

## 韓牛 受精卵의 凍結保存 및 雙仔生産에 관한 研究

### II. 二分 受精卵의 移植과 雙仔 生産

손동수 · 김일화 · 이동원 · 서국현 · 이호준 · 이광원 · 안병석 · 신형두\* · 박노웅\*\* · 최상용\*\*\*  
농촌진흥청 축산기술연구소

## Studies on Embryo Cryopreservation and Twinning by Embryo Transfer of Korean Native Cattle II. Transfer of Bisected Embryos and Production of Twin Calves

D. S. Son, I. H. Kim, D. W. Lee, K. H. Suh, H. J. Lee, K. W. Lee, B. S. Ahn,  
H. D. Shin\*, N. U. Park\*\* and S. Y. Choe\*\*\*

*National Livestock Research Institute, Rural Development Administration*

### SUMMARY

This study was carried out to enhance the efficiency of Korean Native cattle embryos and establish the techniques for producing the twin calves. Bisected embryos without zona pellucida which were divided by simple method not using holding pipette or whole two embryos were transferred to recipients.

The pedigrees of monozygotic twin calves produced by transfer of bisected pair embryos were identified. The results obtained were as follows:

The average successful bisection rate was 89.16%. The embryos of blastocyst stage (91.66%) were bisected successfully at significantly ( $P < 0.05$ ) higher rate, compared with the morula stage embryos (86.66%). The average survival rate of bisected embryos following 24 hours culture was 59.02%. The survival rate of morula stage embryos (62.50%) was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than that of blastocyst stage embryos (55.5%).

For the production of monozygotic twin calves, ten pairs of fresh or frozen demi-embryos of Korean Native cattle were transferred to 10 Holstein recipients, of which 3 recipients were pregnant, and 2 monozygotic twins were calved in 2 recipient cows.

For the production of twin calves, two intact-fresh or intact-frozen embryos of Korean Native cattle were transferred to 23 Korean Native cows, of which 12 recipients were pregnant (52.2%), and the twin pregnancy was diagnosed in 7 cow (58.3%) of the pregnant recipients.

The average gestation length of 7 twin pregnant recipients was 278.62 days and the average birth weight of twin calves was 16.89kg.

From gene polymorphism analysis as blood type, loci of blood proteins and bovine

\* 축협중앙회 한우개발부(Korean Cattle Improvement Center, NLCF)

\*\* 경상북도 축산기술연구소(Livestock Research Institute, Kyungsangbuk-do)

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

lymphocytes antigen, the twin calves produced by transfer of bisected pair embryos of Korean Native cattle were identified in pedigrees and confirmed as monozygotes.

(Key word : Korean Native cattle, bisected embryos, transfer, monozygotic twin calves, gene polymorphism analysis)

## 서 론

수정란이식에 의한 쌍자 생산 방법에는 수정 후 6~8일에 수정란을 추가 이식하는 방법(오 등, 1993; Sreenan와 Diskin, 1989; Sreenan 등, 1981; Boland와 Gordon, 1978; Boland 등, 1976)과 수정란 2개를 동시에 이식하는 방법(Suzuki 등, 1989; Kim 등, 1988; Anderson 등, 1978; Rowson 등, 1971) 등이 있으며 송아지의 생산비 절감하는 방법으로 이용되고 있다. 그러나 이성 쌍태 송아지일 때 프리마틴의 발생이 우려됨에 따라 수정란 1개를 분할하여 2개를 이식하게 되면 프리마틴을 방지할 수 있을 뿐만 아니라, 우수한 공란우로부터 회수된 이식 가능한 수정란 수를 2배로 늘릴 수 있고 유전적으로 동일한 쌍자이기 때문에 후대검정 등의 유전형질 측정에 보다 효과적으로 활용할 수가 있다(Hasler, 1992; Tan 등, 1988; Leibo와 Rall, 1987; Williams 등, 1982).

수정란의 분할방법은 holding pipette의 음압으로 수정란을 고정하고 glass needle(Bredbacka 등, 1992; Seike 등, 1989b; Lambeth 등, 1983) 또는 surgical blade(McEvoy와 Sreenan, 1990; 정 등, 1989; Baker, 1985; Ozil, 1983; Ozil 등, 1982; Williams 등, 1982) 등을 이용하여 수정란을 분할하며, 분할 성공률은 80% 이상이라고 보고되고 있다(정 등, 1989; Williams 등, 1982; Ozil 등, 1982). 이분 수정란의 생존률 및 수태율은 투명대 유무에 영향을 미친다는 보고(Suzuki와 Shimohira, 1986; Massey 등, 1982; Williams 등, 1982)와 미치지 않는다는 보고(Warfield 등, 1987; Blakewood 등, 1986; Warfield 등, 1986; Takakura 등, 1985)가 있다.

수정란의 분할에 관한 국내의 연구는 실험실내에서 주로 수행되어 왔으며(김 등, 1995a; 김 등, 1995b; 정 등, 1992; Park 등, 1991a; Park 등, 1991b; 강 등, 1989; 김 등, 1986, 황 등, 1985), 정

등(1989)은 젖소 수정란을 분할하여 다른 대용 투명대에 넣어 이식하여 1두의 송아지를 생산하였다고 하였으나 투명대가 존재하지 않은 이분 수정란의 이식으로 일란성 쌍태 송아지를 생산하였다는 보고는 없었다.

따라서 능력이 우수한 한우의 수정란을 이용한 한우의 조기증식을 위해 holding pipette을 사용하지 않고 간단하게 수정란을 분할하여 투명대없이 이식함으로써 수정란의 효율성을 증대시키고, 수정란 2개 이식에 의한 쌍태 송아지를 생산하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 수정란

본 실험에 공시된 수정란은 “I. 동결 수정란의 이식과 산자 생산”에서 회수한 수정란을 이용하였다.

#### 1) 수란우

이분 수정란이식에 사용된 수란우는 축산기술연구소 종축개량부에서 사육 중인 젖소 10두를 공시하였으며, 한우 수정란이식에 의한 쌍자 생산에 사용된 수란우는 경상북도 종축장 등에서 사육 중인 한우 23두를 공시하였다.

