

Research Article

## 티모시 건초 급여 한우 씨수소 정소상체 정자의 수정 효과

강성식, 김의형, 이석동, 이명숙, 조상래\*  
농촌진흥청 국립축산과학원 한우연구소

### Effect of sperm penetration of oocytes after *in vitro* fertilization (IVF) with cauda epididymal spermatozoa in Hanwoo bull after feeding of timothy hay

Sung-Sik Kang, Ui-Hyung Kim, Seok-Dong Lee, Myeong-Suk Lee and Sang-Rae Cho\*

Hanwoo Research Institute, NIAS, RDA, Pyeongchang, Kangwondo, 25340 Republic of Korea

#### ABSTRACT

In this study, we examined effect of sperm penetration of oocytes after *in vitro* fertilization (IVF) with cauda epididymal spermatozoa in Hanwoo bull after feeding of timothy hay. One testicle with epididymides was castrated from one Hanwoo bull (14 months of age) and spermatozoa recovered from cauda epididymis and cryopreserved. As control, frozen Hanwoo semen was used. Matured cumulus oocyte complexes were co-incubated with frozen-thawed cauda epididymal spermatozoa for 12 or 18 hours. After IVF, presumptive zygotes were cultured in modified synthetic oviductal fluid. In experiment 1, we examined sperm penetration rate at 12 hours of IVF with epididymal sperm. Total penetration rate among cauda epididymis and control was similar(mean±standard error, cauda epididymis and control vs. 49.7±11.3 and 54.4±12.8%). In experiment 2, cleavage and blastocyst developmental rate were evaluated at day 2 and day 8 after IVF for 18 hours. Cleavage rate among cauda epididymis and control was similar(cauda epididymis and control vs. 81.2±3.4 and 82.7±2.5%). However, blastocyst developmental rate of cauda epididymis group was significantly higher than that of control group(cauda epididymis and control vs. 24.4±1.6 and 12.2±2.8%,  $p<0.05$ ). In conclusion, cauda epididymal spermatozoa in Hanwoo bull has high embryo developmental competence and can be used as an alternative to ejaculated frozen sperm *in vitro*.

(Key words: cauda epididymal sperm, development, fertilization, Hanwoo, oocyte)

#### I. 서론

한우의 개량에 대한 연구는 매우 다양한 방법으로 접목되어 오고 있다. 축산 현장에서는 고능력 보증씨수소 정액을 사용하는 인공수정 방법과 암소의 혈통을 고려한 수정란이식 방법이 이루어지고 있다. 한우의 정자와 난자를 이용하여 산업적 활용가치를 높여 생산성을 향상시켜 농가의 이익에 도움이 되는 연구는 많은 연구자들에 의해 진행되어왔다. 정소상체 정자에 대한 연구는 수소(Martins et al., 2007), 염소(Kikuchi et al., 1998), 숫양(Abella et al., 2015), 그리고 수말(Papa et al., 2008) 등에서 이루어지고 있다. 농가에서는 수소를 거세하여 비육하는 방법이 널리 이용되고 있다 (Coetzee et al., 2010). 우리나라에서 거세우는 비육되어 도축된 후 도체 등급에 따라 분류되어 활용되고 있다(Park et al., 2002). 거세를 실시함으로써 고급육 생산 가능성이 높아져 농가 소득의

증대로 이어지고 있다. 씨수소의 도체형질 검정을 위해서는 자손의 능력을 검정하거나 형매의 능력을 검정하는 방법을 주로 사용하고 있다. 후대검정은 검정기간이 길고 비용이 많이 소요되어 소규모 집단의 개량에는 적합하지 않으며 또한 형매검정의 경우 최대 정확도가 50%로 후대검정과 같은 정확도를 얻기가 매우 어려운 실정이다. 당대검정이 끝난 씨수소의 정소에서 정자를 채취하고, 씨수소를 비육하게 되면 검정기간을 단축하고 소규모 집단의 씨수소 선발과 산육 및 도체능력의 검정이 가능할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 생후 12개월령에 당대 검정이 종료된 14개월령 씨수소를 거세하여 정소에서 정소상체 정자를 채취하고 동결 보존하였다. 정소상체 정자의 활용성을 검증하기 위해서 체외수정을 통한 정소상체 정자의 난자 침투 능력과 수정란의 생산 능력을 분석하였다. 수정란 생산은 우수 유전형질을 보유하고 있는 암가축으로부터 다수의 수정란을 회수하여 다른 개

