

한우 보증종모우 선발을 위한 후보종모우 정액의 체외수정에 관한 연구

박병권[†] · 김흥기^{*}

공주문화대학 애완동물과

Study on *In Vitro* Fertilization of Proven Bull Semen for Selection of Young Bull in Hanwoo

B. K. Park[†] and H. K. Kim^{*}

Department of Companion Animal, Kongju National Culture College, 314-712, Republic of Korea

SUMMARY

This study was undertaken in an effort to select the sire bull in Hanwoo through *in vitro* fertilization of proven bull semen. It was used for *in vitro* fertilization that of the 20 proven bull semen with follicular oocytes derived from slaughterhouse ovaries of Hanwoo.

The stage of maturation on the time course of bovine cumulus-enclosed oocytes incubated for 24 hours was found the highest(96.4%) than those of other maturation time. *In vitro* fertilization rate of bovine oocytes with proven bull sperm showed from 61.5 to 88.9%. Polyspermy of *in vitro* fertilized oocytes according to proven bulls were the highest KP 491(61.5%) nothing but KP 486, KP 491 and KP 497.

(Key words : IVM, IVF, Hanwoo, proven bull semen, follicular oocyte)

서 론

최근 국내 축산업의 어려움을 극복하고자 한우의 개량사업에 많은 관심이 집중되어 있다. 가축의 개량사업은 선발과 교배법에 의하여 우수한 형질의 발현율을 증가시키려는 노력이 오랫동안 이루어져 왔다. 한편, 우수한 능력을 가진 종모축의 번식기회를 증가시키기 위한 방법으로 인공수정 기술이 보급되어 소의 개량과 번식효율의 향상에 기여한 바가 매우 크다. 최근에는 수정란이식 기술의 보급으로 종축 생산의 효율성이 극대화되어 한우의 개량사업에 적절하게 이용되고 있다. 체외수정 기술은 난포에서 채취한 미성숙 난포란의 체외성숙, 체외

수정 및 체외배발생 등의 기술이 집약된 것으로서, 체외수정란 생산기술의 확립은 이식 가능한 우량 수정란을 다수 확보할 수 있다는 이점 이외에도 여러 두수의 후보종모우에서 채취한 정액을 체외수정시킨 후 각각의 정상수정률을 확인함으로써 보증종모우의 선발에 간접적으로 이용될 수 있어 종모우 선발기간의 단축에도 기여할 수 있다.

소의 체외수정에 관한 연구는 Edwards(1965)가 미성숙 난포란의 체외성숙을 보고한 이래 Iritani와 Niwa(1977)가 체외성숙시킨 소 난포란의 성공적인 체외수정을 보고하였다. 체내수정의 경우와 달리 체외수정시에는 빈번한 다정자 침입과 전핵형성률의 저하를 나타내는데 이러한 비정상 수정은 난포란의 핵 및 세포질성숙이 체외배양과정에서 완전히

*충남농업기술원 축산시험장(Chungnam Agricultural Research & Extension Services, Livestock Experiment Station)

[†] Correspondence

게 이루어지지 않기 때문이며(Ball 등, 1983), 또한 체외수정에 이용되는 정자의 상태에 따라서도 영향을 받게 된다(Ling과 Lu, 1990; Rodger와 O'Shea, 1982). 체외성숙시간의 경우, 제2성숙분열중기까지 도달한 난포란은 배양시간의 경과에 따라 활성화되어 노화를 유발함으로써 체외수정률의 감소와 다정자침입 등의 정상발생능의 감소를 초래한다(Leibfried 등, 1989). 소의 체외수정률은 종모우간에 개체차가 있으며 배발생율에도 큰 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(Shi 등, 1990; Eystone과 First, 1989; Niwa 등, 1988). Niwa와 Ohgoda(1988)는 이와 같은 개체차의 문제점을 체외수정후 수정률이 우수한 개체를 선별하여 이용함으로써 어느 정도 극복될 수 있다고 보고하고 있다.

