

## 수정란 분할에 의한 한우 쌍태의 임신

손동수 · 김일화 · 이동원 · 최창열 · 윤상보 · 류일선 · 서국현  
이광원 · 유충현 · 조윤연 · 정상원 · 최상용\*  
국립종축원

## Pregnancy of Monozygotic Twins by Bisection of Korean Native Cattle Embryos

D. S. Son, I. H. Kim, D. W. Lee, C. Y. Choi, S. B. Yoon, I. S. Ryu,  
G. H. Seo, K. W. Lee, C. H. Yoo, Y. Y. Cho, S. W. Jung and S. Y. Choe\*  
*National Animal Breeding Institute*

### SUMMARY

This study was carried out to produce monozygotic twin calves by transfer of bisected embryos. Four Korean native cattle donors were superovulated with FSH and flushed to collect embryos on day 6 or 7 of the estrus cycle. Morula and early blastocyst embryos showed 1 or 2 grade were bisected with microblade and each set of demi-embryos without zona pellucida were transferred nonsurgically to 10 recipients respectively.

The results obtained were as follows:

1. Twenty four demi-embryos (92.3%) were separated from 13 original embryos and among them 20 demi-embryos (83.3%) had normal appearance without severe damage.
2. Four sets of fresh demi-embryos were transferred to 4 recipients and one recipient was twin pregnant
3. Six sets of frozen-thawed demi-embryos were transferred to 6 recipients. Two recipients were pregnant, one of them twin.

**Key words** : monozygotic twin, bisected embryos, Korean native cattle

### 서 론

수정란이식으로 능력이 우수한 송아지를 많이 생산하기 위하여는 유전적으로 우수한 능력을 보유하고 있는 소에서 많은 수정란을 채취하여 이식을 하여야 하나 현실적으로 고능력 소에서 일시에 다수의 수정란을 확보한다는 것은 쉬운 일이 아니다. 따라서 수정란 1개를 2분할하여 2개를 이식한다면 수

정란 효과는 배가할 수 있을 것이다.

소 분할 수정란이식은 이미 일부 국가에서 산업적으로 이용되고 있으며(Baker, 1985; Arave 등, 1987; Gray 등, 1991; Kippax 등, 1991), 분할 수정란의 임신율은 glass needle를 사용하여 수정란을 분할한 후 이식한 경우에는 Lambeth 등(1983)은 42.8%, Bredbacka 등(1992)은 33.3~46.2%이고, surgery blade를 사용하여 수정란을 분할한 후 이식한 경우 Willams 등(1984)은 16~60%, Williams

\* 경상대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

와 Moore(1988)은 45%, McEvoy와 Sreenan(1990)은 48%로 glass needle보다는 surgery blade를 이용하여 수정란을 분할한 경우가 임신율이 높은 것으로 보고되고 있다.

한편, 분할 수정란을 이식하여 쌍태 임신율은 Williams와 Moore(1988)가 38%, McEvoy와 Sreenan(1990)은 30%, Kippax 등(1991)은 34 ~ 58%를 보고한 바 있다.

국내에서 수정란 분할이식에 관한 연구는 마우스(황, 1985), 생쥐(김 등, 1986; 강, 1989; Park 등, 1991a), 토끼(임 등, 1992), 산양(Park 등, 1991b) 및 소(정 등, 1989; 정 등, 1992)의 수정란을 분할 이식하여 임신 및 산자를 생산하였으나 아직까지 소에서 분할 수정란이식에 의한 쌍태송아지 생산에 대한 보고는 없다.

쌍태송아지의 생산을 위하여 수정후 6~8일이 경과된 소에 수정란을 이식하는 방법은 있으나 이란성 이성 쌍태송아지의 생산에 의한 프리마틴의 발생과 친자감별이 곤란하므로 개량의 수단으로는 효과가 없다.