\*Corresponding author: Sang-Rae Cho, Hanwoo Research Institute, NIAS, RDA, Pyeongchang, Kangwondo, 25340 Republic of Korea, Tel: +82-33-330-0625, E-mail: chosr@korea.kr

체에 이식후 자축을 생산함으로써 우수한 유전형질을 가진 개체를 효과적으로 증식시킬 수 있고, 형질이 동일한 다수의 자축을 짧은 기간내에 생산이 가능하므로 가축 개량에 매우 유용하게 이용 가능한 방법이다(Christensen, 1991; Smith, 1984). 정소상체 미부 정자를 이용한 인공수정과 수정란 생산 가능성에 대한 연구가 진행되고 있다. 한우에서는 13개월령의 한우 정소상체 정자를 채취하여 수정 능력과 발달률을 확인하여, 정소상체 정자의 체외수정에 이용 가능함을 밝혔다(Yang et al., 2015). 그러나 개체에 따른 정소상체 정자의 수정 능력과 수정란 발달률에 차이가 있을 가능성이 있어(Martins et al., 2007), 다른 개체에서 채취한 정소상체 정자의 경우에도 수정 능력과 수정란 발달률에 차이가 없는지 검증하기 위해 본 연구를 수행하였다. 정소상체 정자 동결 용해 후 12시간 후의 난자 침투능력과 체외에서 8일간 배양한 후 배반포 발달률을 측정하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사양관리 및 정소상체 정자 회수 및 동결

14개월령 한우 씨수소 사양관리는 3개월간 농후 사료는 체중의 1.8%를 급여하고 양질의 티모시 건초를 자유채식 시켰다. 정소상체 정자 채취를 위해서 국립축산과학원 한우연구소에서 보유중인 14개월령의 씨수소 1두에서 거세된 정소의 정소상체 미부로 부터 정자를 회수하였다. 정자 회수를 위해서 정소는 생리식염수가 포함된 플라스틱 봉지에 담아 약 4℃를 유지하여 이동용 캐리어에 담아 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 정소의 백막을 제거하고, 정소상체 미부를 회수하여 세절법을 이용하여 정소상체 미부 정자를 회수 하였다(Yang et al., 2015). 약 3~4 cm의 정소상체 미부 조직을 분리하여 100 $\mu$  디시에서 약 10ml의 동결 희석액(OptixCell, IMV Technologies, France)을 첨가한 후, 수술용칼(No. 21, AILEE, Korea)을 사용하여 잘게 세절하였다. 세절된 조직은 동결희석제에 혼합하여 세포 거름망(100  $\mu$ m nylon mesh, Falcon)을 통해서 불순물을 제거하였다. 희석정액의 활력을 확인하고, 혈구 계산판을 이용하여 희석정액내의 정자 농도를 측정하였다. 정자의 최종농도는  $4 \times 10^7$ /ml 개로, 4℃에서 4시간 이상 보관하였다. 희석 정액을 0.5ml 스트로에 주입한 후, 스트로 파우더를 이용하여 스트로를 밀봉하였다. 액체 질소면 3-4cm 위에 스트로를 약 14분간 정지 시킨 후, 액체질소에 침지하고 고블렛과 케인에 담아 액체질소 탱크 내에 보관하였다. 체외수정을 위해 동결 스트로를 액체질소 탱크 꺼내

어 공기중에 약 10초간 노출한 다음 37℃ 온수에서 약 40초간 용해하여 사용하였다.

