

유전자 분석을 통하여 선발된 한우로부터 초음파 유래 체외수정란  
이식에 의한 고품질 한우 생산기술의 실용화  
II. DNA 검정우로부터 초음파 유래 체외수정란의 생산에 관한 연구  
박희성 · 이지삼 · 진종인 · 박준규 · 홍승표 · 이명열 · 정장용<sup>†</sup>  
진주산업대학교 동물생명과학과

**Practical Applications of DNA Marker-Assisted Selection and  
OPU-Derived IVF Embryo Transfer for the Production of  
High Quality Meat in Hanwoo**  
**II. Production of IVF Embryos Derived Transvaginal Ovum Pick-up  
from DNA Marker-Proved Hanwoo**

H. S. Park, J. S. Lee, J. I. Chin, J. K. Park, S. P. Hong, M. Y. Lee and J. Y. Jung<sup>†</sup>  
*Dept. of Animal Science & Biotechnology, Chinju National University,  
Chinju 660-758, Republic of Korea*

**SUMMARY**

This study was designed to examine the factors affecting in fertilization and development of embryos *in vitro*, and to examine whether zona drilling by laser irradiation can improve the hatching rate of IVF embryos from DNA marker-proved Hanwoo. DNA markers related to marbling score were identified using DNA fingerprinting with M13 probe and restriction enzyme Hae III. Oocytes were aspirated from immature ovarian follicles using a combined method of rectal ovarian-palpation and transvaginal ultrasound-guidance(6.5MHz) under local anesthesia. The aspirated oocytes were washed twice with fresh D-PBS containing 5% FBS and were rewashed 4 to 5 times with TCM-199 containing 5% FBS. A morphological grade of I to IV was assigned to each oocyte. Data were analyzed using the GLM procedure of SAS.

Sperm separation methods did not have any significant effect on cleavage or developmental abilities of IVF embryos. Significantly( $P<0.05$ ) higher cleavage rate was observed in embryos from GI(60.0%, 3/5), GII(69.2%, 18/26) and GIII(62.1%, 59/95) compared to embryos from GIV oocytes(36.2%, 25/69). And the developmental rate to blastocyst stage was higher( $P<0.05$ ) in embryos from GI(33.3%, 1/3) and GII oocytes(38.9%, 7/18) than those from GIII(16.9%, 10/59) and GIV oocytes(4.0%, 1/25). There was no significant difference in development of IVF embryos to blastocyst by media for *in vitro* culture. Proportion of hatched blastocyst was significantly( $P<0.05$ ) higher in embryos received zona drilling by laser than those of non-drilled.

(Key words: DNA-marker, ovum pick-up, IVF embryo, hatched blastocyst, laser, zona drilling, Hanwoo)

서 론

국제 무역시장의 변화에 따른 국내·외 여건의 불안정으로 인한 가축 생산비의 상승과 한우 암소

\* 본 연구는 경상남도 생명공학산업화과제 연구개발비 지원에 의하여 수행되었음.

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : jychung@chinju.ac.kr

의 품귀현상 등에 따라 한우산업이 총체적 어려움에 봉착하여 이에 대한 대책이 요망되고 있는데, 수입쇠고기에 대한 경쟁력 확보를 위해서는 한우 생산비의 절감과 고급육 생산이 유일한 대안이 될 수 있을 것이다. 뿐만 아니라, 양보다는 질을 더 선호하는 쇠고기에 대한 기호도 변화와 한우 농가의 소득향상을 위해서 육량 및 육질 등과 관련된 경제적 형질이 우수한 한우의 생산이 시급하며, 한우 농가에서도 최근에는 고급육의 생산과 브랜드화에 많은 관심을 가지고 있는 추세이다.

이를 위해서는 무엇보다도 유전적으로 우수한 한우의 다량확보가 이루어져야 가능하다. 한우의 개량은 종모우를 이용한 인공수정기술이 활발하게 이용되어 왔으며, 그 후 과배란 처리로 수정란을 생산, 이식하여 송아지를 생산하는 연구가 지속적으로 이루어져 왔으나, 근래에는 종빈우를 이용한 미성숙 난자를 채란하여 수정란을 생산하는 연구가 보고되고 있다(Walton 등, 1993; Meintjes 등, 1995; Stubbings와 Walton, 1995). 초음파 기기를 이용하여 유전적으로 우수한 가축의 체내에서 난포란을 채취하여 수정란을 생산하는 기술은 공란우의 반복적인 이용으로 대량생산이 가능하며, 이미 산업화 단계에 이르렀다(Pieterse 등, 1988; Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995). 초음파기기를 이용하여 생체에서 고능력 가축으로부터 미성숙 난포란을 주기적으로 다량 채취할 수 있다면, 체외수정란의 생산기법으로 우량 수정란의 대량생산 체계를 구축할 수 있을 것이다(Pieterse 등, 1988).