따라서, 본 연구는 한우 난포란의 최적 체외성숙시간을 조사하고, 한우 후보종모우 정액을 채취하여 체외성숙 난포란과 체외수정시킴으로써 한우의 체외수정체계 확립의 기초 및 한우 후보종모우 정액의 체외수정능력에 대하여 조사함으로써 한우 보충종모우의 선발시 참고자료로 활용하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 공시 후보종모우

본 실험에 사용된 한우는 축협중앙회 한우개량부의 후보종모우 20두를 공시하여 사용하였다.

2. 정자의 준비

인공질법으로 채취한 후보종모우의 동결정액을 37℃의 온수조에 용해후 정자세척용 BO배양액과 혼합하여 500×g으로 5분간 원심분리하여 취한 정자 pellet을 수정능획득용 BO 배양액에 부유시켜 500×g으로 5분간 원심분리하여 수정능획득을 유도하였다.

3. 난포란의 준비

실험에 공시한 난포란은 도축직후의 한우 암소의 난소를 100 IU의 penicillin G와 100 μg/ml를 첨가한 33~35℃의 멸균 생리식염수로 1~2회 세척한 다음 동일 생리식염수염 침지하여 1시간 이내에 실험

실로 운반하였다. 난포란의 채취는 18 gauge 주사침이 장착된 10ml 주사기로 난소실질을 삽입하여 난포직경 2~6 mm의 난포로부터 흡입하였으며, 시험관에 넣어 온수조(38℃)에서 5~10분간 정치시켜 침전물만을 취한 다음, 난구세포가 충실히 부착된 난포란만을 선별하여 실험에 공시하였다.

4. 배양액의 제조

실험에 사용된 체외성숙 및 체외배발생용 배양액은 TCM199에 5μg/ml FSH, 10 IU/ml hCG 및 1μg/ml estradiol-17β를 첨가하였으며, 최종 10% (v/v) FBS가 되도록 제조하였다. 체외수정용 배양액은 BO배양액(Brackett와 Oliphant, 1975)에 10 mM caffeine을 첨가하여 조제하였으며, 이들 배양액을 pH 7.4, 삼투압 290~300 mOsm/kg로 조정하여 사용하였으며, 사용전에 0.22 μm filter로 여과멸균한 다음 38℃, 5% CO₂, 100% 습도의 CO₂배양기에서 10~12시간동안 평형시킨 후 사용하였다.

5. 체외성숙 및 체외수정

난포란의 체외성숙은 제조된 성숙배양액을 4-well dish에 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복한 후 2~3시간 동안 CO₂배양기에서 평형시킨 후 well당 25~30개의 난포란을 적하하여 16~24시간 동안 성숙배양시켜 핵성숙 여부를 확인하였다. 체외수정은 제조한 체외수정 배양액에 5~6×10⁴cells/ml의 정자농도가 되도록 한 후, 22~24시간동안 체외성숙 배양한 난포란을 도입한 후 5~6시간동안 수정을 유도하였다. 수정을 유도한 수정란은 체외배발생 배양액으로 2~3회 세척한 후 체외배발생 배양액에서 20시간 동안 배양후 정상수정 여부를 판정하였다.

6. 체외성숙 난포란 및 체외수정란의 염색

체외성숙 난포란 및 체외수정란의 염색은 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(Rapid staining method)으로 염색하여 난포란의 16~24시간후의 핵성숙 단계를, 체외수정란의 수정 20시간후의 자·용성전핵형성 및 다정자침입 여부를 판정하였다. 염색방법은 먼저 150~300 IU/ml hyaluronidase(IV-S) 용액에 난포란 및 수정란을 옮겨

Table 1. Chemical composition of basic fuchsin staining solution

Solution A	Basic fuchsin	3 g
	70% ethanol	100 ml
Solution B	Solution A	10 ml
	5% phenol	90 ml
Working solution	Solution B	45 ml
	Glacial acetic acid	6 ml
	37% formaldehyde	6 ml

1~2분간 처리한 후 미세피펫으로 pipeting한 다음 5%(v/v) FBS가 함유된 PBS로 2~3회 세척하였다. 멸균 slide glass 위에 난포란 및 수정란 10~20개를 적하한 다음 cover glass로 덮고 난포란의 부피로 생긴 cover glass와 slide glass의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol=1 : 3)을 흘리는 방법으로 3~5분간 고정을 하였다. 고정이 끝난 난포란의 염색은 염색액(Table 1)을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(glacial acetic acid : distilled water : glycerol=1 : 3 : 1)을 흘려 염색액을 제거한 다음 위상차현미경(400~1000×) 하에서 각각 검란하였다.