### 2. 미성숙 난자의 체외성숙

체외수정란 생산 실험을 위해서 도축장 유래 난소를 회수하여 실험실로 운반하였다. 난소의 수송은 보온병에 0.9% 생리식염수에 항생제(녹십자, 콤비마이신, 프로카인 페니실린 G 200,000IU, 황산 디하이드로 스트렙토마이신 250mg) 첨가하였으며, 온도는 25℃로 맞추어 실험실로 2시간 이내로 운반하였다. 난포란 회수는 난소에서 직경이 2~6mm의 가시난포에서 19 gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 난포란을 채취하였다. 체외성숙을 위해서 난포란은 1, 2등급(IETS 기준)만을 사용하였다. 체외성숙을 위해서 M199(Sigma, U.S.A)를 기본배양액으로 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, U.S.A), 10  $\mu$ g/ml LH (Sigma, USA) 및 10  $\mu$ g/ml FSH (Sigma, USA)를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>인큐베이터 내에서 22~24시간 동안 배양을 실시하였다.

### 3. 체외수정과 핵형 분석

체외수정에 사용된 정액은 대조구로 2두의 한우동결정액(KPN)을 이용하였으며, 처리구는 정소상체 미부 정액을 사용하였다. 정자분리는 45/90% Percoll 농도구배로  $\times 700G$ 에서 20분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 정자 pellet을 약 6ml의 modified Brackett and Oliphant (mBO)-defined medium (DM) 배지를 이용하여 희석 후,  $\times 500G$ 에서 5분 동안 원심분리하여 침전된 정자를 회수하였다. 수정 배지는 2.5mM의 theophylline과 3mg/ml의 BSA가 첨가된 mBO-DM 배지를 사용하였다. 약 10-15개의 성숙난자를 100 $\mu$ l 미세소적에서  $5 \times 10^6$ cells/ml 농도의 정자와 공배양하여 수정을 유도하였다. 체외 수정 12시간 또는 18시간 후 체외성숙된 난포란의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 1% FBS가 첨가된 TALP-HEPES 배지 500 $\mu$ l를 15ml cornical tube에 넣고 약 1분간 vortexing 후 회수하였다. 난자내에 정자의 침투율을 조사하기 위해서 체외수정 후 12시간째 전핵을 조사하였다. 수정후의 난자를 에탄올:빙초산=3:1 용액에 고정시킨 후 1% aceto-orcein으로 염색하여 핵형을 조사하였다. 웅성전핵과 자성전핵 형성(2 pronucleus, 2PN)을 정상적으로 수정된 난자로 그리고 1개의 전핵(1PN)과 expanded sperm head(ESH), 그리고 polyspermy 형태는 비정상적인 수정의 형태로 평가하였다.

### 4. 수정란 체외배양

체외배양에 사용된 수정란은 체외수정 후 체외배양은 Modified synthetic oviductal fluid를 사용하였다(Kang et al., 2015). 수

정란 배양조건은 38.5°C 온도에서 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 그리고 90% 질소가 포함된 배양조건에서 약 20~30개의 수정란을 30μl의 미세소적에서 배양하였다. 체외수정 후 2일 후에 분할률을, 8일 후에 배반포 발달률을 조사하였다.

### 5. 통계처리

실험결과의 통계적 분석은 SAS program(Statistics Analytical System. ver. 9. 3)을 사용하여 One-Way ANOVA로 통계 분석 및  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 분석하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 정소상체 정자를 사용한 체외수정 12시간 후의 난자 침투율 분석

14개월령 한우 정소상체 미부에서 회수한 정자를 동결 용해 후 성숙 난자와의 공배양을 통한 침투율 조사는 Table 1에 나타냈다. 전체 정자의 침투율에서는 정소상체 정자 49.7%, 대조구 정자 54.4%로서 유의적인 차이는 보이지 않았다. 정상수정의 비율은 정소상체 정자가 18.5%, 대조구 정자는 36.7%로 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 비정상 수정율(1PN, ESH, polyspermy)에서도 정소상체 정자 그룹과 대조구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. Yang et al. (2015)은 13개월령 한우 정소상체 정자와 성숙 난자를 18시간 공배양 후, 정자의 난자 침투율을 비교하였다. 유의적인 차이는 없었지만 정소상체 정자의 난자 침투율은 86.4%로 대조구 정자

74.7%에 비해 높은 결과를 나타냈다. 이 결과는 체외배양시 정소상체 정자의 수정 능력이 대조구 정자에 비해 떨어지지 않음을 시사한다.