#### 2. 수정란의 동결 및 융해

수정란 분할을 위하여 채취한 수정란의 동결은 수정란동결기(CG-5000<sup>®</sup>, Cryogenetic Technology Inc., USA)를 이용하여 실온에서 -6℃까지 1℃/분의 속도로 냉각하고 -6℃에서 식빙 후 10분간 정치하였다가 -35℃까지 0.3℃/분의 속도로 동결, 액체질소에 침지하여 보존하였다.

한우 쌍자 생산을 위하여 채취한 수정란의 동결은 model이 다른 수정란동결기(CL863<sup>®</sup>, Cryogenic, Australia)를 이용하여 18℃에서 -7℃까지 1℃/분의 속도로 냉각하고 -7℃에서 식빙 후 10분간 정치하였다가 -35℃까지 0.3℃/분의 속도로 동

결, 액체질소에 침지 후 보존하였다.

수정란의 용해는 수정란이 들어 있는 straw를 액체질소통에서 꺼내어 30~32℃의 온수에서 약 10~15초간 급속 용해한 후 수정란을 tissue culture dish로 옮겨 동결시의 역순으로 glycerol을 희석하였다. 희석이 끝난 수정란은 최종적으로 glycerol이 함유되지 않은 FBS가 20%와 100,000unit의 penicillin G sodium, 100mg+streptomycin sulfate +250µg의 amphotericine B(Anitibiotic-Anitimycotic®, Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A.)가 첨가된 Dulbecco's Phosphate Buffer-

ed Saline(D-PBS, Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A.) 보존액에서 약 10분간 보존 후 수정란 분할 및 이식에 이용하였다.

### 3. 수정란의 분할

#### 1) 수정란의 분할

분할에 사용된 수정란은 우수 및 우량한 형태를 나타내는 상실기 및 배반포기의 수정란이었으며, 수정란을 멸균 mineral oil 아래 fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL Life Technologies, Inc.,

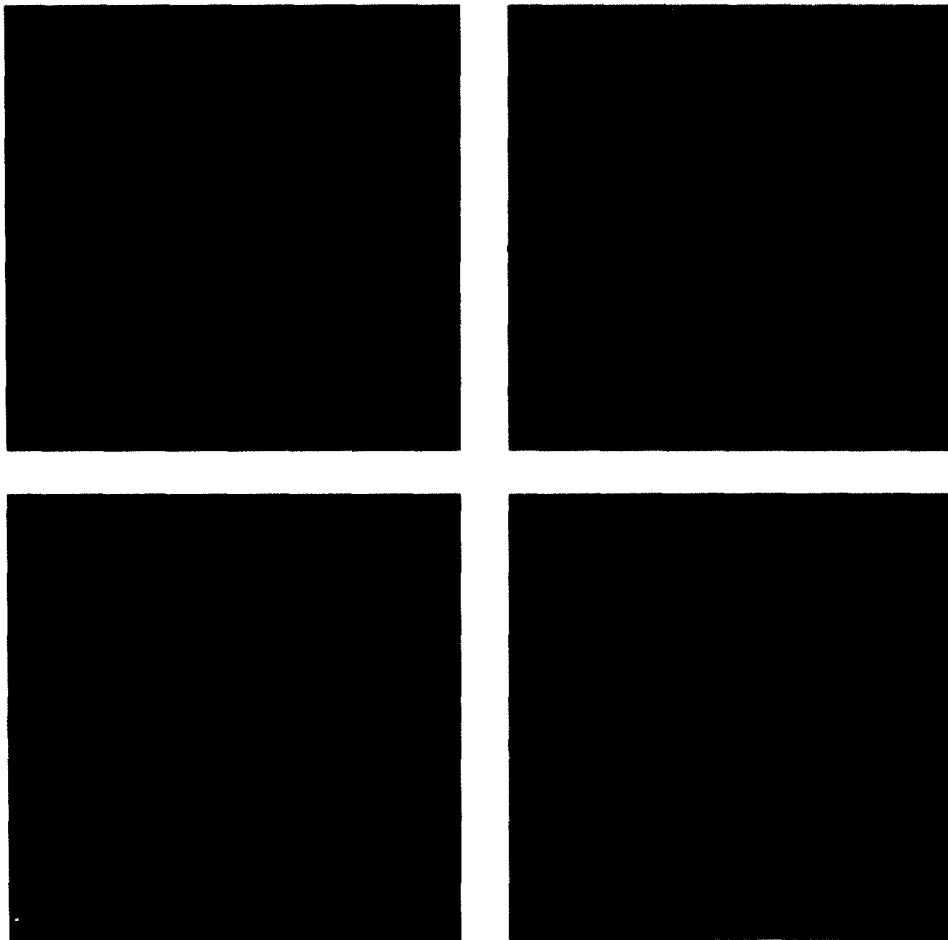


Fig. 1. Bisection procedure of bovine embryos by micromanipulation ( $\times 200$ ).

A: An intact morula recovered from a Korean Native cattle.

B: Bisecting the embryo with a micro-blade.

C: Just after the bisection of the embryo.

D: A pair of identical demi-embryos.

U.S.A.)이 10% 첨가된 50 $\mu$ l의 Ham's F-10 배양액 (Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A.) 미 소적에 옮겼다.

수정란 분할은 micromanipulator (Narishige, Japan)가 부착된 inverted microscope (Olympus, Japan) 위에서 200배율로 관찰하면서 micro-blade (Bio-cut Blade<sup>®</sup>, Feather Safety Razor Co., Japan)를 이용하여 실시하였다. 수정란이 들어 있는 petri dish를 고정하고 수정란의 이동방지를 위하여 micro-blade로 petri dish 바닥에 선을 긋고, 수정란을 선 위로 이동시켜 분할면과 선이 일직선이 되게 한 후 micro-blade를 수정란의 정중앙 위에서 수직 방향으로 하강하여 분할하였다. 한편 동결수정란은 분할전에 멸균 mineral oil 아래 FBS가 10% 첨가된 50 $\mu$ l의 Ham's F-10배양액에 옮겨 CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간 배양한 후 분할하였다.

