를 생산한 보고는 비임신우 및 임신 초기우에서 주 2회 채란에 의해 1.4 ± 1.1 개 및 1.7 ± 0.9 개의 본 연구와 다른 결과를 보였다. 그러나 이러한 결과들은 채란 회수, 방법 및 배양 기법 등이 개선된다면 유전적 능력이 우수한 개체에서 보다 많은 이식 가능한 수정란 생산의 활용도가 높은 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 유전적 가치가 높은 가축을 OPU 기술을 이용하여 단기간에 반복적이고 연속적으로 생체 내 난포란을 채

란하여 수정란을 생산할 수 있는 가능성을 연구한 것으로서, 수정란의 안정적인 생산 및 이식으로 가축 개량의 세대 간격을 단축하기 위해 우수한 유전력을 가진 임신된 개체의 임신 초기 3개월 동안에 반복적인 수정란 생산 가능 여부를 조사하였다.

1. 비임신우 및 임신 초기우에 2회/주 채란으로 비임신우에서는 68회 채란으로 생성된 난포수는 721개(10.6 ± 3.9)의 난포를 흡입하여 364개(5.4 ± 3.4)의 난자를 회수하여 50.5%의 회수율을 보였으나, 임신 초기우에서는 34회 채란으로 441개(13.0 ± 4.3) 생성된 난포를 흡입하여 그중 261개(7.7 ± 3.6)의 난자가 회수되어 회수율이 59.2%로 유의적으로 높게 나타났다.

2. 초기임신우와 비임신우간의 회수된 난자의 등급은 비임신우 및 임신우에서 평균 5.4 ± 3.4 개 및 7.7 ± 3.6 개 회수된 난자에서 Grade II(평균 2.1 ± 2.1 개 및 2.4 ± 2.2 개)와 Grade IV(평균 0.8 ± 1.3 및 1.2 ± 1.5 개)는 유의적인 차이가 없었으나, Grade I(평균 1.6 ± 1.2 및 2.4 ± 1.3 개)과 Grade III(평균 0.9 ± 1.4 및 1.6 ± 1.9 개)은 유의차가 있었으며, Grade I, II 등급 출현율은 각각 3.7 ± 2.7 개 및 4.9 ± 2.6 개로 채취한 임신우에서 유의적으로 높게 나타났다.

3. 임신 초기우 및 비임신우로부터 채취한 난포란을 각 개체별 체외성숙 및 체외수정 후 배반포의 발생률은 수정 및 분할률에서 평균 3.3 ± 2.4 개, 임신우에서는 평균 4.8 ± 2.3 개로 유의적으로 높게 나타났으나, 이식가능한 배반포 발달은 93개 및 58개, 발달률은 25.5% 및 22.2%로 임신우에서 낮았으며, 또한 채란 회수당 평균 배반포 발달에서는 1.4 ± 1.1 개 및 1.7 ± 0.9 개로 임신우의 평균 수가 많았으나 유의차는 없었다.

이상의 본 연구의 결과에서 가축의 임신 초기 개체에서도 1주일에 2회 반복적으로 OPU를 실시한 후 체외성숙 및 체외 배양을 통해 반복적으로 이식 가능한 수정란을 생산하였다. 이러한 방법은 가축의 초기 임신우로부터 채란이 가능하므로 개체의 임신에 대한 불안감을 해소할 수 있으며, 유전적으로 아주 우수한 고능력우를 임신 기간 중에도 공란우로 이용하여 반복적으로 수정란의 생산이 가능하므로 그 이용의 활용도가 높을 것으로 사료된다.

Table 3. Development of oocytes collected by OPU(ovum pick-up) from non-pregnant and pregnant Holstein heifers

Pregnant status	No. of session	No. of collected oocytes	No. of cleaved embryos (Mean \pm SD)	No. of blastocysts	
				No. of BL (%)	No. of average BL per session
Non-pregnant	68	364	221 ^a (3.3 ± 2.4)	93(25.5)	1.4 ± 1.1
Pregnant	34	261	158 ^b (4.8 ± 2.3)	58 (22.2)	1.7 ± 0.9

Values with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$). (Mean \pm SD) denotes mean \pm SD per session.