### 2. 정소상체 정자와 대조구 정자를 이용한 체외 발달률 비교

Table 2에는 동결 용해 정소상체 미부 정자를 채취한 정자와 대조구 정자를 각각 사용하여 체외수정 후 난자의 분할률과 발달률을 조사하였다. 본 연구에서 정소상체 정자를 이용한 체외수정 후 발달률 조사를 위해서 총 111개의 난자를 사용하였으며, 대조구에는 462개의 난자를 사용하였다. 체외수정 후 분할률은 정소상체 정자는 81.2% 그리고 대조구의 정자는 82.7%로서 유사한 경향을 보였으나, 체외수정 후 8일째 배반포 수정란의 발달률에서는 정소상체 미부 정자가 24.2%로서 대조구 정자의 12.2% 보다 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). Martins et al. (2007)의 보고에 따르면, 3두의 정소상체 정자를 이용한 체외수정 후 발달률을 비교하였을 때, 배반포 발달률이 25.2~43.6%로 수소 개체에 따라 차이가 있지만, 배반포 발달률이 25%이상으로 정소상체 정자를 이용하여도 수정란 생산에 문제가 없는 것으로 보고하였다. 또한, Yang et al. (2015)의 보고에서도 13개월령의 한우 수소 정소상체에서 정자를 회수하여 난자와 체외수정 시킨 결과, 분할률은 정소상체 정자를 이용시 80.1%, 대조구는 70.6%를 나타냈다. 배반포 발달률에서도 유의적인 차이는 없었으나 정소상체 정자를 이용하였을 때 25.9%로 대조구 20.2%에 비해 높게 나타났다. 상업적으로 판매되는 동결 용해 정자에 비하여 14개월령의 정소상체 정자를 이용하였을 때의 수정란 생산성이 떨어지지 않는 결과로 볼 때, 한우의 정소상체 정자를 이용한 수정란 가능할 것으로 사료된다. 본 연

Table 1. Penetration rate of frozen-thawed sperm derived from cauda epididymis at 12h after IVF

Sperm	No. of oocytes	Percentage of				
		Total penetration	2PN	1PN	ESH	polyspermy
Epididymis	33	49.7±11.3	18.5±6.0	11.8±6.0	20.3±6.0	2.6±2.6
Control	35	54.4±12.8	36.7±3.3	5.6±2.9	10.0±5.8	2.2±2.2

Mean±SE, Means with the different letter are significant( $p < 0.05$ ).

Table 2. Comparison of *in vitro* development rate after IVF with frozen-thawed cauda epididymal and control sperm in Hanwoo bull

sperm	No. of oocytes (Replicate)	Developmental rate (No.)	
		Cleavage	Blastocyst
Epididymis	111(4)	81.2±3.4(139)	24.4±1.6(34) <sup>a</sup>
Control	462(6)	82.7±2.5(383)	12.2±2.8(61) <sup>b</sup>

Mean±SE, Means with the different letter are significant( $p < 0.05$ ).

구에서 정소상체 정자를 이용하였을 때 배반포 이 높았던 이유는 다음과 같이 추측해 볼 수 있다. 일반적으로 인공질을 통한 정액 채취시 정소상체 미부 유래 정자와 부생식선 유래 정장이 섞여 나오게 된다. 그러나, 정소상체 미부 정자는 정장에 노출이 되지 않아 동결 용해 후 활력과 세포막 기능이 높고, 침체의 손상도 적은 것으로 수말(Guimarães et al., 2012), 숫양(García-Álvarez et al., 2009)에서 보고되었다. 본 연구에서도 정소상체 미부 정자 회수시 정장이 포함되지 않아 동결 용해 후 정자의 상태가 좋아 배반포 발달률에 영향을 미친 것으로 추측한다. 그러나 소 정소상체 정자에 정장을 첨가하였을 때, 동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서 제시한 바와 같이 한우 정소상체 정자를 이용한 배반포 생산을 통해 개량이 가능하지만, 수정란의 체외 배양에 필요한 장비와 숙련된 기술을 필요로 한다. 수정란 생산 조건이 갖추어져 있지 않은 현장에서는 인공수정을 통하여 정소상체 정자를 이용하고, 인공수정에 정소상체 유래 정자를 이용하기 위한 효율적인 정소상체 정자의 동결 방법이 연구되어야 할 것으로 사료된다.

