

종돈산업에 있어서 생물공학의 응용



Cheng, Winston T.K.
(대만대학교 교수)

1. 서 론

생물공학이란 생물학적 공정을 통해 나타나는 상품과 서비스의 이용이라고 단순하게 정의를 내릴 수 있다. 즉 이 기술은 생화학, 미생물학, 유전학, 면역학, 생리학, 분자생물학, 그리고 생화학적 기술들을 모두 포함한다. 따라서 생물공학이란 여러 과학적 기술의 상호복합체 이므로 이들의 응용은 양돈산업을 포함한 여러 산업에 광범위하게 이용된다. 본고에서는 돼지의 생식세포와 수정란에 대한 조작기술의 적용에 관해 다룰 것이다. 특히 정자의 보존과 인공수정, 발정동기화, 다배란처리와 수정란이식, 돼지 난자의 처리 성숙과 수정, 수정란 분리 및 분리 수정란의 성감별, 유전자 주입과 핵치환에 대해서 설명할 것이며 이 모든 기술은 현재와 미래의 돼지 육종사업에 적용 될 기술들이다.

2. 정액보존과 인공수정

인공수정이 수(♂)가축의 번식능력을 증가 시키는 중요한 기술이라는 것은 잘 알려진 사실이다. 이 기술은 우수한 검정 모축을 사용함으로써 자연교배시 나타나는 것보다 더 많은 가능성을 가지고 있다. 즉 자연교배에 의해서는 한번의 사정으로 발정은 한마리의 암컷을 수정시킬 수 밖에 없으나 인공수정을 실시하면 희석액의 종류와 저장방법에 따라 다소의 차이는 있지만 한번의 사정으로 25~30두의 암컷을 수정시킬 수 있다.

그러나 돼지의 인공수정은 소의 경우와는 달리 돼지정자의 저장기간이 짧다는 큰 단점을 가지고 있다. 초기의 연구에서 돼지정자는 15°C 이하로 온도가 내려가면 특히 생존성이 떨어진다고 밝혀졌다.(Polge, 1956 : 1959) 따라서 돼지정액의 15°C 이상인 액상보존이

용은 많은 나라에서 산업적으로 이용되고 있다.(Melrodse, 1972 Pursel 등, 1973 : Watson, 1979) 그후 많은 희석액이 연구개발 되어 현재 세계적으로 많은 인공 수정센터에서 이용되고 있다. 이러한 희석액의 대부분은 에너지원으로서 glucose, buffer제로서 citrate, bicarbonate 또는 우유를 기초로 하고 있다.

3. 다배란, 발정동기화, 수정란이식

수정란이식이란 유전적으로 우수한 암컷으로부터 많은 자손을 생산하게 하는 다른 중요한 기술이다. 대만에서의 이러한 돼지 수정란이식 기술의 시초는 1974년 Lin에 의해 처음 거론 되었다. 그의 선구자적 연구 후에 이 기술은 더 개발되어 수정란의 채란 및 이식에 대한 효과적인 방법이 개발되어 현재 대만의 여러대학 및 연구기관 즉 국립대만대학, 국립 Chung-Hsiang 대학, 대만 당연구소, 대만 돼지연구소, 대만 축산시험장 등에서 일상적으로 수행하고 있다. 이러한 돼지의 수정란이식은 외과적 수술에 의해 이루어지나 이 과정은 단순하고 효율적이다. 발정후 3~7일된 공란돈으로부터 회수된 수정란은 공란돈과 발정이 동시에 동기화 된 것 또는 1~2일 뒤에도 수란돈에 이식한 결과 일반적으로 이식 수정란의 60~70% 이식 두수의 80% 이상이 수태된다.