결과 및 고찰

1. 체외성숙배양 시간에 따른 난포란의 핵성숙

채취·선별된 난포란을 16~24시간동안 체외성숙 배양하면서 각 시간대별로 난자급속염색법으로 염색하여 핵성숙 여부 및 핵성숙 단계를 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 성숙배양 16시간

이전에 이미 93.3%의 난포란이 난핵포붕괴(GVBD)가 일어나 제1성숙분열과정을 거치고 있었으며, 난포란의 핵성숙 완료단계인 제2성숙분열중기(Met II) 도달율은 16시간에 33.4%, 18시간에 55.2%, 20시간에 76.7%, 22시간에 83.3% 및 24시간에 96.4%를 나타냈다. 이와 같은 결과는 Met II가 18시간제에 49% 도달하였고 24시간에 94% 도달하였다는 보고(Sirard 등, 1989)와 거의 일치하는 것이었으며, 제 1극체의 출현이 체내성숙에서는 19시간부터 체외성숙 난포란의 경우는 18시간부터 일어났다고 한 보고(Hyttel 등, 1989) 및 체외성숙배양 20시간에 45%, 22시간에 68%, 24시간에 93%의 제1극체 방출을 보고한 노 등(1996)의 보고와도 대체로 일치하는 결과였다.

일반적으로 난포란의 체외성숙시간은 가능한 단축시키려고 하는 경향인데, 그 이유는 난포란의 성숙배양시간이 길어지면 성숙률은 증가되지만 노화난포란의 비율이 증가되어 다정자 침입이 일어나는 등 비정상수정률이 증가되기 때문이다(Wang 등, 1992; Yoshida 등, 1992). 이와 같은 보고들과 본 실험에서 조사된 결과로 볼 때, 적정 성숙배양시간은 노화난자와 성숙난자의 비율을 고려할 때 83.3~96.4%의 난포란이 Met II에 도달하는 22~24시간이 적절할 것으로 판단된다.

2. 후보 종모우별 체외수정율

후보 종모우 20두 각각에서 채취한 정액과 체외성숙시킨 한우 난포란을 체외수정시킨 후 7일간 체외배양하면서 2세포기 이상 발달한 수정란의 비율을 수정률로 표시한 결과는 Table 3과 같다. 후보종모우별 수정률은 KP 491에서 61.5%로 유독 낮은 수

Table 2. Nuclear maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes on the time course of incubation(r=1)

Culture time(hr)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes in*				
		GV	Met I	Ana I	Tel I	Met II
16	30	2(6.7)	16(53.3)	2(6.7)	—	10(33.3)
18	29	—	11(37.9)	1(3.0)	1(3.0)	16(55.2)
20	30	—	5(16.6)	2(6.7)	—	23(76.7)
22	30	—	2(6.7)	2(6.7)	1(3.3)	25(83.3)
24	28	—	—	—	1(3.6)	27(96.4)

* GV: germinal vesicle stage, Met I: first metaphase, Ana I: first anaphase, Tel I: first telophase I, Met II: second metaphase.

Table 3. *In vitro* fertilization rates of bovine oocytes with the proven bulls' sperm (r=3)

Bull no.	No. (%) of oocytes	
	Inseminated	Fertilized*
KP 480	223	185 (83.0)
KP 481	257	223 (86.8)
KP 482	227	190 (83.7)
KP 483	201	172 (85.6)
KP 484	209	182 (87.5)
KP 485	222	195 (87.8)
KP 486	235	200 (85.1)
KP 487	250	212 (84.8)
KP 489	310	268 (86.5)
KP 490	298	251 (84.2)
KP 491	282	179 (61.5)
KP 494	273	227 (83.2)
KP 495	259	230 (88.8)
KP 496	190	169 (88.9)
KP 497	243	213 (87.7)
KP 498	214	185 (86.4)
KP 499	279	234 (83.9)
KP 500	276	224 (81.2)
KP 501	162	142 (87.7)
KP 502	247	219 (88.7)

* Fertilized oocytes: developed over 2-cell stage embryos.