그러므로 본 연구는 DNA marker를 검정하여 우수한 유전자를 가진 한우로부터 생산한 체외수정란을 이식하여, 육질 및 육량에 대한 유전적 능력이 우수한 한우를 대량생산하여 고품질 한우 쇠고기 생산 시스템을 구축하기 위한 전 단계로서 DNA marker 검정 한우로부터 초음파유도 난포란을 채란하여 체외수정 및 수정란의 체외발달에 미치는 각종 요인들과 배반포기 수정란의 부화율 개선을 위하여 투명대를 laser로 drilling하여 부화율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

초음파 채란용 한우는 경상남도내 인근 농가에서 사육중인 185두의 한우를 DNA 분석을 실시하여 등지방두께, 일당증체량, 근내지방도 및 배최장근 단면적에 연관된 DNA marker를 보유하고 있으면서 임상적으로 건강하고 번식장애가 없으며, 정상적인 발정주기를 발현하는 한우 5두를 선발하여 실험에 공시하였다. 고품질육에 대한 DNA marker의 검정은 영남대학교 축산학과 유전학교실에서 실시하였고, 한우의 사양은 진주산업대학교 실험동물 사육장에서 한우 사양표준에 준하여 사양관리를 하였으며, 정기적으로 질병과 건강상태 유무를 검진하면서 채란을 실시하였다.

### 2. 난포란의 채란

#### 1) 초음파유도에 의한 난포란의 채란

초음파 채란을 위한 마취는 Bergfelt 등(1995)의 방법을 응용하여 실시하였다. 즉 xylazine hydrochloride(Rompun; Bayer, 한국)을 0.1ml/100kg 용량으로 미정맥 또는 정맥주사 후 국소마취를 위하여 2% lidocaine(Jeil Chem., 한국) 2ml/100kg을 미추 1번과 2번 사이의 경막외에 주사하여 마취를 유도하였다. 난자채란에 사용된 기구는 동물용으로 개발되어진 SONOACE-600형(Medison Co., 한국) 초음파기기를 사용하였으며, 난포란의 채란은 진 등(2000)의 방법으로 2주당 1~2회 반복 채란을 실시하였다.

난포는 초음파 monitor 상에 설정된 biopsy line 위에 흡인하고자 하는 난포를 고정시키고 채란은 needle이 needle-guided를 통하여 monitor 상에 biopsy line이 설정된 방향으로 진입시켜 난소의 실질조직을 찌르면서 난포강내로 밀어 넣어 화면 상에서의 위치와 난소내로 needle이 들어가는 감각이 전달될 때 regulated vacuum pump를 이용하여 난포강내의 난자와 난포액을 모두 흡입하였다. 연속하여 난포란을 흡입할 경우 첫 번째의 난포에 needle을 난포강내에 진입시킨 다음, 흡입 후 난포강으로부터 needle을 제거하지 않은 상태에서 다음 흡입할 난포강내에 진입시켜 흡입을 실시하였다. 초음파 image 상에 뚜렷하게 나타난 난포들을

모두 흡입한 다음 초음파기기의 monitor 상에 나타나지 않거나, 뚜렷하게 보이지 않은 난포란 채란을 위하여 난소문을 약지와 소지사이에 끼워 난소를 고정한 후 잔존 난포들을 손가락의 감각을 이용하여 위치를 확인하였으며, needle-tip의 위치는 직장벽을 통하여 손가락 감각에 전달되는 것을 이용하여 위치를 확인하여 난포란을 채취하였다.

## 2) 도축장유래 난포란의 채란

도축장유래 난포란의 채란은 도살되는 한우 암소에서 난소를 적출한 후 penicillin G(500units/ml)와 streptomycin(500units/ml)이 함유된 35°C의 생리식염수가 들어 있는 보온병에 담아 실험실로 운반하여 항생제가 첨가된 37~39°C의 신선한 생리식염수로 3~4회 세척한 다음 18 gauge 주사바늘이 부착된 10ml 주사기로 기본배양액(TCM-199 + FBS 5%) 1ml를 흡인 후 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 채란하였다. 채취한 난포란은 도립현미경(Nikon, Co., Japan)하에서 난포란을 수집하였으며, 수집한 난포란은 기본배양액으로 4~5회 세척한 후 다음과 같이 등급별로 분류하여 사용하였다.

