

## 牛 受精卵의 Bisection 과 移植에 관한 研究

鄭柄鉉 · 池喜俊 · 李相鎭 · 李東熙 · 丁泰榮 · 鄭吉生

建國大學校 畜產大學

### Studies on Bisection of Bovine Embryos and Embryo Transfer

Chung, B. H., H. J. Chi., S. J. Lee., D. H. Lee., T. Y. Chung, K. S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

#### Summary

These experiments were carried out to develop the practical technique for the production of identical twins in cattle.

Morula and blastocyst stage embryos collected from superovulated donors were bisected into halves by micromanipulation. The resulting demi-embryos were transferred to the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum of synchronous recipients. The viability of demi-embryos after splitting was also evaluated by culturing demi-embryos with and without a zona-pellucida.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. Of total 132 embryos collected by superovulation from 29 donors, 37 embryos were morular and 30 at blastocyst stages.
2. Total 111 demi-embryos were produced from 67 embryos by bisection and 98% of those were normal in morphology.
3. The viability of the demi-embryos cultured with zona-pellucida ranged from 70 to 76.5% and that of the demi-embryos without from 53.8 to 69.2%.
4. The viability of demi-embryos obtained from morula was 63.6% and that of demi-embryos from blastocyst was 73.3%, respectively.
5. 35 demi-embryos were transferred to 21 recipients, 7 of which were confirmed to be pregnant by rectal palpation at 55-60 days after embryo transfer. One of them produced a calf and 6 are still on pregnancy.

#### I. 緒 論

家畜에 있어서 Bisection 에 의한 一卵性 雙子의 人爲的 作出方法은 受精卵의 利用效率을 增加시키

으므로 家畜改良에 크게 이바지할 수 있다는 産業的인 측면 이외에도 生産된 一卵性 雙子는 遺傳的 組成이 同一하므로 遺傳學, 育種學 및 發生學 研究의 有用한 材料로서 利用될 수 있다는 學問的인 측면에

• 本 研究는 韓國遺傳工學研究組合의 支援에 의하여 遂行되었음

서도 그 價値를 찾아볼 수 있다.

Bisection 에 의한 一卵性 雙子生産에 관한 研究는 Siedel(1952) 等이 rabbit 의 2細胞期 受精卵의 한 쪽 割球를 物理的으로 破壞시킨 후, 受卵畜에 移植하여 産子를 生産함으로써 哺乳動物에서도 demi-embryo 만으로 正常的인 産子를 生産할 수 있다는 可能性을 提示한 이래 實驗 小動物 및 中小家畜에서 一卵性 雙子生産에 관한 많은 研究들이 試圖되었다 (Mouse : Tarcowski, 1959., Tsunoda, 1983., Rabbit : Siedel, 1952., Brochart, 1954., Sheep : Willadsem, 1979., Gatica, 1984., Goat : Moor, 1971., Tsunoda, 1985).

이들의 研究가 成功的인 結果를 나타냄에 따라 1980 年代에 들어서면서 부터 大家畜인 소를 實驗對象으로 한 一卵性 雙子生産의 研究가 主를 이루며 활발히 進行되어 왔다(Williams, 1982., Lambeth, 1983., Brem, 1984., McFarland, 1985., McEvoy, 1987).

이와 아울러 소의 一卵性 雙子生産과 관련된 많은 基礎研究들이 이루어졌는데 Williams(1984) 等은 桑實胚보다는 胚盤階段의 受精卵에서 由來된 demi-embryos 가 보다 높은 體外發達率 및 着床率을 나타낸 研究結果를 얻었으며 Baker(1985) 等은 demi-embryos 의 體外培養時 透明帶가 存在하는 demi-embryos 가 透明帶가 存在하지 않은 demi-embryos 보다 더 높은 生存率을 나타낸 結果를 報告함으로써 透明帶 存在의 重要性을 強調한 반면 Hoppe(1983), MacFarland(1985) 等은 透明帶를 利用하지 않은 裸胚狀態의 demi-embryo 에서도 透明帶가 存在한 demi-embryos 와 類似한 生存率 및 妊娠率을 얻었다는 相反된 結果를 보고한 바 있다.