#### 4. 수정란의 이식

수란우는 luprostitol (Prosolvin<sup>®</sup>, Intervet, Holland) 15mg을 1회 근육주사 또는 11일 간격으로 2회 근육주사하여 발정을 유기시키므로서 동기화하였으며, 자연발정우가 동기화되는 기간에 발정이 온 개체는 수정란이식에 이용하였다.

발정이 동기화된 수란우는 수정란이식 전에 직장 검사를 통하여 뚜렷한 황체가 있는 개체를 선발하였으며, 직장 및 자궁을 이완시켜 수정란이식이 보다 용이하게 하기 위하여 lidocaine hydrochloride (2% Lidocaine Inj<sup>®</sup>, Jeil Pharm. Co., Korea) 50mg으로 경막외마취를 하였다.

용해 또는 분할한 수정란 2개를 1개의 0.25ml straw (IMV, France)에 주입하여 수정란이식기 (IMV, France)에 장진하고, sheath (IMV, France)와 oversleeve (IMV, France)을 장착하여 질내로 삽입하였다. 이식기 끝이 자궁경관 입구에 도달하면 oversleeve을 당겨서 파열시킨 후 이식기의 선단부가 질점막에 접촉되지 않은 상태로 자궁경관에 진입하여 통과하고, 황체 존재측의 자궁각 선단부에 이식기 끝이 도달하게하여 수정란을 주입하였다.

#### 5. 수정란 이식우의 임신진단

수정란 이식 후 50~60일경에 직장검사로 태막과 자궁의 크기 등을 측정하여 임신 여부를 확인하였고, 쌍태임신은 초음파진단기 (Scanner 450<sup>®</sup>, Pie Medical, Holland)를 이용하여 진단하였다.

#### 6. 쌍자의 적혈구형, 혈액단백다형 및 백혈구형 검사

이분 수정란이식으로 태어난 쌍태송아지의 친자 관계 및 일란성 쌍태를 확인하기 위하여 heparin첨가 진공채혈관에 쌍태송아지 2두와 공란우의 경정맥으로부터 각각 20ml의 혈액을 채취하여 축협중앙회 개량사업본부 한우개량부 혈액형 실험실에서 검사하였다. 공정우 (수정 종모우)에 대한 성적은 위 혈액형 실험실에서 검사하여 보존되어 있는 자료를 활용하였다.

혈액형검사는 항혈청을 이용한 적혈구형으로 신 등 (1990)의 방법에 준하여 실시하였으며, 그 방법은 표준 항혈청 20 $\mu$ l에 검사 대상우에서 채취한 혈액으로 조제한 2% 적혈구부유액 10 $\mu$ l를 혼합하여 30분간 방치한 후 특이반응의 유무를 관찰하였다. 특이반응이 없는 경우에는 보체로 토끼의 혈청 10 $\mu$ l를 주입하여 반응을 관찰하였으며, 반응은 보체 주입 후 30분, 1시간 30분 및 3시간 후에 각각의 반응을 관찰하여 판독하였다.

혈액단백다형은 Kraay (1982)의 방법을 이용하여 신 등 (1993)과 같이 hemoglobin (Hb), amylase I (Am I), ceruloplasmin (Cp)의 유전자는 starch gel 전기영동법으로 분석하였고, transferrin (Tf), post-transferrin-2 (pTf-2), albumin (Alb), post-albumin (pAlb)의 유전자좌위는 polyacrylamide gel 전기영동법으로 분석하였다.

백혈구 항원을 이용한 DNA typing은 Eijk 등 (1992)의 방법에 준하여 BoLA-DR $\beta$ 3 영역을 분석하였다. Primer의 염기서열에 의하여 정제된 DNA를 Rsa I, Hae III, BstY I의 제한효소로 절단한 후, Southern hybridization (Southern, 1975)을 실시하여 판정하였다.

#### 7. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 General Linear Models Procedure (SAS, 1988)를 이용하여 least

square means을 구하고 요인간의 유의차를 검정하였다. 최소자승평균을 구하기 위하여 설정한 선형 모형은 다음과 같다.

1) 이분 수정란의 분할 성공률

$$y_{ij} = \mu + d_i + e_{ij}$$

여기서  $y_{ijk}$  : 분할 성공률

$\mu$  : 분할 성공률의 평균

$d_i$  : 발육단계의 효과( $i=1, 2$ )

$e_{ij}$  : 오차 합계

2) 쌍태임신의 생시체중 및 임신기간

$$y_{ijk} = \mu + s_i + e_{ij}$$

여기서  $y_{ijkl}$  : 생시체중 및 임신기간

$\mu$  : 생시체중 및 임신기간의 평균

$s_i$  : 성별효과( $i=1, 2$ )

$e_{ij}$  : 오차 합계

## 결 과

### 1. 수정란의 분할 성적

한우 수정란 21개를 micro-blade로 분할한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 수정란의 이분 성공률은 89.16%였으며, 수정란의 발육단계별에서는 상실배기가 86.66%, 배반포기가 91.66%로 배반포기가 상실배기보다 유의적으로 높은 이분 성공률을 나타냈다( $P < 0.05$ ).

한우 이분 수정란 21개를 24시간 배양한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 이분 수정란의 배발달

Table 1. Successful bisection of produced Korean Native cattle embryos of morula and blastocyst stage\*

Embryo stage	No. of embryos	No. of demi-embryos produced	Rate(%)
	bisected	produced	
Morula	15	26	86.66 ± 5.84 <sup>a</sup>
Blastocyst	6	11	91.66 ± 9.24 <sup>b</sup>
Total	21	37	89.16 ± 5.46

\* Least square means and standard errors. Means with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

Table 2. *In vitro* survival rate of Korean Native cattle embryos cultured for 24 hours following bisection\*

Embryo stage	No. of demiem-bryos cultured	No. of embryos survived	Rate(%)
	Morula	8	
Blastocyst	9	5	55.55 ± 15.98 <sup>b</sup>
Total	17	10	59.02 ± 11.64

\* Least square means and standard errors. Means with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

률은 59.02%였으며 수정란의 발육단계별에서는 상실배기가 62.50%, 배반포기가 55.55%로 상실배기가 유의적으로 높은 발달률을 보였다( $P < 0.05$ ).