공란돈과 수란돈의 발정을 동기화 하기 위해서는 18 일 동안 매일 두당 20mg alterenogest를 경구 투여하는데 이러한 방법으로 경구 투여후 5~6일째에 약 80%가 발정이 온다. 공란돈의 다배란 처리로 발정 주기의 적절한 시기에 성선자극 호르몬 투여에 의하여 다배란 처리에 따른 반응은 발정주기 15 또는 16일에 1,750 IU의 PMSG를 투여하고 3.5일후에 750IU의 HCG를 근육 주사하면 일반적으로 평균 25~30개의 성숙된 난자를 배란한다. 이러한 다배란처리, 발정동기화 및 수정란이식의 모든 기술은 현재 대만에서 특정병원군이 없는(SPF) 돼지 핵군조성에 가장 중요한 도구로서

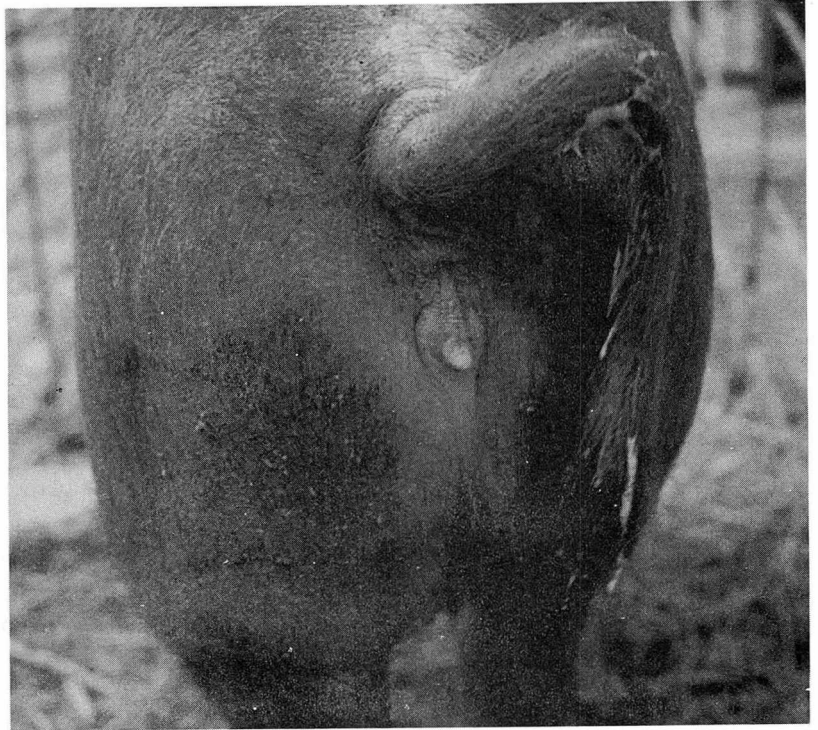
다배란 처리, 발정동기화 및 수정란이식의 모든 기술은 현재 대만에서 특정병원군이 없는 (SPF) 돼지 핵군조성에 가장 중요한 도구로 인식 된다.

인식 되어진다.

4. 난자의 체외성숙 및 수정

최근 배란 직후의 난자는 HCG 처리후 약 42시간된 다배란처리 암돼지의 난관으로부터 회수한다(Polge, 1982). 또한 난자들은 배란전에 회수할 수가 있는데 이 방법은 HCG 처리후 36시간째에 난소를 떼어내어 이를 난소의 성숙 난포로부터 난자를 회수 정자와 수정 시키기전 6시간 동안 배양을 시키는 방법이다. 이러한 방법에 의해 2,000개 이상의 난자를 회수하였다. 수정을 위해서는 세척·전배양정자 또는 저장세척 정자를 m199-FCS에 2mM의 카페인을 첨가하고 pH를 7.4로 조정 한 후 정자농도가 1.6×10^6 또는 $1 \times 10^6/ml$ 로 조정한다. 난구세포가 부분적으로 제거된 난자들도 2ml의 희석정액에 넣으며(배양정자당 15~20개) 5% CO₂ 95% 공기의 조건하에서 배양을 한다. 정자를 배양후 시간을 달리하며 난자를 꺼내어 세척하고 25% acetic alcohol에 고정을 시켜 1% lacmoid로 염색하여 위상차 현미경 하에서 검사를 한다. 아직도 1세포기에 있는 난자에 침투하여 정자꼬리가 있어 보이며, 팽대된 정자두부가 있거나 자정 및 응성 전핵이 있는 경우만 수정된 것으로 판별한다. 또한 난 분할을 하였더라도 할