한편 demi-embryos 를 移植함에 있어서 demi-embryo 作成 後 體外培養없이 바로 受卵牛에게 移植하여 良好한 成績을 얻었다는 研究結果(Baker, 1985) 및 demi-embryos 를 黃體가 形成된 子宮에 2個를 同時에 移植하여 1個만을 移植하였을 때보다 더 높은 妊娠率과 雙子生産率을 얻었다는 研究結果(Gatica, 1984., Baker, 1985)가 報告되었다.

本 研究는 그 동안 實驗室에서 Mouse 를 對象으로 實施하였던 基礎實驗을 통하여 習得된 知識과 技術을 바탕으로 소에서 Bisection 에 의한 一卵性 雙

子를 生産할 目的으로 實施하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 研究期間 및 場所

本 研究는 1988 年 6 月부터 1989 年 7 月까지 1 年間 斗山開發의 安眠島 大單位 牧場과 京畿道 加平郡 外西面 所在 푸른牧場 및 建國大學校 畜産大學 家畜 繁殖學 研究室 等에서 實施하였다.

### 2. 供試動物

正常的인 發情週期가 反復되는 韓牛 6 頭(未經産牛 : 4 頭, 經産牛 : 2 頭) 및 Holstein 23 頭(未經産牛 : 8 頭, 經産牛 : 15 頭)를 供卵牛로, Holstein 21 頭(經産牛)를 受卵牛로 各各 供試하였다.

### 3. 培養液

受精卵의 回收, 微細操作, 體外培養 및 移植 等を 위한 基礎培養液으로 Ham's F-10 을 使用하였으며 pH 는 7.4~7.5 로 滲透壓은 290~300 mOsm 로 調整하였다. 한편 犢牛血清(fetal calf serum : FCS) 의 濃度는 受精卵 回收時에는 1%, 微細操作 및 體外培養時에는 20%의 FCS 를 基礎培養液에 各各 添加하여 使用하였다.

### 4. 微細操作器具

微細操作用 Micro-pipette 은 Micropuller (Narishige Co.)와 Microforge(Narishige Co.)를 利用하여, Holding pipette 은 外徑을 120~130  $\mu$ m 로, Suction 또는 Injection pipette 은 內徑을 40~50  $\mu$ m 로 製作하여 使用하였으며 Microblade 는 양날 면도칼의 날 部分을 微細하게 切斷한 후 이를 Micropipette 의 末端部에 附着하여 使用하였다.

### 5. 實驗方法

#### 가. 多排卵誘起 및 人工授精

發情週期 제 9~14 日째의 供卵牛에게 Pregnant Mare Serum Gonadotropin(PMSG) 2,500~3,000 IU 를 筋肉注射한 후 48時間째에 25 mg 의 Prostaglandin( $PGF_{2\alpha}$ )를 筋肉注射하여 多排卵을 誘起시킨 後 發情이 發現되면 Standing-estrus 期를 捕捉하여 1次 人工授精을 實施하고 12時間 間隔으