Grade I : 4층 이상의 난구세포층이 충만하면서 균일한 세포질을 가진 것.

Grade II : 2~3층의 난구세포층을 가진 것.

Grade III : 1층의 난구세포층을 가진 것.

Grade IV : 난구세포층이 없거나 투명대가 손상되어 있는 것.

## 3. 난포란의 체외성숙

체외성숙 배양액은 25mM의 HEPES가 첨가된 TCM-199 배양액에 10% FBS, 10 $\mu$ g/ml LH (Sigma, U.S.A), 35 $\mu$ g/ml의 FSH(Sigma, U.S.A) 및 1 $\mu$ g/ml의 estradiol-17 $\beta$  (Sigma, U.S.A)을 첨가하여 4-well dish(Nunc, Denmark)에 1ml씩 분주 후 39°C, 5% CO<sub>2</sub>와 98~99% 습도가 유지된 CO<sub>2</sub> 배양기에서 18시간 전 배양으로 평형을 유도하였다. FBS(Gibco, U.S.A)는 56°C water bath에 30분간 비활성화시켜 0.2 $\mu$ m membrane filter(Corning, U.S.A)로 여과한 다음 10ml 씩 conical tube에 분주하여 -20°C에 냉동보관하면서 사용하였다. 체외성숙은 배양액을 4-well dish에 각각 1ml 씩 분주하여 선별

된 난자를 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양으로 체외 성숙을 유도하였다.

## 4. 체외수정

### 1) Swim-up 법에 의한 정자의 준비

체외수정을 위한 동결정액의 준비는 DNA 분석으로 공란우와 동일한 DNA marker를 보유하고 있는 종모우로부터 생산한 동결정액을 사용하였으며, swim-up 방법은 37.5°C의 온수에서 동결정액을 약 15초간 용해 후 12ml conical tube에 분주하여 B.O(-) 배양액 1~2ml를 첨가한 후 500 $\times$ g로 5분간 원심분리를 2~3회 반복 실시하여 상층액을 제거하는 방법으로 동해방지제를 제거하였다. 원심분리후 침전된 정자괴에 다시 B.O(-) 배양액 1ml를 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에 45° 각도로 2시간 동안 정치하면서 swim-up을 유도하였으며, 이때 상층액만을 취하여 B.O(+) 배양액으로 세정하고 마지막 원심분리 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 10~15분간 배양을 실시함으로써 수정능획득을 유도하였다.

### 2) Percoll Gradient 법에 의한 정자의 준비

Percoll density gradient 방법은 heparin(5units/ml)이 첨가된 세척용 sperm-TALP 배양액으로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 15ml conical plastic tube의 아래층에 90% percoll 2ml를 넣고 그 위의 층에 45% percoll 2ml를 두 층이 섞이지 않도록 조심스럽게 부어 놓은 다음, 동결정액 1ml을 tube의 맨 윗층에 넣어 700 $\times$ g로 30분 동안 원심분리시켰다. Percoll에서 침전된 하층액의 정자괴만을 채취하여 500 $\times$ g에서 5분간 2회 반복원심분리 후, 수정능획득을 위하여 BSA(5mg/ml), caffeine(5mM) 및 heparin(10 $\mu$ g/ml)이 첨가된 수정용 IVF-TALP 배양액을 5ml 첨가하여 다시 500 $\times$ g에서 5분간 원심 분리한 후 약 1ml의 수정용 IVF-TALP 배양액을 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 10~15분간 처리하여 수정능획득을 유도하였다.

### 3) 체외수정

성숙이 완료된 난포란은 수정용 B.O(+) 및 IVF-TALP 배양액 100 $\mu$ l drop 당 10~15개씩 넣

은 다음 수정능획득이 완료된 정자를  $1\sim 2 \times 10^6$  sperms/ml 농도로 조정하여 첨가한 후 약 20시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양을 실시함으로써 체외 수정을 유도하였다.