따라서 본 연구는 surgery blade를 이용한 소 수정란의 분할 이식으로 유전적으로 동일한 능력을 보유하고 있는 일란성 쌍태송아지를 생산하여 수정란이식에 의한 가축의 증식 및 개량 효과 증대에 활용코자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시축

공란우는 국립종축원에서 사육하고 있는 한우 경산우 4두이며, 수정정액은 축협중앙회 한우개량사업소로부터 보종종모우 4두의 정액을 구입하여 사용하였다. 수란우는 젓소 미경산우 및 경산우 9두와 육우 헤어포드 미경산우 1두를 공시하였다.

### 2. 과배란 처리

공란 한우의 자연 발정주기 10~11일부터 FSH-P(Schering-Plough Animal Health, USA) 32mg을 5일간 12시간 간격으로 감량분할 주사하고 4일 후에 dinoprost(Lutalyse, Upjohn, USA) 40mg을

2회 분할 근육주사하였으며, 공란우 발정발현 12시간후 정액 2스트로로 인공수정 및 LH-RH(콘세탈, 동방) 200 $\mu$ g을 근육주사하였다. 1차 수정 12시간후 정액 2스트로로 재수정하였다.

### 3. 수정란 회수

과배란처리된 공란우의 발정발현 6~7일에 2% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Gibco, USA) 채란액을 사용하여 경관경유법으로 수정란을 회수하였다. 회수한 수정란은 선별하여 20% FBS가 첨가된 D-PBS로 옮겼다.

### 4. 수정란 동결 및 융해

수정란 회수 당일 발정이 동기화된 수란우가 준비되면 신선 수정란을 분할하여 이식하고 수란우가 준비되지 않으면 수정란을 20% FBS와 0.4M, 0.8M, 1.4M의 글리세롤이 함유된 D-PBS 보존액에 각각 10분씩 평형한 후 실온에서 -6 $^{\circ}$ C까지 1 $^{\circ}$ C/분의 속도로 냉각하고 -6 $^{\circ}$ C에서 식빙후 10분간 정제하였다가 -35 $^{\circ}$ C까지 0.3 $^{\circ}$ C/분의 속도로 동결, 액체질소에 침지후 보존하였다. 동결 수정란의 융해는 30~32 $^{\circ}$ C의 온수에서 10~15초간 급속 융해후 동결시 역순으로 평형시킴으로서 글리세롤을 제거하였다.

### 5. 수정란 분할

수정란 분할에 사용된 수정란은 1~2등급의 상질기 및 초기배반포기의 수정란이었으며, Liquid paraffin(Junsei Chemical Co., Japan)이 덮어진 50 $\mu$ l의 10% FBS + Ham's F-10에 수정란을 옮겨 micromanipulator (Narishige, Japan)가 부착된 inverted microscope(Olympus, Japan)의 100배에서 분할 준비를 하였다. micromanipulator에 bio-cut blade(Feather Safety Razor Co., Japan)를 부착하여 수정란의 정중앙 위에서 직선 아래 방향으로 하강시켜 분할하였다. 한편 동결수정란은 분할전에 paraffin이 덮어진 50 $\mu$ l의 10% FBS + Ham's F-10(Sigma, USA)에 옮겨 5% CO<sub>2</sub>, 포화 습도, 37.5 $^{\circ}$ C에서 3시간 배양한 후 분할하였다.

## 6. 분할수정란 이식

자연 발정발현 7일째의 수란우에 2% lidocaine 6ml로 경막외마취를 하고 분할 수정란 2개를 0.25ml 스트로에 장진하여 비외과적 이식기로 황체가 확인된 쪽의 자궁각 선단부에 이식하였다.

## 7. 임신진단

수정란 이식후 30~60일경에 초음파진단기(Scanner 450, Pie Medical, Holland)를 이용하여 쌍태 임신여부를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

한우 수정란을 분할하여 형태를 조사한 성적은 Table 1과 같다. 수정란 13개를 2분할한 결과 92.3%가 분할되었으며 그 중 83.3%의 수정란이 특별한 손상없이 정상적으로 분할되었다.