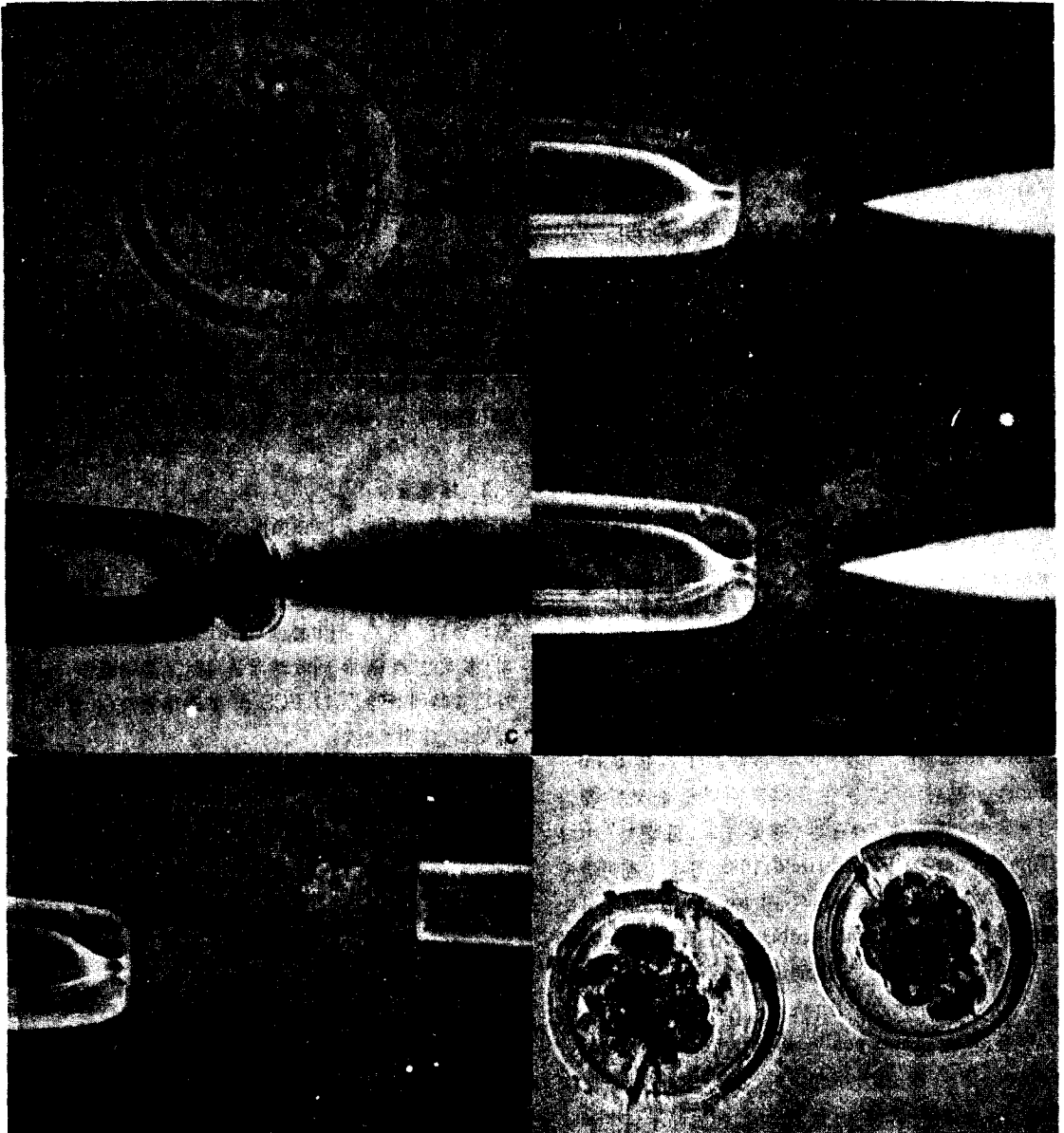


Fig. 1. Bisection procedure of bovine embryos.

- A : Intact bovine embryo.
- B : Embryo held by negative pressure on holding pipette.
- C. Bisection of embryo with the microblade.
- D : Removal of demi-embryo from the zona-pellucida.
- E : Removed a demi-embryo.
- F : A pair of identical demi-embryos.

로 2次 및 3次 人工授精을 追加로 實施하였다.

#### 나. 發情週期の 同期化

受卵牛와 供卵牛의 發情週期 同期化는 鄭(1983) 등의 方法에 準하였으며, ± 24 時間의 範圍內에서 供卵牛의 發情과 一致되는 受卵牛에게만 受精卵을 移植하였다.

#### 다. 受精卵의 回收와 受精卵의 選別

受精卵의 回收는 最終 人工授精을 實施한 후 6~7 日째에 鄭(1983c) 등의 方法에 따라 2-Way Foley Catheter 를 使用하여 非外科的인 方法으로 回收하였고, 回收된 卵子中 未受精卵과 退行卵을 除外한 正常的인 形態의 桑實胚와 胚盤胞만을 選別하여 本實驗에 供試하였다.

#### 라. 受精卵의 兩分

受精卵의 Bisection 過程은 Fig.1 에서 보는 바와 같이 選別된 受精卵을 paraffin oil 로 被覆된 培養液 小適內로 옮긴 후 Williams(1983) 등의 方法에 準하여 培養液 小適內에서 Holding pipette 으로 受精卵을 固定시킨 다음 Microblade 를 使用하여 透明帶의 一部와 그 속의 細胞質을 완전히 兩分하였다. 이어서 Suction pipette 을 利用하여 兩分된 2 個의 demi-embryos 中 한쪽만을 吸引하여 透明帶밖으로 끌어내어 미리 準備된 Surrogate 透明帶內에 注入함으로써 1 個의 受精卵으로 부터 2 個의 demi-embryos 를 生産하였다.