### 2. 쌍자 분만

한우 수정란의 분할·이식과 정상 수정란 이식으로 쌍태 임신률을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 이분 수정란 2개씩을 10두의 젖소 수란우에 이식한 결과 3두(30.0%)가 임신되었고 그 중 2두(66.7%)가 쌍태 임신되었다. 한편 정상 수정란 2개씩을 이식한 한우 수란우 23두 중 12두(52.2%)가 임신되었으며 그 중 7두(58.3%)가 쌍태임신이 되었다.

한우 이분 수정란 및 정상 수정란 2개 이식에 의

Table 3. Twin calving rate from transfer of bisected or intact and fresh or frozen embryos of Korean Native cattle

Embryo	No. of recipients	No. of pregnancy(%)	No. of twin(%)
	Bisected		
Fresh	4	1(25.0)	1(100.0)
Frozen	6	2(33.3)	1(50.0)
Total	10	3(30.0)	2(66.7)
Intact			
Fresh	4	4(100.0)	2(50.0)
Frozen	19	8(42.1)	5(62.5)
Total	23	12(52.2)	7(58.3)



Fig. 2. Monozygotic twin calves produced by transfer of bisected embryo of Korean Native cattle (September 30, 1994).

Table 4. Birth weight and gestation length by twin calving and calf sex following transfer of Korean Native cattle embryos\*

Calf sex	No. of calves	Birth weight (kg)	Gestation length (days)
Female	8	18.12±0.95 <sup>a</sup>	280.25±1.91 <sup>a</sup>
Male	6	15.66±1.10 <sup>b</sup>	277.00±2.21 <sup>a</sup>
Total	14	16.89±0.73	278.62±1.46

\* Least square means and standard errors except for overall mean. Means with different superscripts within each sub-group were significantly different ( $P < 0.05$ ).

해 분만한 7두의 수란우에서 태어난 쌍태 송아지 14두의 임신기간과 생시체중을 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 쌍태 임신 수란우의 임신기간은 278.62일이었으며, 쌍태 송아지의 생시체중은 16.89kg으로 암송아지가 수송아지보다 생시체중이 유의적으로 무거웠다( $P < 0.05$ ).

### 3. 이분 수정란의 이식에 의한 쌍자의 일란성 감정

이분 수정란의 이식에 의해 분만한 한우 쌍자의 친자관계와 일란성을 구명하기 위해 항혈청을 이용한 적혈구형에 대해 분석한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. A system에서는 공정우는 A<sub>1</sub>의 항혈청에 강한 반응을 보였고, 공란우는 A<sub>1</sub> 및 Z'에 반응

Table 5. Blood Type analysis by A, F and S system in donor sire, donor dam and twin calves derived from bisected embryos of Korean Native cattle

Cattle	A	F	S
Donor sire	A <sub>1</sub>	F/V	SU'
Donor dam	A <sub>1</sub> Z'	-	U <sub>1</sub>
Calf 1	A <sub>1</sub> Z'	F	U <sub>1</sub>
Calf 2	A <sub>1</sub> Z'	F	U <sub>1</sub>

을 보였다. 송아지 1과 송아지 2는 공란우와 같은 A<sub>1</sub>Z'에 반응을 보여 쌍태송아지는 공정우로부터 A<sub>1</sub> 인자가 유전되었고, 공란우로부터는 Z'인자가 유전된 것으로 추정되고, F system에서는 공정우로부터 F인자가 쌍태 송아지 2두에게 유전되었으며, S system에서는 공란우로부터 U<sub>1</sub>인자가 유전되었음을 알 수 있었다.

혈액단백다형 유전자좌인 hemoglobin(Hb), albumin(Alb), amylase I(Am I), ceruloplasmin(Cp), transferrin(Tf), post-transferrin-2(pTf-2) 및 post-albumin(pAlb)의 7개 유전자좌에 대하여 분석한 결과는 Table 6과 같다. Hb, Alb 및 Cp 유전자좌는 공정우, 공란우, 송아지 1과 송아지 2가 동일한 이동도를 보이는 유전자 AA, AA 및 CC로 각각 구성되어 있었다. pAlb 유전자좌에서 공정우는 FF형, 공란우는 FS형의 이형접합체로 관찰되었고, 송아지 1과 송아지 2도 공란우와 같은 FS형의 이형접합체로 판정되었다. 송아지 1과 송아지 2가 보인 FS형은 공정우로부터 F형이 유전되었고, 공란우로부터

Table 6. Genotypes analysis with hemoglobin (Hb), albumin (Alb), amylase I (Am I), ceruloplasmin (Cp), transferrin (Tf), post-transferrin-2 (pTf-2) and post-albumin (pAlb) loci of donor sire, donor dam and twin calves derived from bisected embryo of Korean Native cattle

Cattle	Hb	Alb	Am I	Cp	Tf	pTf-2	pAlb
Donor sire	AA	AA	BC	CC	EE	SS	FF
Donor dam	AA	AA	CC	CC	AD <sub>1</sub>	FF	FS
Calf 1	AA	AA	CC	CC	D <sub>1</sub> E	FS	FS
Calf 2	AA	AA	CC	CC	D <sub>1</sub> E	FS	FS

Table 7. Fragment size analysis of bovine lymphocyte antigen (BoLA)-DR $\beta$ 3 gene of donor sire, donor dam and twin calves derived from bisected embryo of Korean Native cattle

Cattle	Rsa I	Hae III	BstY I
Donor sire	180, 111, 104, 69, 54, 50	167, 65, 52	284, 199, 85
Donor dam	141, 111, 78, 54, 50, 39, 33, 30	167, 65, 52	284, 199, 85
Calf 1	111, 78, 69, 54, 50, 39, 33, 30	167, 65, 52	284, 199, 85
Calf 2	111, 78, 69, 54, 50, 39, 33, 30	167, 65, 52	284, 199, 85