정률을 나타냈다. 그러나 그외의 후보종모우에서는 모두 81.2~88.9% 범위의 수정률을 일률적으로 나타냈다. 이와 같은 결과는 heparin과 caffeine을 첨가하여 수정능 획득시킨 정자와의 체외수정에서 68%의 수정률을 나타냈다는 보고(Niwa와 Ohgoda, 1988)와 Parrish 등(1986)이 보고한 71%의 수정률을 나타냈다는 보고 및 김 등(1992)의 체외수정에 공시한 82개의 난자중 62개의 수정란을 얻어 72.1%의 성적을 나타냈다는 보고와 비교해 볼 때 수정률이 약간 높거나 비슷한 결과를 나타냈다. 그러나, 본 실험의 결과는 Niwa 등(1988)이 보고한 35%의 수정률보다 월등히 높았으며, Iritani(1987)의 소에서 정자의 수정률이 개체에 따라 9~75%로 나타나서 개체간에 차이가 매우 컸다는 보고와는 개체간 차이가 크다는 점뿐만 아니라 전반적인 수정률에서도 매우 높은 것이었다.

3. 후보 종모우별 정상 및 다정자침입율

후보 종모우 20두 각각의 정액을 체외성숙 배양한 한우 난포란에 도입하여 20~25시간 동안 배양 후 난자급속염색법으로 정자의 침입, 자·웅전핵의 형성 유무 및 다정자침입 여부로 정상 및 비정상수정률을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 정자침입률은 KP 491에서 65.9%로 유독 낮은 성적을 나타내었고, KP 482에서 92.5%의 성적을 나타낸 것을 제외하고는 나머지 18두에서 모두 100%의 정자침입율을 나타냈다. 또한, 자웅전핵 형성률은 53.8~100%로 평균 85.9%의 정상수정률을 나타냈으며, 다정자침입율은 0.0~46.2%로 후보종모우 평균 14.1%를 나타냈다.

Table 4. Pronuclei formation and polyspermy of *in vitro* fertilized oocytes with proven bulls' sperm (r=1)

Bull no.	No. of oocytes inseminated	No. (%) of oocytes penetrated		
		Total	2 PN*	Polyspermy**
KP 480	40	40(100.0)	34(85.0)	6(15.0)
KP 481	58	58(100.0)	46(79.3)	12(20.7)
KP 482	40	37(92.5)	35(94.6)	2(5.4)
KP 483	40	40(100.0)	35(87.5)	5(12.5)
KP 484	40	40(100.0)	37(92.5)	3(7.5)
KP 485	32	32(100.0)	30(93.8)	2(6.2)
KP 486	40	40(100.0)	40(100.0)	0(0.0)
KP 487	40	40(100.0)	33(82.5)	7(17.5)
KP 489	45	45(100.0)	39(86.7)	6(13.3)
KP 490	42	42(100.0)	35(83.3)	7(16.6)
KP 491	44	29(65.9)	29(100.0)	0(0.0)
KP 494	57	57(100.0)	51(89.5)	6(10.5)
KP 495	52	52(100.0)	28(53.8)	24(46.2)
KP 496	50	50(100.0)	44(88.0)	6(12.0)
KP 497	46	46(100.0)	46(100.0)	0(0.0)
KP 498	54	54(100.0)	44(81.5)	10(18.5)
KP 499	58	58(100.0)	44(75.9)	14(24.1)
KP 500	52	52(100.0)	40(76.9)	12(23.1)
KP 501	54	54(100.0)	42(77.8)	12(22.2)
KP 502	58	58(100.0)	52(89.7)	6(10.3)

* 2 PN: male and female pronuclei formation.