#### 마. Demi-embryos 의 體外培養

透明帶의 存在與否 및 受精卵의 發達段階가

demi-embryo 의 體外發達에 미치는 影響을 調查하기 위하여 桑實胚와 胚盤胞로 區分한 다음 이들을 다시 透明帶의 存在有無에 따라 分類, 모두 4 個의 demi-embryo 群으로 區分하여 同一한 條件下에서 4 時間 동안 體外培養한 후 發達狀態를 觀察하였다.

#### 바. Demi-embryos 의 移植

移植에 供試된 demi-embryos 는 透明帶가 存在하는 狀態의 demi-embryos 로서 Baker(1985) 등의 方法에 準하여 微細操作 후 體外培養을 하지 않고 바로 0.25 ml 容量의 straw(I.M.V. France)에 培養液과 함께 demi-embryo 를 吸引하여 受卵牛의 黃體가 存在하는 子宮角 先端部에 1 個 또는 2 個의 demi-embryos 를 非外科的인 方法으로 移植하였다. 移植후 55~60 日頃에 直腸檢査法으로 妊娠診斷을 實施하였다.

### III. 結果 및 考察

#### 1. 回收된 受精卵의 發達段階

最終 人工授精을 實施한 후, 6~7 日째에 非外科的인 方法으로 受精卵을 回收하여 그 發達狀態를 觀察한 結果는 Table 1 에서 보는 바와 같다.

Table 1 에서 보는 바와 같이 本 研究에 供試된 29 頭의 供卵牛에서 總 132 個의 卵子가 回收되었으며 이들 中 未受精卵은 44 個(33.3%), 退行卵은 21 個(16%)였다. 그리고 形態學的으로 正常的인 桑實胚

Table 1. Developmental stages of embryos obtained after superovulation

No. of exp.	No. of donor (species)	No. of embryos recovered	Developmental stages			
			Unfert. (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)	Deg. (%)
1	4(K 2, H 2)*	11	7(63.6)	3(27.3)	—	1( 9.1)
2	4(K 2, H 2)	13	5(38.5)	—	8(61.5)	—
3	4(K 2, H 2)	27	14(51.9)	6(22.2)	—	7(25.9)
4	5(H 5)	8	—	—	5(62.5)	3(37.5)
5	2(H 2)	41	13(31.7)	23(56.1)	—	5(12.2)
6	3(H 3)	18	3(16.7)	—	13(72.2)	2(11.1)
7	3(H 3)	8	—	5(62.5)	—	3(37.5)
8	4(H 4)	6	2(33.3)	—	4(66.7)	—
Total	29	132	44(33.3)	37(28.0)	30(22.7)	21(16.0)

\* K : Korean Native Cattle

H : Holstein

는 28%에 該當하는 37 個였고, 胚盤胞는 22.7%에 該當하는 30 個였다.

回收된 卵子中 未受精卵과 退行卵이 차지하는 比率이 높은 것은 本 實驗에 供試된 供卵牛가 多排卵 誘起에 2, 3 次 反復 使用되었기 때문인 것으로 생각 된다.

## 2. Bisection 에 의한 demi-embryo 의 作成

正常的인 形態의 桑實胚 및 胚盤胞 段階의 受精卵을 Bisection 에 供試하여 生産된 demi-embryos 의 形態의 特性은 Table 2 에서 보는 바와 같다.

Table 2 에서 提示된 바와 같이 Bisection 에 供試된 67 個의 受精卵으로 부터 82.8%에 該當하는 111 個의 demi-embryos 가 生産되었는데 이들 中 11.7%에 該當하는 13 個는 物理的인 損傷을 입었고, 88.3%에 該當하는 98 個는 特別한 損傷없이 形

態學的으로 正常이었다. 損傷을 입은 13 個의 demi-embryos 를 除外하고 損傷을 입지 않은 98 個의 demi-embryos 는 體外培養 및 移植에 供試하였다.

## 3. Demi-embryo 의 體外培養

確保된 受卵牛의 數的인 制限으로 移植에 使用하지 못한 餘分의 demi-embryos 63 個를 受精卵의 發達段階 및 透明帶의 有無에 따라 各各 4 群으로 分類하여 同--한 條件下에서 4 時間 體外培養을 實施한 후 이들의 形態學的 特徵을 比較, 分析한 結果는 Table 3 에서 보는 바와 같다.