터는 S유전자가 유전된 것으로 추정된다. Tt 유전자좌에서는 공정우가 EE형, 공란우가 AD<sub>1</sub>형, 송아지 1과 송아지 2는 D<sub>1</sub>E 이형접합체로 판정되었다. 송아지 1과 송아지 2가 보인 D<sub>1</sub>E형은 공정우로부터 E유전자가 유전되었고, 공란우로부터는 D<sub>1</sub>유전자가 유전된 것으로 추정된다. pTt-2 유전자좌에서는 공정우가 SS형, 공란우가 FF형, 송아지 1과 송아지 2는 FS의 이형접합체로 판정되었다. 송아지 1과 송아지 2가 보인 FS형은 공정우로부터 S유전자가 유전되었고, 공란우로부터는 F유전자가 유전된 것으로 추정된다. Am I 유전자좌에서는 공정우가 BC형, 공란우가 CC형, 송아지 1과 송아지 2는 CC의 이형접합체로 판정되었다. 송아지 1과 송아지 2가 보인 BC형은 공정우 및 공란우로부터 C유전자가 각각 유전된 것으로 추정된다.

소 백혈구 항원(bovine lymphocyte antigen, BoLA)을 이용하여 유전자 다형을 분석한 결과는 Table 7과 같다. Hae III 및 BstY I 제한효소로 절단한 BoLA-DR $\beta$ 3유전자는 공정우, 공란우, 송아지 1 및 송아지 2의 전 개체가 동일한 염기 수로 절단되어 다형성은 인정할 수 없었다. Rsa I 제한효소로 절단한 BoLA-DR $\beta$ 3유전자는 111, 54, 50kb의 3개 단편상이 전 개체에서 공통적으로 관찰되었으나, 공정우는 180, 104, 69kb의 단편상이, 공란우는 141, 78, 39, 33, 30kb의 5개 단편상이, 송아지 1 및 송아지 2는 78, 69, 39, 33, 30kb의 5개 단편상이 관찰되었다. 송아지 1 및 송아지 2가 보인 69kb의 단편상은 공정우로부터, 그 외의 단편상은 공란우로부터 유전된 것으로 추정할 수 있으며, 송아지 1 및 송아지 2는 BoLA-DR $\beta$ 3유전자 구성이 같은 개체로 인정되었다.

## 고 찰

수정란의 분할을 위하여는 holding pipette로 수정란을 고정된 후 glass needle과 razor blade 또는 surgical blade를 이용하여 분할하고 있다. 그러나 holding pipette를 사용하게 되면 현미경의 양측에 glass needle이나 blade와 함께 holding pipette를 고정하여 조작할 수 있는 미세조작기가 필요하게 되고 holding pipette를 제작하여야 하는 불편한 점이 있어, 본 연구에서는 holding pipette 없이 micro-blade만을 사용하여 간단하게 수정란을 분할하였다.

수정란 이분 성공률은 Lambeth 등(1983)은 glass needle을 사용하였을 때 90%, Rorie 등(1985)은 razor blade를 사용하였을 때 95%, Williams 등(1982)은 surgical blade를 사용하였을 때 96.4%였다고 하였으며, 정 등(1989)은 microblade를 이용하여 82.8%의 이분 성공률을 나타내었다고 하였다. Bredbacka 등(1991)은 정상 배반포기의 세포수는 62.7개였으며, 상실배기를 분할하여 배양하였을 때는 세포수가 30.6~31.6개로서 초기 상실배기보다 후기 상실배기 또는 초기 배반포기를 분할할 것을 권장하였다.

본 연구에서 수정란의 이분 성공률은 89.16%였으며, 배반포기가 상실배기보다 유의적으로 높은 이분 성공률을 나타냈다( $P < 0.05$ ). 배반포기가 상실배기보다 좋은 성적을 나타낸 것은 배반포기의 세포수가 상실배기보다 많기 때문인 것으로 사료된다.

이분 수정란의 체외배양시 투명대 존재 여부에 대하여는 연구자간에 다소 차이가 있다. Baker (1985)는 투명대가 존재하였을 경우 35%, 투명대 없이 배양하였을 때는 15%가 생존하였다고 하여 이분 수정란의 체외배양은 투명대가 필요하다고 하였으며(정 등, 1989; Massey, 1982), Takaura 등(1985)은 이분 수정란의 체외배양 40~46시간 후 생

존률은 투명대가 존재하는 것은 62.5%, 투명대가 존재하지 않는 것은 75.0%로 투명대가 이분 수정란의 체외배양후 생존률에 영향을 미치지 않는다고 하였다. 한편 정 등(1992)은 체외수정란을 분할하여 4시간 배양에서 투명대가 존재하지 않은 수정란의 생존률은 상실배기가 57.1%, 배반포기가 66.6%로 배반포기가 높았다고 하였다.

본 연구에서 이분한 수정란을 투명대없이 24시간 체외배양하였을 때 생존률은 59.02%였으며, 상실배기가 배반포기보다 유의적으로 높은 생존률을 나타내어( $P < 0.05$ ), 다른 연구자들의 보고와 다소 차이를 보이는 것은 수정란의 배양조건이 다르기 때문인 것으로 추정된다.

자연상태에서 소의 쌍태 분만률은 4% 미만으로 아주 낮아(Nielen 등, 1989; Rutledge, 1975) 조기 증식과 생산비 절감차원에서 인위적으로 쌍태임신을 시키는 연구가 많이 이루어져 왔다. 성선자극 호르몬의 투여로 과배란을 유기하여 쌍태임신을 시키는 방법이 있으나 안정적인 쌍태를 생산할 수가 없어서 활용도가 낮아(고 등, 1981a; Turman 등, 197), 수정란이식에 의한 쌍태임신 기술로 수정란 2개 이식의 방법이 널리 이용되고 있다(Gray 등, 1991; Kippax 등, 1991; Suzuki 등, 1989; Kim, 1988; Anderson 등, 1978; Rowson 등, 1971). 수정란 2개를 이식하여 쌍태를 유기하는 방법에는 분할하지 않은 수정란을 이식하는 방법과 수정란을 분할하여 이식하는 방법이 있다.