#### IV. 요약

본 연구는 티모시 건초와 농후 사료 위주의 사료를 급여한 한우 씨수소 정소상체 정자 체외수정 효율 조사를 통해 정자의 활용 가능성을 조사하였다. 농후 사료는 체중의 1.8%를 급여하고 양질의 티모시 건초를 자유채식 시킨 14개월령 거세우의 정소에서 분리된 정소상체 미부의 정자를 회수하고 동결 용해 후 체외수정을 실시한 결과는 다음과 같다. 웅성전핵과 자성전핵이 형성(2PN)된 난자는 정상수정으로, 1개의 전핵(1PN), Expanded Sperm Head (ESH), Polyspermy 형태는 비정상적인 수정의 형태로 평가하였다. 정상적으로 수정된 난자의 비율은 정소상체 정자의 경우 전체 침투율은 49.7% 그리고 정상적인 2PN을 가진 난자는 18.5%를 보였으며, 대조구 정자의 전체 침투율은 54.4%로서 정소상체 정자 보다 높은 결과를 보였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 정상적으로 2PN을 형성한 비율은 36.7%로서 정소상체 정자를 이용한 정자 보다 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 체외수정 후 발달률 조사에서 정소상체 정자의 분할률은 81.2%, 대조구 정자는 82.7%로 유사한 결과를 보였으나, 배반포 발달률은 정소상체 정자 24.4%와 대조구 정자 12.2%로 정소상체 정자를 사용한 난자의 발달에서는 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ).

#### V. 사 사

본 논문은 농촌진흥청연구사업 초음파유도 생체채취 난포란에 의한 동기우 생산기술개발 : (PJ01029103)의 지원에 의해 이루어진 것임.

#### VI. REFERENCES

- Abella, D.F., Da Costa, M., Guerin, Y. and Dacheux, J.L. 2015. Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4 degrees C. *Animal*. 9:313-319.
- Christensen, L.G. 1991. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology*. 35:141-149.
- Coetzee, J.F., Nutsch, A.L., Barbur, L.A. and Bradburn, R.M. 2010. A survey of castration methods and associated livestock management practices performed by bovine veterinarians in the United States. *BMC Veterinary Research*. 6:12.
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Martínez-Pastor, F., Garde, J.J., Ramón, M. and Fernández-Santos, M.R. 2009. Sperm characteristics and *in vitro* fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology*. 72:160-168.
- Guimarães, T., Lopesa, G., Ferreira, I., Leal, A. and Rocha, A. 2012. Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Animal Reproduction Science*. 136:85-89.
- Kang, S.S., Koyama, K., Huang, W., Yang, Y., Yanagawa, Y., Takahashi, Y. and Nagano, M. 2015. Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts *in vitro*. *The Journal of reproduction and development*. 61:99-105.
- Kikuchi, K., Nagai, T., Kashiwazaki, N., Ikeda, H., Noguchi, J., Shimada, A., Soloy, E. and Kaneko, H. 1998. Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. *Theriogenology*. 50:615-623.
- Martins, C.F., Rumpf, R., Pereira, D.C. and Dode, M.N. 2007. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction Science*. 101:326-331.
- Papa, F.O., Melo, C.M., Fioratti, E.G., Dell'aqua Jr, J.A., Zahn, F.S. and Alvarenga, M.A. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*. 107:293-301.
- Park, G.B., Moon, S.S., Ko, Y.D., Ha, J.K., Lee, J.G., Chang, H.H. and Joo, S.T. 2002. Influence of slaughter weight and sex on yield and

- quality grades of Hanwoo (Korean native cattle) carcasses. *Journal of Animal Science*. 80:129-136.
- Smith, C. 1984. Genetic improvement of livestock, using nucleus breeding units. *World Animal Review*. 65:2-10.
- Yang, B.C., Kang, S.S., Park, C.S., Kim, U.H., Kim, H.C., Jeon, G.J., Kim, S., Lee, S.D., Lee, H.J. and Cho, S.R. 2015. Motility, fertilizability and subsequent embryonic development of frozen-thawed spermatozoa derived from epididymis in Hanwoo. *Journal of Embryo Transfer*. 30:271-276.
- (Received : November 29, 2018 | Revised : December 3, 2018 | Accepted : December 3, 2018)