#### 5. 난관상피세포의 준비

도축장에서 채취한 한우의 난관을 penicillin G(500units/ml)와 streptomycin(500units/ml)이 들어 있는 4℃의 생리식염수에 담아 실험실로 운반하여 항생제가 들어있는 생리식염수로 세척한 다음, 결합조직과 지방덩어리를 완전히 제거하고 70% alcohol에서 20초간 소독한 후 생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 난관의 양쪽 끝 부분을 약 1cm 정도를 잘라내었다. TCM-199 배양액 1ml가 들어있는 10ml 주사기로 난관협부에서 누두부쪽으로 관류시킨 다음 핀셋으로 난관을 압착하면서 난관상피세포를 채취하였다. 채취한 난관상피세포는 500×g에서 5분간 원심분리시켜 상층액을 제거하고 나머지 pellet 부분을 2회 이상 세척하여  $1\sim 2 \times 10^6$  cells/ml의 최종농도로 조절하여 48시간동안 배양시켜서 체외수정란과의 공배양에 이용하였다.

#### 6. 체외수정란의 배양

체외수정란은 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액과 HECM-6(Schini와 Bavister, 1988) 배양액으로 4~5회 세척한 다음 난관상피세포와 공배양하거나 난관상피세포가 첨가되지 않은 배양액으로 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 체외배양을 실시하면서 배반포기로의 발달을 유도하였으며, 이때 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였다. HECM-6 배양액을 사용할 경우는 3일간 HECM-6에서 배양한 후 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 옮겨 난관상피세포와 공배양하거나 난관상피세포가 첨가되지 않은 배양액으로 체외배양을 실시하여 배반포기로의 발달을 유도하였다.

7. 체외수정란의 Zona Drilling에 의한 부화율 조사  
배반포기로 발달한 체외수정란의 zona drilling은 Park 등(2001)의 방법으로 실시하였으며, diode laser system (Fertilase, MTM Medical Technology, Switzerland)을 이용하였다. 670nm diode beam과

collimated 1.48  $\mu$ m cw laser beam이 반사경을 통하여 도립현미경으로 운반되어 현미경의 대물렌즈(x400)를 통하여 빛을 방출하는데 빛의 강도는 20~30  $\mu$ s로 조절하여 투과함으로써 zona drilling을 실시하였다.

#### 8. 통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과들의 통계학적 분석은 SAS package의 GLM procedure를 이용하여 각 요인의 유의성 검정을 실시하였다.

### 결과 및 고찰

1. 정자의 처리방법에 따른 체외수정란의 발달  
체외수정을 위하여 동결정액을 swim-up과 percoll 방법으로 정액처리를 하였을 때 체외성숙란의 분할율과 배반포기로의 체외발달율은 Table 1에서 보는 바와 같다.

초음파유래 체외수정란의 분할율은 swim-up과 percoll 방법이 각각 75.0 및 71.4%로써 이들간에 유의적인 차이가 없었으며, 도축장유래 체외수정란의 분할율도 각각 69.9 및 62.2%로써 유의적인 차이가 없었다. 배반포기로의 발달율은 초음파유래 체외수정란이 각각 25.0(swim-up) 및 22.2%(percoll)로써 정자의 처리방법간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 도축장유래 체외수정란의 체외발달율도 각각 29.8 및 28.6%로써 차이가 없었다.

Duszewska 등(2000)은 초음파 유래 난포란을 TALP 수정용 배양액을 사용하여 swim-up 방법으로 체외수정과 체외발달을 실시하였을 때 분할율은 72.18% 였으며, 배반포기로의 발달율은 37.08%로 나타났다고 한 결과는 본 연구결과 보다 높은 성적이었다. Parrish 등(1995)은 체외수정을 위한 정자의 처리 방법을 swim-up과 percoll 방법으로 체외수정을 실시하여 분할율이 각각  $60 \pm 1\%$ 와  $42 \pm 1\%$ 로써 swim-up 방법이 높았으나, 배반포기로의 체외발달율은 각각  $29 \pm 1\%$ 와  $35 \pm 1\%$ 로써 나타나 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다. 조 (1999)도 정자의 처리 방법을 swim-up과 percoll 방법으로 정자를 처리하였을 때 처리 방법에 따른 분할율은 각각 80.2%와 81.9%로써 차이가 없었으

Table 1. Effect of swim-up and Percoll treatment for sperm separation for IVF on subsequent *in vitro* development of Hanwoo embryos

Source of oocytes	Sperm treatments	No. of oocytes used	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos developed to(%)		
				4-cell	Morula	Blastocyst
Slaughterhouse	Swim-up	173	121(69.9) <sup>a</sup>	78(64.5)	41(33.9)	36(29.8) <sup>a</sup>
	Percoll	180	112(62.2) <sup>a</sup>	69(61.6)	39(34.8)	32(28.6) <sup>a</sup>
Ovum pick-up	Swim-up	64	48(75.0) <sup>a</sup>	35(72.9)	23(47.9)	12(25.0) <sup>a</sup>
	Percoll	63	45(71.4) <sup>a</sup>	32(71.1)	20(44.4)	10(22.2) <sup>a</sup>

\* Values with the same superscripts in the same column were not significantly( $P<0.05$ ) different.