이분 수정란이식에 의한 일란성쌍태 송아지의 생산이 Willadsen과 Polge(1981)에 의해 최초로 성공하여 외국에서는 소의 증식과 개량에 활용도가 높으나 국내에서는 일란성 쌍태송아지를 생산하였다는 보고는 없었다.

이분 수정란의 수태률은 정상 수정란보다 수태률이 저조하다는 보고도 있으나(Heyman, 1985) 대다수의 연구자들은 차이가 없다고 하였다(Leibo와 Loskutoff, 1993; Seike 등, 1989a; Takeda 등, 1986). 이분 수정란의 수태률 및 쌍태임신률에 미치는 요인으로는 수정란의 질, 발육단계, 투명대 유무, 동결 여부, 수란우 등이 있으나 연구자들간에 다소 차이가 있다.

Warfield 등(1987)과 Kippax 등(1991)은 이분

수정란의 투명대 유무가 수태률과 쌍태임신률에 영향을 미치지 않는다고 하였으나 Suzuki와 Shimohira(1986)는 영향을 받는다고 하였다. Arave 등(1987)은 상실배기의 이분 수정란이 배반포기의 이분 수정란보다 수태률과 쌍태 임신률이 높다고 하였으나(Picard 등, 1985; Lambeth 등, 1983; Ozil, 1983; Ozil 등, 1982), McEvoy(1988)와 Tao 등(1991)은 배반포기의 이분 수정란이 상실배기보다 높았다고 하였다. Gray 등(1991)은 육우 이분 수정란 1,988개를 이식하였을 때 수태률이 50.2%였고, 쌍태률은 27.7%였다고 하였으며, Heyman(1985)은 신선 이분 수정란의 이식에서 수태률은 36.3%, 동결·융해한 이분 수정란의 이식에서는 20%의 수태률을 나타내었다고 하였다.

본 연구에서는 이분 수정란 2개씩을 10두의 젖소 수란우에 이식한 결과 3두(30.0%)가 임신되었고 그 중 2두(66.7%)가 쌍태임신되었다. 본 연구의 결과는 다른 연구자들보다 저조한 성적이나 공시두수가 적어 수태률에 미치는 요인에 대해 분석이 곤란하였다. 수정란 분할시에는 세포에 손상을 주기 때문에 정상적 수정란보다는 생존률이 낮으므로 수태률과 쌍태임신률을 높이기 위하여는 양질의 수정란을 선택하여 분할하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

Kim 등(1988)은 수정란 2개를 이식하면 63~88%의 높은 수태률을 나타내며, 쌍태 임신률은 33~50%의 수준이라고 하였다(Sreenan과 Diskin, 1989; Sreenan 등, 1975; Rowson 등, 1971).

본 연구에서는 정상 수정란 2개씩을 이식한 한우 수란우의 수태율은 52.2%이었으며 그 중 58.3%가 쌍태임신이었다. 따라서 수태률은 다른 연구자보다 다소 저조하였으나 쌍태임신률은 높은 편으로 수정란이 다량 확보된다면 생산비 절감을 위한 쌍태 송아지 생산에 활용이 가능할 것으로 본다.

Vasques 등(1995)과 Turman 등(1971)은 소의 임신기간 및 생시체중에 영향을 미치는 요인 중의 하나가 쌍태임신으로 쌍태임신은 단태임신보다 임신기간이 짧고 생시체중이 적은 송아지들을 분만한다고 하였다.

Suzuki 등(1989)은 수정란 2개를 이식하여 분만한 수란우의 임신기간은 쌍태임신이 단태임신보다 5일이 짧았고, 쌍태임신 수란우의 분만에서는 수송



아지가 암송아지보다 4일, 단태임신 수란우의 분만에서는 수송아지가 암송아지보다 2일이 길었고, 생시체중은 단태 송아지가 쌍태 송아지보다 6kg이 무거웠으며, 단태 송아지에서 수송아지가 암송아지보다 5kg, 쌍태 송아지에서는 수송아지가 암송아지보다 3kg이 무거웠다고 했다.

신과 백(1984)은 한우의 임신기간은 쌍태가 단태보다 5일이 짧았다고 하였다.

본 연구에서는 쌍태 임신기간이 278.62일로 “I. 동결 수정란의 이식과 산자 생산”에서의 단태 임신기간 288.50일보다 9.88일이 짧았으며, 생시체중은 쌍태분만 송아지가 16.89kg으로 단태분만 송아지보다 7.33kg이 가벼웠고, 쌍태분만 송아지의 성별에서는 암송아지가 수송아지보다 무거웠다. 쌍태임신에서 임신기간과 생시체중이 단태임신과 많은 차이가 있는 것은 수란우 1두가 임신 265일에 생시체중 13kg의 수송아지를 2두를 조기에 분만하였기 때문이었다. 그러나 본 연구의 결과는 수정란이식에 의한 한우의 쌍태임신에 대한 임신기간과 생시체중을 예측할 수 있는 자료로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

수정란이식에서 친자관계와 일란성 쌍태성을 증명할 수 있는 방법은 혈액형 검사 등을 통하여 가능하다(신, 1995) 이러한 국내 연구보고는 소수에 지나지 않는다(이 등, 1994; 신 등, 1993; 신 등, 1990). Suzuki 등(1989)은 이분 수정란이식으로 분만한 일란성 쌍태송아지에 대해 항혈청을 이용한 적혈구형검사에서 일치하는 혈액형을 갖고 있었다고 하였으며 Seike(1991)는 적혈구형과 혈액단백 다형으로 일란성 쌍태송아지를 확인하였다고 하였다.