돼지 육종의 효율은 인공수정, 다배란처리, 발정동기화, 수정란이식, 체외 성숙과 수정, 수정란분리와 분리수정란과 성감별, 핵치환과 체외 수정란에의 유전과 주입 등과 같은 여러 생물공학 기술의 적용에 의해 직접 또는 간접적으로 높아질 것이다.



구에 정상적인 핵의 양상이 보이는 것만 수정된 난자로 판별을 한다.

정자가 투명대가 있는 난자를 성공적으로 통과하기 위한 가장 중요한 요인은 배양농도이다. 정자와 난자의 매정 온도가 37°C 일때는 난자의 약 2% 이하만 수정이 되나 39°C인 경우는 89% (269/302)의 높은 정자 침투율을 보였다. 또한 다정자 침입의 빈도는 배양액의 산도(pH)에 어느 정도 영향을 받는다. 즉 전체적인 정자의 침투율은 pH가 7.4와 7.8인 경우 큰 차이가 나지는 않으나 정자침입률은 pH가 7.4일 경우에는 수정된 난자가 48%였으나 pH가 7.0과 7.8의 경우는 79%를 상회하는(pH 7.0인 경우 113/142, pH 7.8인 경우 157/188) 다정자 침입률을 얻었다. 그러나 본 연구에서 다정자 침입률이 높은 것은 다정자 침입을 관찰하기 위하여 팽윤된 정자의 두부를 관찰하였는데 팽윤 정자 두부는 체외 배정후 3시간 정도로 일찍 관찰하여야 하나 최대 정자 침입률은 6~8시간이 소요된다. 따라서

본 연구에서는 8시간 이상 정자를 난자에 배정시켰기 때문에 다정자 침입률이 높았다.

5. 수정란 분리 및 분리 수정란의 성감별

돼지 수정란분리 실험을 위해서는 성숙된 돼지를 수정 시킨후 원하는 세포기의 수정란을 외과적 수술 방법에 의해 생식기관을 관류하여 얻을 수 있다. 이러한 외과적 회수에 의해 얻는 수정란을 투명대의 변화를 위하여 m-PBS에 0.2% Pronase를 30초간 처리를 한다. 이러한 pronase 처리후 pronase가 없는 m-PBS로 세척을 하고 수정란 분리조작을 위하여 슬라이드 위에 mineral oil로 둘러 싸운 PBS 적에 옮긴다. 수정란의 분리는 미세 유리침을 장치한 미세조작기를 이용 도립 현미경하에서 실시하였다. 이러한 방법에 의하여 상실배 또는 초기배는 유리침을 수정란의 중앙부에 놓고 단순히 눌러 줌으로써 양분 시킬 수가 있다. 그러나 배반포기배를 이용할 경우에도 내세포기와

영양아세포는 이같이 양분 될 수 있게 수정란을 위치시켜 분리를 한다. 모든 분리 수정란을 구조가 정상인지를 실제 현미경 하에서 확인을 하며 핵의 정상 발육을 판별하기 위하여 고정 염색을 한다.