참고문헌

- Bols PEJ, Vandenheede JMM, van Soom A and de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43:677-687.
- Brogliatti GM and Adams GP. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology* 45:1163-1176.
- Broussard JR, Rocha A, Lim JM, Blar RM, Roussel JD and Hansel W. 1996. The effect of environmental temperature and humidity on the quality and developmental competence of bovine oocytes obtained by transvaginal ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology* 45:351 (Abstr).
- Bungartz L, Lucas-Hahn D, Rath D and Niemann H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and different reproductive stages. *Theriogenology* 13:667-675.
- Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PEJ, Riesen JW, Tian X and Yang X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65:1631-1648.
- Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA and Robl JM. 1996. Prepubertal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology* 45:121-130.
- Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE and Gwadauskas FC. 1994. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 41:206 (Abstr).
- Gibbons JR, Krisher RL, Carlin RE, Pearson RE and Gwadauskas FC. 1995. *In vitro* embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular oocyte aspiration. *Theriogenology* 43:1129-1139.
- Guyader JC, Ponchon S, Thuard JM, Durand M, Nibart M, Marquant-Le Guemme B and Hombolt P. 1997. Effects of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and *in vitro* embryo production in pregnant heifers. *Theriogenology* 47:157 (Abstr).
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Mc-Cauley AD, Hower SA, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-159.
- Jeong WJ, Cho SJ, Lee HS, Deb GK, Lee YS, Kwon TH and Kong IK. 2009. Effect of cytoplasmic lipid content on *in vitro* developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology* 72:584-589.
- Kruip ThAM, Boni R, Roelofsen MWM, Wurth YA and Pieterse MC. 1994. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 39:251 (Abstr).
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D and Evans ACO. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65:137-152.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cow. *Theriogenology* 41:67-72.
- Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB and Godke RA. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.* 73:967-974.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL and Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59:651-674.
- Petyim S, Bage R, Hallap T, Bergqvist AS, Rodriguez-Martinez H and Larsson B. 2003. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: Effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology* 60:175-188.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TM and Taverne MA. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30:751-762.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip TM, Willemsse AH and Taverne MA. 1991a. Characteristics of bovine estrus cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology* 35:401-413.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip TM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willemsse AH and Taverne MAM. 1991b. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration bovine oocytes. *Theriogenology* 35:19-24.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip TM, Wurth YA, van Beneden TH, Willemsse AH and Taverne MA. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG-treated cow. *Theriogenology* 37:273 (Abstr).
- Presicce GA, Jiang, S, Simken M, Zhang L, Looney CR, Godke RA and Yang X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in pre-

- pubertal calves. *Biol. Reprod.* 56:386-392.
- Reinders JMC and van Wagtenonk-de Leeuw AM. 1996. Improvement of a moet program by addition of *in vitro* production of embryos after ovum pick up from pregnant donor heifers. *Theriogenology* 45:354 (Abstr).
- Scott CA, Robertson L, Mousra RTD, Paterson C and Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet. Rec.* 134:440-443.
- Stubbings RB and Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* 43:705-712.
- Thibier M. 2008. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. *Embryo Transfer Newsletter (IETS)* 26:4-9.
- Van Wagtenonk-de Leeuw AM, Mullaart E, Roos de APW, Merton JS, Den Daas JHG and de Ruigh L. 2000. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53: 575-597.
- Walton JS, Christie KA and Stubbings RB. 1993. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on ovarian dynamics. *Theriogenology* 39:336 (Abstr).
- Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH and Buckner PJ. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 113:247.
- 이병천, 윤기영, 김정태, 이강남, 노상호, 신태영, 박종임, 김남렬, 주석천, 백남용, 이은송, 임정묵, 이우근, 황우석, 1998. 초음파 유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구. 2. 임신우 유래 난포란으로 부터 산자생산에 관하여. *한국수정란학회지* 13:77-86.

(접수: 2011. 2. 24 / 심사: 2011. 2. 25 / 채택: 2011. 3. 2)