본 연구에서는 이분 수정란이식에 의해 분만한 한우 쌍태 송아지의 친자관계와 일란성을 구명하기 위해 항혈청을 이용한 적혈구형 검사, 혈액단백 다형 유전자좌 분석 및 백혈구 항원을 이용한 유전자 다형의 분석을 실시하였다. 그 결과 쌍태 송아지 2두는 공정우 및 공란우로부터 특정한 유전자가 각각 유전되었으며, 13개의 유전자군에서 정확하게 일치하는 유전자의 구성을 보여 공정우 및 공란우의 친자관계와 일란성 쌍태를 부정할 수 있는 어떠한 의심점도 발견할 수가 없었다.

따라서 능력이 우수한 한우의 암소로부터 채취한 수정란을 2개 또는 분할하여 이식하게 되면 우량한 우균을 조기에 조성할 수 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

한우 수정란의 효율성을 증대하고 쌍태 송아지 생산기술의 체계화를 위하여 holding pipette을 사용하지 않고 간단하게 수정란을 분할하여 투명대 없이 이식하거나, 정상 수정란 2개를 이식하고, 이분 수정란이식에 의해 태어난 일란성 쌍태 송아지의 친자관계를 확인한 결과는 다음과 같다.

수정란의 이분 성공률은 89.16%였으며, 배반포기가 91.66%로 상실배기 86.66%보다 유의적으로 높은 이분 성공률을 나타냈다( $P < 0.05$ ). 수정란을 분할하여 24시간 배양후 배발달률은 59.02%였으며, 상실배기가 62.50%로 배반포기 55.55%보다 유의적으로 높은 배발달률을 나타내었다( $P < 0.05$ )

쌍태송아지 생산을 위하여 이분 수정란 2개씩을 10두의 젖소 수란우에 이식하였더니 3두(30.0%)가 임신되었고 그 중 2두(66.7%)가 쌍태임신되었다. 정상 수정란 2개씩을 이식한 한우 수란우 23두중에는 12두(52.2%)가 임신되었으며 그 중 7두(58.3%)가 쌍태임신이 되었다.

수정란이식으로 쌍태송아지를 분만한 수란우 7두의 평균 임신기간은 278.62일이었으며, 쌍태 송아지의 생시체중은 16.89kg이었다.

이분 수정란의 이식으로 분만한 한우 쌍태 송아지에 대해 혈액형, 혈액단백다형, 소 백혈구 항원에 의한 유전적 다형을 분석한 결과에서 친자관계와 일란성이 확인되었다.

## 참고문헌

- Anderson GB and Cupps PT, Drost M, Horton MB and Wright RW, Jr. 1978. Induction of twinning in beef heifers by bilateral embryo transfer. J. Anim. Sci., 46(2):449-452.
- 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 (3):373-382.
- Baker RD. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology*, 23(1):3-12.
- Blakewood EG, Rorie RW, Pool SH and Godke RA. 1986. Freezing bovine embryos without a zona pellucida. *Theriogenology*, 22(1):141.
- Boland, MP, Crosby TF and Gordon I. 1976. Birth of twin calves following a simple transcervical non-surgical egg transfer technique. *Vet. Rec.*, 99:274-275.
- Boland MP and Gordon I. 1978. Twinning in lactating Friesian cows by nonsurgical egg transfer. *Vet. Rec.*, 103:241.
- Bredbacka P, Bredbacka K, Aalto J and Kukkola H. 1991. Development of inner cell mass in intact and bisected cattle morulae. *Theriogenology*, 35(1):188.
- Bredbacka P, Huhtinen M, Aalto J and Rainio V. 1992. Viability of bovine demi- and quarter-embryos after transfer. *Theriogenology*, 38(1):107-113.
- Broadbent PJ, Stewart M and Dolman DF. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology*, 35(1):125-139.
- Eijk MJT, Stewart-Haynes JA and Lewin HA. 1992. Extensive polymorphism of BoLA-DR $\beta$  genes distinguished by PCR-RFLP. *Anim. Genet.*, 23:483-496.
- Gray KR, Bondioli KR and Betts CL. 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology*, 35(1):37-44.
- Hasler JF. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 75(10):2857-2879.
- Heyman Y. 1985. Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 23(1):63-75.
- Kim CI, Goh GD, Lee SY, Cheong HT and Yang BK. 1988. Induction of twin pregnancy using frozen-thawed embryo transfer in cattle. *Korean J. Emb. Trans.*, 3(1):43-47.
- 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(1):25-35.
- Kraay GJ. 1982. The distribution of eight polymorphic protein in cattle and their efficiency in parentage testing. *Proc. X<sup>th</sup> Int. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph.*, pp. 102.
- 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(1):85-95.
- Leibo SP and Rall WF. 1987. Increase in production of pregnancies by bisection of bovine embryos. *Theriogenology*, 27(1):245.
- Leibo SP and Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39(1):81-94.
- Massey JM, Anderson JG, Ellis WC, Sorensen AM, Jr. and Kraemer DC. 1982. Development of bovine embryos following enzymatic removal of the zona pellucida. *Theriogenology*, 17(1):99.
- McEvoy TG. 1988. *In vitro* and *in vivo* survival of bovine demi-embryos without zonae pellucidae. *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. & AI.*, 1:175.
- 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(6):1245-1253.
- Nielen M, Schukken YH, Scholl DT, Wilbrink HJ and Brand A. 1989. Twinning in dairy