Lambeth 등(1983)은 상실기 및 배반포기의 수정란을 holding pipette과 glass needle을 이용하여 분할한 결과 90%가 분할되었다고 보고 했다.

정 등(1989)은 상실기 및 배반포기의 수정란을 holding pipette과 microblade를 이용하여 분할한 결과 82.8%가 분할되었으며 특별한 손상없이 형태학적으로 정상인 것은 88.3%였다고 하였으며 정 등(1992)은 체외수정란을 holding pipette과 microblade를 이용하여 분할한 결과 상실기 수정란은 88.5%, 배반포기 수정란은 91.9%가 정상적인 형태를 유지하고 있었다고 했다.

투명대가 존재하지 않는 분할된 수정란 2개씩을 수란우에 각각 이식한 결과는 Table 2와 같다.

신선 수정란을 분할하여 이식한 수란우 4두중 1두가 임신되었으며 초음파 진단에서 상태임신이 확인되었고 동결 수정란을 용해후 분할하여 이식한 수란우 6두중 2두가 임신되었는데 그 중 1두가 초음파 진단에서 쌍태 임신임이 확인되었다.

Table 1. Morphological characteristics of demi-embryos obtained by bisection with morula and early blastocyst stage embryos in Korean native cattle

No. of embryos bisected	No. of demi-embryos (%)	Morphological characteristics(%)	
		Damaged	Undamaged
13	24(92.3)	4(16.7)	20(83.3)

Table 2. Transfer of two bovine demi-embryos to recipients

Recipient	Breed of recipient	Parity of recipient	Embryo	Pregnant
1	Holstein	2	Fresh	Non pregnant
2	Holstein	1	Fresh	Pregnant (Twin)
3	Holstein	3	Fresh	Non pregnant
4	Holstein	heifer	Fresh	Non pregnant
5	Holstein	heifer	Frozen	Pregnant (Twin)
6	Holstein	heifer	Frozen	Non pregnant
7	Holstein	heifer	Frozen	Non pregnant
8	Holstein	heifer	Frozen	Pregnant (Single)
9	Holstein	heifer	Frozen	Non pregnant
10	Hereford	heifer	Frozen	Non pregnant

Bredbacka 등(1992)은 분할 수정란을 경산우와 미경산우에 이식하였을 때의 임신율은 각각 33.3%와 46.2%였다고 했다.

Seike 등(1989)은 발정 6~8일째의 수란우에 투명대가 존재하고 있지 않는 분할 수정란 2개를 이식한 결과 임신율은 61.5%, 분할 수정란 1개를 이식하였을 때의 임신율은 72.6%였으며, 분할하지 않은 수정란을 이식하였을 때의 임신율은 72.9%로 분할 수정란과 분할하지 않은 수정란의 임신율에 대한 차이는 없었다고 했다.

Kippax 등(1991)은 분할 수정란 2개를 투명대가 모두 존재하는 것, 1개 수정란만 존재하는 것, 모두가 존재하지 않는 것을 이식하였을 때의 쌍태 임신율은 각각 18%, 47% 및 30%였다고 했다.

Blakewood 등(1986)은 투명대를 제거하였거나 제거하지 않은 상실기에서 확장배반포기까지의 수정란을 동결하여 융해후 체외 배양한 결과 투명대를 제거한 수정란이나 제거하지 않은 수정란의 형태학적 발육단계나 질에 있어서 차이가 없었다고 하였으며, Warfield 등(1987)도 투명대가 존재하는 분할 수정란과 투명대가 존재하지 않는 분할 수정란의 임신율은 각각 33%와 32%로 차이가 없었다고 했다.