며, 배반포기로의 발달에 있어서도 각각 29.2%와 26.5%로써 정자의 처리방법이 분할율과 배반포기로의 발달에 영향을 미치지 않는다고 한 결과는 본 연구결과보다 다소 높은 성적을 나타내었다. 윤 등(1999)도 정자의 처리 방법에 따른 수정란의 분할율에 있어서 percoll(68.2%)과 swim-up(71.8%) 처리방법간에 차이가 없었으며, 상실배기로의 발달율은 각각 29.4%와 20.7%로써 차이가 있었다고 하였다.

이상의 결과를 볼 때 체외수정란의 분할율과 발달율에는 정자의 처리방법이 영향을 미치지 않는 것으로 생각되며, 정소상체미부 정액보다 정자농도가 적은 동결정액을 사용할 경우 활력이 좋은 정액만을 선별해서 체외수정을 실시할 때는 percoll 처리방법이 좋을 것으로 생각된다.

## 2. 초음파유래 난포란의 등급별 체외발달율

초음파유래 난포란을 등급(GI, GII, GIII 및 GIV)별로 분류하여 체외수정을 실시하였을 때 분할

율 및 배반포기로의 발달율은 Table 2에서 보는 바와 같다.

I(GI), 2(GII) 및 3(GIII)등급 난포란의 체외수정 후 분할율은 각각 60.0, 69.2 및 62.1%로써 이들간에 유의적인 차이는 없었으나, 4등급 난포란의 36.2% 보다는 유의적( $P<0.05$ )으로 높았다. 배반포기로의 발달율은 1 및 2등급이 각각 33.3 및 38.9%로써 3 및 4등급의 16.9 및 4.0% 보다는 유의적( $P<0.05$ )으로 높았다.

Chauhan 등(1998)은 buffalo에서 유래한 난포란의 등급(1, 2 및 3 등급)이 체외수정 후 TCM-199에 buffalo 난관상피세포와 공배양을 실시하였을 때 분할율이 각각 85, 54 및 26%로써 등급에 따라서 유의적( $P<0.05$ )인 차이가 있었고, 발달율에 있어서도 1등급이 38% 로써 2등급(20%) 및 3등급(0%)보다 유의적( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다고 하였으며, Reinders와 van Wagendonk-de Leeuw (1996)은 초음파유래 1 및 2등급의 난포란을 체외수정 후 55%의 분할율과 16%가 배반포기 수정란

Table 2. Effect of oocyte grade on cleavage and developmental rates of OPU-derived Hanwoo embryos

Oocyte grade	No. of oocyte used	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos developed to(%)		
			4-cell	Morula	Blastocyst
GI	5	3(60.0) <sup>a</sup>	2(66.6)	1(33.3)	1(33.3) <sup>a</sup>
II	26	18(69.2) <sup>a</sup>	14(77.8)	10(55.5)	7(38.9) <sup>a</sup>
III	95	59(62.1) <sup>a</sup>	36(61.0)	18(30.5)	10(16.9) <sup>b</sup>
IV	69	25(36.2) <sup>b</sup>	10(40.0)	3(12.0)	1( 4.0) <sup>b</sup>
Total	195	105(53.8)	62(59.0)	32(30.5)	19(18.1)

\* Values with the same superscripts in the same column were not significantly( $P<0.05$ ) different.

으로 발달하였다고 하였다. Konishi 등(1996)도 초음파유래 난포란을 등급에 따라 분류하여 체외수정을 실시한 후, granulosa cell로 공배양을 실시한 수정란의 분할율이 각각 51, 54, 44 및 16%로써 등급에 따른 분할율에 유의적( $P<0.05$ )인 차이가 있었으며, 배반포기로의 발달은 1등급과 2등급에서 28%와 31%로써 차이가 없었으나, 3등급(18%)과 4등급(7%)이 유의적( $P<0.05$ )으로 낮게 나타났다고 하였다. 본 연구의 결과도 상기의 성적들과 유사한 수준이었다.

그리고 본 연구 결과에서는 초음파유래 난포란이 도축장유래 난포란과는 달리 3등급에서도 분할율과 발달율이 비교적 높게 나타났다. 이상의 결과로만 본다면 3등급의 난포란도 체외수정란 생산에 이용해도 될 것으로 생각된다.