** Polyspermy: over 2 PN or 1 PN+1 sperm penetrated.

이와 같은 결과는 Parrish 등(1986)의 80개의 정자침입란중 57개 즉, 71%의 자웅전핵이 형성되었다는 보고와 다정자침입률에 있어서 Chikamatsu 등(1989)의 27.1%와 Aoyagi 등(1988)의 14.3%로 보고한 성적과도 대체로 일치하는 결과였다. 그러나, Aoyagi 등(1988)의 10mM caffeine을 첨가한 BO배양액에서 5시간동안 체외수정을 유도한 결과 53.3%의 수정률을 나타냈다는 보고보다는 본 실험의 결과가 우수한 성적을 나타냈다.

적 요

본 연구는 한우에서 보증종모우의 선발을 위한 후보종모우 정액의 체외수정에 관하여 알아보고자 수행되었다. 체외수정을 위한 정액은 한우 후보종모우 20두에서 채취한 정액을 이용하였고, 난자는 한우 도축난소의 난포란을 채취하여 체외성숙시킨 후 체외수정에 공시하였다.

실험에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다. 미성숙 난포란의 적정 성숙단계인 제2감수분열 중기의 도달율은 24시간 체외성숙 배양하였을 때 96.4%로 다른 성숙배양시간에 비하여 가장 높게 나타났다. 후보종모우별 수정률은 KP 491이 61.5%로 가장 낮은 수정률을 나타냈으며, 그외는 81.2~88.9% 범위의 수정률을 나타냈다. 후보종모우별 다정자 침입율은 KP 495가 46.2%로 가장 높게 나타난 반면에 KP 486, 491 및 497에서는 다정자 침입이 없었다.

참고문헌

Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, Furudote M, Fukui Y and Ono H. 1988. Effects of two treatments on semens from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*, 30:973-985.

Ball GD, Leibfried RW, Lanz RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28:717-725.

Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Develop-

ment of a rapid staining method for of the oocytes from domestic animals. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.

Chikamatsu N, Urakawa M, Fukui Y and Ono H. 1989. *In vitro* fertilization and early development of bovine follicular oocytes matured in different culture systems and inseminated with spermatozoa treated by different methods. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35:154-158.

Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.

Eyestone WH and First NL. 1989. Variation in bovine embryo development *in vitro* due to bulls. *Theriogenology*, 31:191(abstr.).

Hyttel P, Greve T and Callesen H. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, 38:35-47.

Iritani A. 1987. A recent advances in embryology and embryo manipulation and their potential contribution to agriculture. *Porc. 4th AAAP Animal. Sci. Cong. New Zealand*, 126-130.

Iritani A and Niwa K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 50:19-121.

Leifried-Rutledge ML, Harvey MF and First NL. 1989. The molecular biology of mammalian oocyte maturation. In the molecular biology of fertilization. Schatter's Academic Press. p. 259-301.

Ling ZT and Lu KH. 1990. Frequency of cleavage and development *in vitro* of bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology*, 33:275(abstr.).

Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin of *in vitro* fertiliza-

- tion of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30:733-741.
- Niwa K, Ohgoda O and Yuhara M. 1988. Effect of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on *in vitro* penetration of cattle oocytes. 11th. Int. Cong. on Anim. Reprod., 3:346(Abstr.).
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
- Rodger RJ and O'Shea JD. 1982. Purification, morphology, progesterone production and content of three cell types isolated from the corpus luteum of the sheep. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35:441-455.
- Shi DS, Lu KH and Gordon I. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. *Theriogenology*, 33:24(abstr.).
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML and First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40:1257-1263.
- Wang ZK, Wei PH, Wang JZ, Lei C and Kou MQ. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 37:733-739.
- Yoshida M, Ishigaki K and Pursel VG. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. & Develop.*, 31:68-71.
- 김정익, 한상익, 박춘근, 임석기, 김종배, 정병현, 정길생. 1992. 우수 포유동물 수정란의 이용효율 제고에 관한 연구. I. 우 난포란의 체외성숙, 수정 및 발육. *한국가축번식학회지*. 16:55-62.
- 노규진, 강태영, 이효종, 박충생, 최창용. 1996. 체외성숙시간 및 배양방법에 따른 한우체외수정란의 생산효율. *한국수정란이식학회지*. 11:241-248.

(접수일 : 2000. 2. 23 / 채택일자 : 2000. 4. 4)