Rorie 등(1986)은 분할하여 동결한 수정란보다 동결후 융해하여 분할한 수정란에서 이식 가능한 수정란이 많았다고 했다. 그러나 Takeda 등(1987)은 분할 수정란의 생존율은 분할하여 동결한 수정란보다 동결후 융해하여 분할한 수정란이 낮다고 하였으며 이들은 또한 신선 분할 수정란의 생존율보다도 낮다고 하였으며, Niemann 등(1986)은 분할 수정란과 분할하지 않은 수정란을 동결하여 융해한 결과 형태학적으로 양호한 수정란은 각각 74.1% 및 71.4%라고 하였고 분할 수정란의 동결시에는 손상된 투명대를 Sealing하는 것이 수정란 발육에 좋으며 수정란을 분할하여 동결하는 것이 동결된 수정란을 융해하여 분할하는 것보다 더 효과적이라고 하였다.

정 등(1989)은 투명대가 존재하는 소 분할 수정란을 이식하여 33.3%의 임신율을 나타내었고 분할 수정란 1개를 이식한 수란우 1두에서 송아지가 생산되었다고 하였다.

본 연구에서 분할된 소 수정란의 이식으로 쌍태 임신율이 20.0%이고 동결 수정란을 융해하여 분할 이식으로 33.3%의 임신율을 나타내는 결과로 미루어 볼 때 수정란의 분할, 동결 및 융해 기술이 축적되면 소의 증식과 개량 효과를 증대할 수 있을 것으

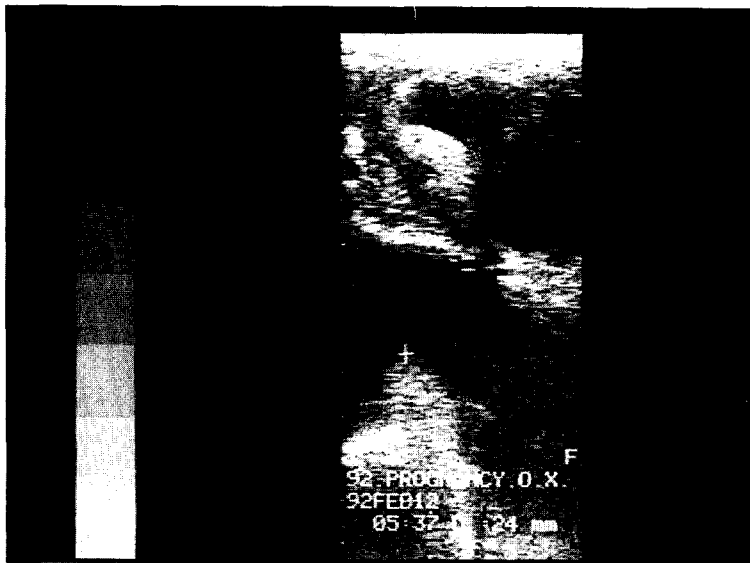


Fig.1. Ultrasonogram of a 57-day bovine twin fetuses by transfer of frozen-thawed bisected embryo

로 사료된다.

## 결 론

소 수정란의 분할 이식으로 유전적으로 동일한 능력을 보유하고 있는 일란성 쌍태송아지를 생산하기 위해 한우 공란우 4두를 FSH로 과배란처리하여 발정 6~7일에 회수한 1~2등급의 상실기 및 초기 배란포기 수정란을 microblade로 분할한 후 투명대가 존재하지 않는 분할 수정란 1쌍을 발정 7일째의 수란우 10두에 각각 비외과적으로 이식한 결과는 다음과 같다.

1. 수정란 13개를 분할하여 24개(92.3%)가 분할되어 졌으며 그 중 20개(83.3%)의 수정란이 특별한 손상없이 정상적으로 분할되었다.
2. 신선 수정란을 분할하여 이식한 수란우 4두중 1두가 쌍태 임신이 되었으며, 동결 수정란을 용해후 분할하여 이식한 수란우는 6두중 2두가 임신되었으며 1두는 쌍태 임신이었다.