### 3. 체외배양 체계에 따른 체외수정란의 발달을

체외수정의 배양체계를 확립하고자 체외수정란을 TCM-199와 HECM-6 배양액을 기본 배양액으로 하여 BOEC를 첨가하여 공배양을 실시하여 배반포기로의 체외발달을 유도한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

초음파유래 난포란을 체외수정 후 TCM-199 + FBS10% + BOEC(TFB), HECM-6 3days + TCM-199(HT) 및 HECM-6 3days + TCM-199 + BOEC

(HTB)배양액으로 체외배양을 실시하였을 때 분할율은 각각 68.7, 65.0 및 68.2%로써 유의적인 차이가 없었으며, 도축장유래 체외수정란도 각각 74.5, 82.6 및 80.6%로써 차이가 없었다. 초음파유래 체외수정란의 배반포기로의 발달율은 TFB(25.5%), HT (23.1%) 및 HTB(20.0%)간에 유의적인 차이가 없었다. 도축장유래 체외수정란도 각각 28.9(TFB), 26.3(HT) 및 25.9%(HTB)로서 차이가 없었다.

Kajihara 등(1999)은 도축장유래 체외수정란을 TCM-199, CR1aa 및 USU-6 배양액으로 체외배양을 실시하였을 때 분할율이 각각 63.5, 68.4 및 71.6%로써 차이가 없었으며, 배반포기로의 발달율은 각각 4.6, 9.9 및 2.6%로써 배양액에 따라서 체외발달율이 유의적( $P<0.01$ )인 차이가 있었다고 하였으나, 이러한 결과는 본 연구결과 보다는 다소 낮은 성적이었다. Merton과 Mullaart 등(1999)은 초음파유래 난포란을 TCM-199 + BRL 공배양과 SOFaa + BSA를 첨가하여 공배양을 실시하였을 때 분할율이 각각 60.4%와 61.4%로써 차이가 없었으며, 배반포기로의 발달은 SOFaa 배양액은 17.0%로써 TCM-199 배양액에 BRL 세포의 공배양하였을 때의 14.0% 보다 유의적( $P<0.001$ )으로 높게 나타났다고 하였다. Tavares 등(2000)은 체외수정란의 발달에 있어서 oviductal, granulosa, VERO 및 BRL cells를 공여세포로 하여 공배양을 실시하였

Table 3. Effect of culture media on *in vitro* development of Hanwoo IVF embryos

Source of oocytes	Culture media	No. of oocytes used	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos developed to(%)		
				4-cell	Morula	Blastocysts
Slaughterhouse	TFB <sup>1)</sup>	255	190(74.5) <sup>a</sup>	155(81.6)	80(42.1)	55(28.9) <sup>a</sup>
	HT <sup>2)</sup>	69	57(82.6) <sup>a</sup>	35(61.4)	25(43.9)	15(26.3) <sup>a</sup>
	HTB <sup>3)</sup>	67	54(80.6) <sup>a</sup>	36(66.7)	24(44.4)	14(25.9) <sup>a</sup>
Ovum pick-up	TFB <sup>1)</sup>	80	55(68.7) <sup>a</sup>	38(69.1)	25(45.4)	14(25.5) <sup>a</sup>
	HT <sup>2)</sup>	20	13(65.0) <sup>a</sup>	9(69.2)	6(46.2)	3(23.1) <sup>a</sup>
	HTB <sup>3)</sup>	22	15(68.2) <sup>a</sup>	10(66.7)	7(46.7)	3(20.0) <sup>a</sup>

1) TCM-199 + FBS 10% + BOEC

2) HECM-6 3days + TCM-199

3) HECM-6 3days + TCM-199 + BOEC

\* Values with the same superscripts in the same column were not significantly( $P<0.05$ ) different.

을 때 분할율이 각각 77.6, 65.6, 70.7 및 70.9%로써 유의적인 차이가 없었으며, 발달율에 있어서도 각각 16.3, 13.0, 7.1 및 7.1%로써 공배양 세포가 체외발달에 영향을 미치지 않는다고 하였다.

이상의 결과로 볼 때 소 체외수정란의 체외발달율을 높이기 위해서는 공배양 방법이 바람직한 것으로 생각된다.

#### 4. Laser System을 이용한 배반포기 수정란의 부화율 개선

배반포기 체외수정란의 부화율을 향상시키고자 laser system을 이용하여 zona drilling을 실시하여 부화배반포기 수정란으로 발달한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다.