- cattle: A study of risk factors and effects. *Theriogenology*, 32(5):845-862.
- Ozil JP, Heyman Y and Renard JP. 1982. Production of monozygotic by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Rec.*, 110:126-127.
- Ozil JP. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 69(2):463-468.
- 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(4):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(5):342-347.
- Picard L, King WA and Betteridge KJ. 1985. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet. Rec.*, 117:603-608.
- Rorie RW, McFarland CW, Overskei TL, Voelkel SA and Godke RA. 1985. A new method of splitting embryos without the use of a commercial micromanipulator unit. *Theriogenology*, 23(1):224.
- Rowson LEA, Lawson RAS and Moor RM. 1971. Production of twins in cattle by egg transfer. *J. Reprod. Fert.*, 25:261-268.
- Rutledge JJ. 1975. Twinning in cattle. *J. Anim. Sci.*, 40(5):803-815.
- Seike N, Saeki K, Utaka K, Sakai M, Takakura R, Nagao Y and Kanagawa H. 1989a. Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without pellucidae. *Theriogenology*, 32(2):211-220.
- Seike N, Teranishi M, Yamada S, Takakura R, Nagao Y and Kanagawa H. 1989b. Increase in calf production by the transfer of bisected bovine embryos. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51(6):1193-1199.
- Seike N. 1991. Studies on bisected bovine embryos. Snow Brand Milk Products Co., Ltd. Report, 93:1-67.
- Southern E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517.
- Sreenan JM, Beehan D and Mulvehill P. 1975. Egg transfer in the cow: Factors affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfers. *J. Reprod. Fert.*, 44:77-85.
- Sreenan JM, Diskin MG and McDonagh T. 1981. Induction of twin-calving by non-surgical embryo transfer: A field trial. *Vet. Rec.*, 109:77-80.
- Sreenan JM and Diskin MG. 1989. Effect of a unilateral or bilateral twin embryo distribution on twinning and embryo survival rate in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 87(2):657-664.
- Suzuki T and Shimohira I. 1986. Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose: a preliminary report. *Theriogenology*, 26(3):333-339.
- Suzuki T, Sasaki Y, Ishida T, Matsuda S, Miura H and Itoh K. 1989. Induction of twinning in dairy or crossbred heifers by ipsilateral frozen embryo transfer. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51(3):554-559.
- Takakura H, Takahashi Y, Itoh T, Sakai Y, Tsuda A and Dohchi O. 1985. Viability of naked bovine demi-embryos after culture and transfer. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 31(3):122-125.
- Takeda T, Hallowell SV, McGauley AD and Hasler JF. 1986. Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and nonsurgically. *Theriogenol-*

- ogy, 25(1):204.
- Tan L, Chen X, Liao H, Yan Z, Liu R and He C. 1988. Production of bovine monozygotic twins by simple bisection. *Theriogenology*, 29(1):318.
- Tao T, Shie J, Yanqing H, Changheng G, Wenzhu M, Tiezhu A and Yuding Z. 1991. The survival of zona-free bovine demi- and quarter embryos. *Theriogenology*, 35(1):281.
- Turman EJ, Laster DB, Renbarger RE and Stephens DF. 1971. Multiple birth in beef cows treated with equine gonadotropin (PMS) and chorionic gonadotropin(HCG). *J. Anim. Sci.*, 32(5):962-967.
- Vasques MI, Horta AEM, Marques CC, Sasser RG and Humblot, P. 1995. Levels of bPSPB throughout single and twin pregnancies after AI or transfer of IVM /IVF cattle embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:279-289.
- Warfield SJ, Seidel GE, Jr. and Elsdén RP. 1986. Transfer of bovine demi-embryos with and without zonae pellucidae. *Theriogenology*, 25(1):212.
- Warfield SJ, Seidel GE, Jr. and Elsdén RP. 1987. Transfer of bovine demi-embryos with and without the zona pellucida. *J. Anim. Sci.*, 65(3):756-761.
- Willadsen SM and Polge C. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Rec.*, 108: 211-213.
- Williams TJ, Elsdén RP and Seidel GE, Jr. 1982. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theriogenology*, 17(1):114.
- 강대진, 박희성, 이효종, 박충생. 1989. 생쥐배의 발생단계별 미세분할, 배양 및 이식에 관한 연구. *경상대학교 축산진흥연구소보*, 16:7-12.
- 고광두, 정길생, 이기만. 1981. 한우의 수정란이식에 관한 연구 제 I 보. GTH 단독투여에 의한 한우의 쌍태 유기. *한국축산학회지*, 23(4):315-321.
- 김남형, 정길생, 노환철, 백운화, 이경광. 1986. 생쥐 수정란의 양분에 의한 일란성 쌍태의 생산. *한국축산학회지*, 28(8):527-534.
- 김상근, 이종진. 1995a. 소 분할 초기배와 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포와의 공배양에 따른 체외발생율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 19(4):259-264.
- 김상근, 이종진, 이명현. 1995b. 소 초기배의 분할후 생존율과 체외발생율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 19(4):265-270.
- 신원집, 백동훈. 1984. 환경요인이 한우의 임신기간에 미치는 영향. *한국축산학회지*, 26(8):653-657.
- 신형두, 신언익, 양일석, 권종국. 1990. 한우혈액형의 phenogroup과 아형관계에 관한 연구. *한국축산학회지*, 32(9):534-541.
- 신형두, 신언익, 양일석, 권종국. 1993. 한우(*Bos taurus coreanae*)의 혈액 단백질형에 관한 연구. *한국축산학회지*, 35(3):191-203.
- 신형두. 1995. 소에서의 유전적 다형의 이용. *한국수정란이식학회지*, 10(1):23-31.
- 양보석, 오성종, 유승환, 김희석, 정연후, 이근상. 1988. 한우에 있어 다배란의 반복처리 및 동결수정란 이식에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 3(1):38-42.
- 오성종, 양보석, 이병식, 성환우, 정진관, 강홍주. 1993. 수정란 추가 이식에 의한 한우 쌍자 생산 연구. *농업논문집*, 35(2):507-512.
- 이장희, 신형두, 정호영, 유충현, 안병석, 이수현, 정상원, 김창근. 1994. 젖소에 있어서 혈액형분석에 의한 혈통확인에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 9(2):197-205.
- 정길생, 김정익, 김종배, 정병현, 이훈택, 정형민. 1992. 우수 포유동물 수정란의 이용효율 제고에 관한 연구 III. 미세조작에 의한 수정란의 이용효율 증진에 관한 연구. *건국대학교 동물자원연구지*, 17:3-9.
- 정병현, 지희준, 이상진, 이동희, 정태영, 정길생. 1989. 우 수정란 Bisection과 이식에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 13(3):164-170.
- 황우석. 1985. 절단마우스 이분배의 동결보존실험. 1. 마우스 절단이분배의 체외 발육능에 대하여. *한국임상수의학회지*, 2(1):43-53.