## 참고문헌

- Arave CW, Bunch TD, Mickelsen CH and Warnick K. 1987. Factors affecting survivability of transferred whole and demi-embryos in a commercial dairy herd. *Theriogenology* 28:373-382.
- Baker RD. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 23:3-12.
- Blakewood EG, Rorie RW, Pool SH and Godke RA. 1986. Freezing bovine embryos without a zona pellucida. *Theriogenology* 22:141 (Abst.).
- Bredbacka P, Huhtinen M, Aalto J and Rainio V. 1992. Viability of bovine demi- and Quarter-embryos after transfer. *Theriogenology* 38:107-113.
- Gray KR, Bondioli KR and Betts CL. 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* 35:37-44.
- Kippax IS, Christie WB and Rowan TG. 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology* 35:25-35.
- Lambeth VA, Looney CR, Voelkel SA, Jackson DA, Hill KG and Godke RA. 1983. Microsurgery on bovine embryos at the morula stage to produce monozygotic twin calves. *Theriogenology* 20:85-95.
- McEvoy TG and Sreenan JM. 1990. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demi-embryos. *Theriogenology* 33:1245-1253.
- Niemann H, Brem G, Sacher B, Smidt D and Krusslich H. 1986. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. *Theriogenology* 25:519-524.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ, Lee JS and Park HS. 1991a. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goats. IV. Production of monozygotic twins by bisection of mouse and goat embryos. *Korean J. Anim. Sci.* 33:294-301.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ, Lee JS and Park HS. 1991b. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goats. V. Improvement of viability and conception rate following bisection and transfer of mouse and goat embryos. *Korean J. Anim. Sci.* 33:342-347.
- Rorie RW, Pendleton RJ, Youngs CR and Godke RA. 1986. Viability of demi-embryos produced before vs. after deep freezing. *Theriogenology* 25:192(Abst.).
- Seike N, Saeki K, Utaka K, Sakai M, Takakura R, Nagao Y and Kanagawa H. 1989. Pro-

- duction of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without pellucidae. *Theriogenology* 32:211-220.
- Takeda T, Henderson WB and Hasler JF. 1987. Deep freezing of split and intact bovine embryos. *Theriogenology* 27:285(Abst.).
- Warfield SJ, Seidel Jr. GE, and Elsden RP. 1987. Transfer of bovine demi-embryos with and the without zonae pellucida. *J. Anim. Sci.* 65:756-761.
- Williams TJ, Elsden RP and Seidel Jr. GE. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 22:521-531.
- Williams TJ and Moore L. 1988. Quick-splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 29:477-484.
- 강대진, 박희성, 이효종. 1989. 생쥐배의 발생단계별 미세분할, 배양 및 이식에 관한 연구. *경상대학교 축산진흥연구소보* 16:7-12.
- 金南衡, 鄭吉生, 盧煥喆, 白雲和, 李景廣. 1986. 생쥐 受精卵의 兩分에 의한 一卵性 雙胎의 生産. *韓畜誌* 28:527-534.
- 임경순, 최화식, 정구민, 양보석. 1992. 토끼 할구 융합배의 H-Y항체에 의한 성감별에 관한 연구. I. 초기배 절단에 의한 자태 생산. *한축지* 34:146-151.
- 정길생, 김정익, 김종재, 정병현, 이훈택, 정형민. 1992. 우수 포유동물 수정란의 이용 효율 제고에 관한 연구. III. 미세조작에 의한 수정란의 이용효율 증진에 관한 연구. *건국대학교 동물자원연구소지* 17:3-9.
- 鄭柄現, 池喜俊, 李相鎭, 李東熙, 丁泰榮, 鄭吉生. 1989. 牛 受精卵의 Bisection과 移植에 관한 研究. *韓國家畜繁殖學會誌* 13:164-170.
- 黃禹錫. 1985. 切斷마우스 二分胚의 凍結保存實驗. 1. 마우스 切斷二分胚의 體外 發育能에 대하여. *韓國臨床獸醫學會誌* 2:43-53.