Laser system으로 zona drilling을 실시한 도축장유래 초기배반포기(EB), 확장배반포기(ExB) 및 초음파유래 확장배반포기 수정란(ExBO)의 부화율은 각각 65.8, 82.9 및 80%로써 초음파유래 확장배반포기 수정란이 가장 높게 나타났으며( $P<0.05$ ), zona drilling을 하지 않은 배반포기 수정란은 각각 25.0(EB) 및 35.7%(ExB)이었는데, zona drilling 한 배반포기 수정란은 zona drilling을 하지 않은 배반포기 수정란에 비하여 부화율이 유의적( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다.

Schmoll 등(1999)은 소 배반포기 수정란의 부화율을 높이기 위해서 laser system으로 zona drilling을 실시하였을 때 24시간 후의 부화율이 92.3%~87.0%로써 zona drilling을 실시하지 않았을 때의 6.7% 보다 매우 높았다고 하였고, Park 등(2001)도 초기 배반포기 및 확장배반포기 소 체외수정란을 laser system으로 zona drilling을 실시하였을 때 부화율이 각각 65.8 및 92.2%로써 zona drilling을 실시하지 않았을 때의 35.8% 보다는 유의적( $P<0.05$ )으로 높았다고 하였다. 김 등(1998)은 소 배반포기 수정란을 laser drilling을 실시하여 부화배반포기로의 발달에 있어서 24시간에는 90%로 발달을 하였으며, 48시간에는 98.0%로 발달하였다고 하였다.

이상의 결과로 볼 때 체외수정란의 부화율을 높이기 위해서는 zona drilling을 실시하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

Table 4. Effect of zona drilling on *in vitro* development of Hanwoo embryos derived from slaughterhouse

Treatment	Stage of embryos	No. of embryos used	No. of hatched blastocysts(%)
Control	Early B	48	12(25.0) <sup>a</sup>
	Expanded B	42	15(35.7) <sup>a</sup>
Zona drilling	Early B	38	25(65.8) <sup>b</sup>
	Expanded B	35	29(82.9) <sup>c</sup>
	Expanded B*	20	16(80.0) <sup>bc</sup>

\* OPU derived embryos.

\*\* Values with the same superscripts were not significantly( $P<0.05$ ) different.

## 적 요

본 연구에서는 DNA marker가 검정된 한우로부터 생산한 체외수정란을 이식하여 육질 및 육량의 유전적 능력이 우수한 한우를 대량생산하여 고품질 한우 쇠고기 생산 시스템을 구축하기 위한 전 단계로서 DNA marker 검정 한우로부터 초음파유도 난포란을 채란하여 체외수정 및 수정란의 체외발달에 미치는 각종 요인들과 배반포기 수정란의 부화율 개선을 위하여 투명대를 laser로 drilling을 실시하여 부화율을 조사하였다.

초음파유래 체외수정란의 분할율은 swim-up과 percoll 방법이 각각 75.0%(48/64) 및 71.4%(45/63)로써 이들간에 유의적인 차이는 없었고, 도축장유래 체외수정란의 분할율도 각각 69.9%(121/173) 및 62.2%(112/180)로써 유의적인 차이가 없었다. 배반포기로의 발달율은 초음파유래 체외수정란이 25.0%(swim-up; 12/48) 및 22.2%(percoll; 10/45)로써 정자의 처리방법간에 유의적인 차이가 없었고, 도축장유래 체외수정란도 각각 29.8%와 28.6%로써 차이가 없었다. 초음파유래 난포란을 등급별로 분류하여 체외수정을 실시하였을 때 1(G I), 2(G II) 및 3(G III)등급 난포란의 분할율은 각각 60.0%(3/5), 69.2%(18/26) 및 62.1%(59/95)로써 이들간에 유의적인 차이는 없었으나, 4등급 난포란의 36.2%(25/69) 보다는 유의적( $P<0.05$ )으로 높