6. 돼지 초기배의 핵치환과 유전자 주입

핵을 공급하기 위한 4~8 세포기의 수정란을 핵치환에 사용하기 위하여 인공수정후 다배란 처리 돼지의 생식기로부터 관류 채란하였다. 그리고 핵을 치환 받은 난자는 보고에서 실시한 바와같이 초기의 성숙난을 사용하였다. 각 핵 공급은 수정란을 15,000g에서 3.5 또는 7분간 원심분리하여 큰 지방과립을 수정란의 한 쪽으로 모아서 할구 내의 핵을 용이하게 관찰할 수 있게 하였다. 고속원심을 15,000g에서 3.5 또는 7분간 한 후 체외에서 40시간 배양한 결과 생존율은 각각 88.5, 85.1과 83%로서 유의적인 차이가 없었다. 그러나 할구 내에 핵의 관찰이 가능한 비율은 고속원심분리 시간에 영향을 받았다. 즉 15,000g에서 원심분리를 7분간한 경우에는 할구내 핵 관찰이 가능한 비율이 4~8 세포기배에서 91.5%(43/47)로 대다수의 수정란의 할구내 핵이 관찰되었으나 5분간만 한 경우에는 그 비율이 48.1%(13/27)로서 급격히 감소 하였으며 3분간한 경우에는 미세조작을 하기에 충분한 정도로 핵이 보이지는 않았다.

유전자 주입을 위해서는 2가지 방법에 의하여 돼지에게 수정란을 얻을 수 있다. 첫째로는 다배란 처리된 HCG 처리후 약 56~60 시간에 난관으로부터 체내 수정란을 얻는 방법이며, 두번째는 앞서 언급한 체외성숙 수정란을 이용하는 것이다. 그리고 사용되는 외래 유전자로는 2가지가 있는데 그중 하나는 돼지 성장호르몬(pGH) 유전자이고 또 하나는 flank intron에 mettallothionen promotor가 있는 모든 자연성숙 mRNA를 포함하는 human clotting factor(hF I) complementary DNA clone이다. pGH 유전자 주입후 197개의 돼

지 수정란을 체외에서 24시간 배양한 결과 110개(55.8%)의 수정란이 2세포기까지 발달하였으나 이들 2세포기 수정란은 8두의 수란돈에 이식한 결과 3두(1.5%)의 자돈만 분만되었다. 그러나 그후의 hF 12 유전자를 전핵에 주입한 274개의 수정란을 9두의 수란돈에 이식한 실험에서도 5두(55.5%)가 임신 되었으며 33두의 자돈이 생산되어 15.7%의 수정란 생존율을 얻었다. 이러한 방법으로 태어난 자돈이 외래 유전자가 결합되어 이들 유전자의 현실이 발현되는지를 각 자돈의 조직분석에 의한 판별 시험은 현재 추진중이다.

7. 결 론

돼지육종의 효율은 인공수정, 다배란처리, 발정동기화, 수정란이식, 체외성숙과 수정, 수정란분리와 분리 수정란과 성감별, 핵치환과 체외수정란에의 유전자 주입 등과 같은 여러 생물공학기술의 적용에 의해 직접 또는 간접적으로 높아질 것이다. 이들 기술중 인공수정 다배란처리, 발정동기화 그리고 수정란이식과 같은 기술도 현재 활용이 되어 수년간 이용 되고 있다. 또한 진실한 이익은 위에서 설명한 생명공학기술 등의 이용으로 종축의 번식효율을 최대로 증가시킴으로서 얻을 수 있다. 또한 수정란분리와 융합에 의한 키메라 생산과 같은 기술들은 난자에 외래기관세포의 도입에 의해 성취할 수 있다. 게다가 성감별의 만족할 만한 기술 없이도 이식된 분리수정란의 성을 앞으로서 다른 분리수정란의 성을 알 수도 있다. 앞으로도 돼지 수정란의 동결에 관한 연구도 급속히 요구 되는 바 이 기술의 개발로 유전물질의 국제간 교역도 가능할 것이다. 또한 유전자 주입과 핵치환에 필요한 전핵기 수정란도 난자의 체외성숙과 수정에 의해 수정란의 확보가 쉬워져서 더 많은 연구가 수행 될 것이다. 그러나 이들 모든 기술들은 아직까지는 초기단계이나 이들 새로이 개발되는 기술의 발달로 미래에는 양돈산업에 있어서 육종에도 획기적인 발전에 기여할 것이다. ●