Table 3 에 提示된 바와 같이 體外培養 후 正常的인 形態를 維持한 demi-embryos 의 比率은 桑實胚에서 由來된 demi-embryo 의 경우는 63.6%이었으나 胚盤胞에서 由來된 demi-embryos 의 경우는

Table 2. Morphological characteristics of demi-embryos obtained by bisection

No. of exp.	No. of embryos subjected to bisection	No. of demi-embryos produced (%)	Morphological characteristics	
			Damaged (%)	Undamaged (%)
1	3	5 (83.3)	1 (20.0)	4 (80.0)
2	8	14 (87.5)	1 ( 7.1)	13 (92.8)
3	6	8 (66.6)	2 (25.0)	6 (75.0)
4	5	8 (80.0)	1 (12.5)	7 (87.5)
5	23	36 (78.2)	4 (11.1)	32 (88.9)
6	13	23 (88.5)	2 ( 8.7)	21 (91.3)
7	5	9 (90.0)	—	9 (100 )
8	4	8 (100 )	2 (25.0)	6 (75.0)
Total	67	111 (82.8)	13 (11.7)	98 (88.3)

Table 3. The viability of demi-embryos after culture for 4 hr in vitro

Developmental stages of origin embryos	No. of demi-embryos	Condition of demi-embryos	Morphological characteristics	
			Normal (%)	Abnormal (%)
Morula	20	with Z.P*	14 (70.0)	6 (30.0)
	13	without Z.P	7 (53.8)	6 (46.2)
Total & Mean	33		21 (63.6)	12 (36.4)
Blastocyst	17	with Z.P	13 (76.5)	4 (23.5)
	13	without Z.P	9 (69.2)	4 (30.8)
Total & Mean	30		22 (73.3)	8 (26.7)

\* Z.P : Zona Pellucida

Table 4. Transfer of demi-embryos to recipients

No. of exp.	No. of demi-embryos transferred	No. of recipients	No. of pregnant recipients(%)	No. of offsprings	
				Single	Twin
1	4	4	1(25.0)	1	—
2	5	3	—	—	—
3	2	1	—	—	—
4	4	2	1(50.0)	—	—
5	8	4	1(25.0)	—	—
6	4	2	1(50.0)	—	—
7	6	3	2(66.6)	—	—
8	2	2	1(50.0)	—	—
Total	35	21	7(33.3)	1	—

73.3%로 다소 높았다.

또한 桑實胚에서 由來한 demi-embryo 中 透明帶가 存在하는 것과 하지 않는 것의 正常比率은 各 各 70 및 53.8%였고, 胚盤胞에서 由來한 demi-embryo 의 그것은 各 各 76.5 와 69.2%로서 透明帶속에서 培養된 쪽의 成績이 良好하였다.

이러한 結果는 demi-embryos 의 體外培養에 있어서 透明帶의 重要性을 強調한 Baker(1985) 등의 報告나 發達後期段階의 受精卵으로 부터 얻어진 demi-embryos 가 보다 良好한 發達成績을 나타냈다는 Williams(1984) 등의 報告와 그 傾向을 같이 하는 것이었다.

#### 4. Demi-embryo 의 移植

移植에 利用한 demi-embryos 는 모두 透明帶가 存在하는 狀態로서 總 35 個를 21 頭의 受卵牛에게 體外培養없이 非外科的으로 移植하였으며 그 結果는 Table 4 에서 보는 바와 같다.

移植 후 55~60 日이 經過한 다음 直腸檢査法에 의해 妊娠診斷을 實施한 結果, 頭當 1 個의 demi-embryo 를 移植한 7 頭中 2 頭가 受胎되었고, 2 個의 demi-embryos 를 移植한 14 頭中 5 頭가 受胎되어 總 受胎頭數는 7 頭로 33.3%의 受胎率을 나타내었다. 그 중 1 個의 demi-embryo 를 移植하여 受胎된 受卵牛 1 頭에서 이미 産子 1 頭가 生産되었고, 나머지는 妊娠이 進行中이다.

비록 一卵性 雙子를 生産하지는 못하였으나 現在 妊娠進行中인 6 頭의 受卵牛中 5 頭가 2 個의 demi-

embryos 를 移植한 個體들이므로 向後 雙子의 生産이 期待된다.

Fig.2 는 demi-embryo 에서 生産된 産子의 寫眞으로서 妊娠期間은 271 日(人工授精日 基準)로 다소 早産이었으나 外貌나 一切의 機能은 正常이었다.