았다. 배반포기로의 발달율은 1 및 2등급이 33.3% (1/3) 및 38.9%(7/18)로써 3 및 4등급의 16.9% (10/59) 및 4.0%(1/25)보다는 유의적( $P<0.05$ )으로 높았다. 초음파유래 난포란을 체외수정 후 TFB, HT 및 HTB 배양액으로 체외배양을 실시하였을 때 분할율은 68.7%(55/80), 65.0%(13/20) 및 68.2% (15/22) 로써 유의적인 차이가 없었으며, 초음파유래 체외수정란의 배반포기로의 발달율은 TFB (25.5%), HT(23.1%) 및 HTB(20.0%)간에 유의적인 차이가 없었다. Laser system 으로 zona drilling을 실시한 EB, ExB 및 ExBO 수정란의 부화율은 각각 65.8%(25/38), 82.9%(29/35) 및 80%(16/20)로써 초음파유래 ExB 수정란이 가장 높게 나타났으며 ( $P<0.05$ ), zona drilling 을 하지 않은 배반포기 수정란은 각각 25.0%(EB; 12/48) 및 35.7%(ExB; 15/42)로서 이들간에 유의적인 차이가 없었다. 그러나 zona drilling한 배반포기 수정란은 zona drilling을 하지 않은 배반포기 수정란에 비하여 부화율이 유의적( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다.

#### 참고문헌

- Bergfelt DR, Lightfoot KC and Adams GP. 1995. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation heifers. *Theriogenology*, 42:895-907.
- Chauhan MS, Singla SK, Palta P, Manik RS and Madan ML. 1998. *In vitro* maturation and fertilization, and subsequent development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: effects of oocyte quality and type of serum. *J. Reprod. Fertil. Dev.*, 10:173-177.
- Duszewska AM, Reklewski Z, Wojdan J, Pienkowski M and Modlinski AJ. 2000. Development of bovine embryos obtained by ovum pick-up, IVM-IVF and IVC on vero/BRL cell monolayers(mixed co-culture). *Theriogenology*, 53:294.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JF and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-152.
- Kajihara Y, Roses G, Lago I, Calvo J, Fila D and Crispo M. 1999. Influence of culture medium on the development of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 51:239.
- Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T and Yazawa S. 1996. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, 45:573-581.
- Loony CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johanson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization(IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
- Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB and Godke TA. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.*, 73:967-974.
- Merton JS and Mullaart E. 1999. Comparison of the effect of two bovine *in vitro* culture systems, TCM199/FCS/BRL-co-culture and SOFaaBSA, on embryo production and pregnancy rate. *Theriogenology*, 51:248.
- Park HS, Jin JI, Hong SP, Lee JS and Jung JY. 2001. Effects of laser drilling on blastocyst hatching and pregnancy rates from *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 55:352.
- Parrish J, Krogenaes J and Susko-parrish JL. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44:859-869.
- Pieterse MC, Kappen EA, Kruip AM and Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes



- during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762.
- Reinders JMC and van Wagendonk-de Leeuw AM. 1996. Improvement of a moët program by addition of *in vitro* production of embryos after ovum pick up from pregnant donor heifers. *Theriogenology*, 45:354.
- Schini SA and Bavister BD. 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.*, 39:1183-1192.
- Schmoll F, Schneider H, Montag M, Rink K, Wimmers K, Tholen E, Ponsuksili S, van der Ven H and Schellander K. 1999. Laser assisted hatching in bovine *in vitro* produced blastocysts. *Theriogenology*, 51:253.
- Stubbings RB and Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrus cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology*, 43:705-712.
- Tavares LMT, Assumpcao MEO, Lima AS, Mello MRB, Missen VLL and Visintin JA. 2000. Development of *in vitro*-matured and fertilized bovine embryo co-cultured with bovine oviductal epithelial cells or granulosa cells, BRL, or VERO cells. *Theriogenology*, 53:302.
- Walton JS, Christie KA and Stubbings RB. 1993. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on bovine ovarian dynamics. *Theriogenology*, 39:336.
- 김은영, 이봉경, 남화경, 이금실, 윤산현, 박세필, 정길생, 임진호. 1998. Laser drilling 처리를 받은 체외생산된 소 배반포기배의 부화율 제고. *한국가축번식학회지*, 22:163-169.
- 윤종택, 노상호, 정연길, 이호준, 한기영. 1999. 소 난자의 체외수정 및 이후 발육에 영향을 미치는 요인들. *한국수정란이식학회지*, 14:23-29.
- 조성근. 1999. 초음파 유도 난포란 채란에 의한 젖소 및 한우의 체외수정란과 송아지 생산에 관한 연구. *경상대학교 박사학위논문*.
- 진종인, 홍승표, 정장용, 이지삼, 박희성. 2000. 젖소에서 초음파기기를 이용한 난자 채취에 있어서 손가락 촉지를 이용한 난포란의 채란. *한국수정란이식학회지*, 15:279-286.

---

(접수일: 2001. 9. 15/ 채택일: 2001. 11. 15)