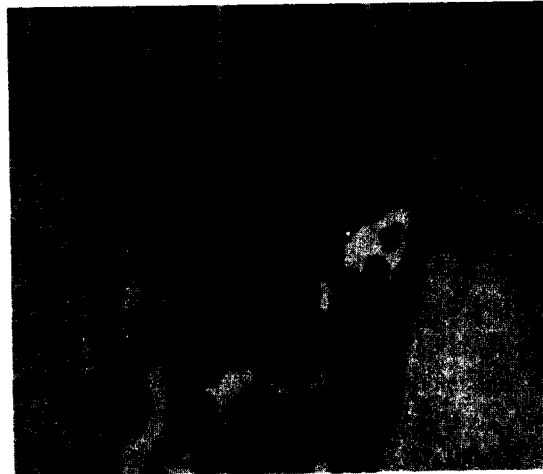


Fig. 2. A calf produced from the demi-embryo

#### IV. 摘 要

本 研究는 微細操作技術을 利用하여 牛受精卵을 Bisection 한 후 얻어진 demi-embryos 를 非外科的인 方法으로 移植하여 一卵性 雙子를 生産하기 위

하여 實施하였으며 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 29 頭의 供卵牛에서 回收된 總 132 個의 卵子中 正常的인 形態의 受精卵은 桑實胚 37 個(28.0%), 胚盤胞 30 個(22.7%)였다.

2. Biscution 에 使用된 67 個의 受精卵으로 부터 111 個(82.8%)의 demi-embryos 가 作成되었고 이들 中 細胞質에 損傷을 입지 않고 作成된 demi-embryos 는 98 個(73.1%)였다.

3. 體外培養후 正常的인 形態를 維持한 demi-embryos 의 比率(生存率)은 透明帶를 가진 demi-embryos(70~76.5%)가 透明帶를 갖지 않은 demi-embryos(53.8~69.2%)보다, 또 胚盤胞에서 由來된 demi-embryos(73.3%)가 桑實胚에서 由來된 demi-embryos(63.6%)보다 높았다.

4. 35 個의 demi-embryos 를 21 頭의 受卵牛에게 移植한 結果, 7 頭(33.3%)에서 妊娠이 成立되었으며 그 中에서 1 頭의 産子가 生産되었으며 나머지 6 頭는 妊娠이 進行中이다.

## V. 引用文獻

1. Baker, R.D. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogeneology* 23(1) : 3-11.
2. Blakewood, E.C. 1985. Freezing bovine embryos without a zona-pellucida. *Theriogeneology* 25(2) : 37-40.
3. Brem, G. 1984. Identical simmental twins through microsurgery of embryo. *Theriogeneology* 21 : 231.
4. Gatica, R. 1984. Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogeneology* 21 : 555.
5. Hoppe, R.W. 1983. Effect of removing the Z.P on development of hamster and bovine embryos in vivo. calves. *Theriogeneology* 19 : 391-340.
6. Lambeth, V.A. 1983. Microsurgery on bovine embryo at the morula stage to produce monozygotic twin calves. *Theriogeneology* 19 : 20-85.
7. McEvoy, T.G. 1987. The survival of bisected cattle embryos without zona-pellucida. *Theriogeneology* 27 : 257.
8. McFarland, C.W. 1985. The use of pronase to successfully remove the z.p from bovine embryos. *Theriogeneology* 23 : 208.
9. Ozil, J.P. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Repr. Fert* 69 : 464-468.
10. Seidel, G.E. 1982. Application of microsurgery to mammalian embryos. *Theriogeneology* 17 : 23-34.
11. Suzuhi, F. 1986. Viability of frozen-thawed of bovine embryos bisected in sucrose. *Theriogeneology* 26 : 333-339.
12. Tsunoda, Y. 1984. Micromanipulation and freezing of goat embryos. *University of Illinois, Urbana* 2 : 241.
13. Tsunoda, Y. 1985. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goat. *Theriogeneology* 24 : 337.
14. Warfield, S.J. 1986. Transfer of bovine demi-embryos with and without z.p. *Theriogeneology* 25(1) : 212.
15. Willadsen, S.M. 1981. The production of monozygotic twin of non-surgical collected cow embryos. *Theriogeneology* 15 : 23-29.
16. Williams, T.J. 1982. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theriogeneology* 17 : 114.
17. Williams, T.J. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogeneology* 22 : 521-531.