

한우의 생식세포 보존에 관한 연구

II. PEG 30% FSH 투여가 한우의 체내수정란 생산에 미치는 영향

이명식[†] · 박정준 · 전기준 · 정영훈 · 우제석 · 박수봉 · 임석기 ·
연성흠 · 손동수 · 나기준 · 강만종¹ · 문승주¹
농촌진흥청 축산기술연구소

Studies on Preservation of Germ Cells in Hanwoo

II. Effects of *In Vivo* Embryos Production by PEG 30% FSH in Hanwoo

M. S. Lee[†], J. J. Park, G. J. Jeon, Y. H. Jung, J. S. Woo, S. B. Park, S. K. Im,
S. H. Yeon, D. S. Son, G. J. Na, M. J. Kang¹ and S. J. Moon¹

National Livestock Research Institute, R.D.A.

SUMMARY

The objective of this study was to investigate response of corpus luteum, recovery rate of embryos and production of transferable embryos according to superovulation by PEG 30% FSH in Hanwoo. Cows were selected as recipient, subsequent were superovulated with a total of 400 mg NIH-FSH-P1(Folltropin-V, Canada) given by one shot subcutaneously. At the time of five days after Folltropin injection, 25mg of a PGF₂α was injected and cows were inseminated 12 and 24h after the onset of estrus. Seven days after insemination, embryos were collected non-surgically and were cryopreserved by direct transfer methods.

The results are summarized as follows :

1. Response of corpus luteum following the superovulation in Hanwoo, right ovary were 52.8%(271/513) and left ovary were 47.1%(242/513), respectively (P<0.05).
2. Recovery rate of embryos following the number of corpus luteum were 83.0%(426/513).
3. Mean number of embryos recovered and transferable embryos were 7.74 and 6.43, respectively (P<0.05).
4. In the total number of transferable embryos per flush were collected 6.4 and all saved transferable embryos were 355.

(Key words : superovulation, corpus luteum, ovary, transferable embryos, PEG 30% FSH)

서 론

고급육계통과 다유계통 등 특성이 다른 두 계통의 한우 유전자원을 보존하고자 과배란을 유도하

여 생성되는 황체반응을 조사하였고 이때 반응된 황체수에 비해 회수되어지는 수정란의 효율이 높아야 유전자원의 활용이 극대화될 것이다. 그러나 많은 난자가 회수되었더라도 수정되지 않은 난자

본 연구는 농촌진흥청 대형공동연구사업 연구과제로 수행되었음.

¹ 전남대학교(Chonnam University)

[†] Correspondence : E-mail : leems423@rda.go.kr

와 발달이 지연된 난자가 많이 생산된다고 한다면 동결보존시 생존성이 크게 불량하게 될 것이며, 또한 생존하였다더라도 이식에 따른 수태율에서 좋은 성적을 얻기가 곤란하게 된다. 따라서 과배란에 따른 이식 가능 수정란의 생산수를 증대시키고 정상 발달단계의 수정란을 채란율을 증진시켜야 할 것이다. Thatcher 등(2001)은 과배란 처리에 따른 채란수에 있어서 bST 투여구와 무처리구가 각각 9.3 ± 1.5 개, 9.4 ± 1.5 개로써 차이가 없었으나 bST 투여구에서 미수정란수가 감소하였고 morula stages 보다 blastocyst가 증가하는 경향이었다고 보고하는 한편 Nishigai 등(2002)은 화우에서 동결수정란 이식 1일전에 수란우에게 human chorionic gonadotropin (hCG) 1500IU 투여시 대조구 42.5%에 비해 투여구에서 67.5%로 수태율이 개선되었음을 보고하였다. Dalton 등(2000)에 따르면 건유중인 홀스타인 암소에서 과배란시 인공수정 시간대가 수정란의 질과 수정란 생산수에 미치는 영향을 구명하고자 시험하였을 때 발정주기의 황체기 동안 4일간 점감법으로 FSH를 투여하였으며 투여 마지막 날에 PGF₂α를 투여하고 발정이 관찰된 시점은 평균 $39.4h \pm 7.7h$ 로 나타났고 발정 지속시간은 $13.2 \pm 4.1h$ 이었으며 발정이 나타난 개체는 30두 처리 대비 27 ± 17 이었다. 채란된 난자 529개 중에서 수정된 난자는 0 h에 29%, 12 h에 60%, 그리고 24 h에 81%로 나타났으며 과배란된 암소의 인공수정 시간이 발정개시후 0~12 h에 수정한 그룹보다 24 h에 수정한 구에서 수태율이 높게 나타났고 인공수정 시간이 수정란의 질에 미치는 영향은 없었다고 보고하였다. 최근에는 채란되는 수정란의 생산성을 제고하기 위하여 MGA를 투여하여 발정 동기화하거나(Patterson 등, 1997), Pestivirus를 투여하거나(Kafi 등, 1997) 또는 Follistatin-Vaccine을 투여하는(Singh 등, 1999) 시도가 많이 늘어나고 있으며 한편 Tonhati 등(1999)은 홀스타인 암소에서 과배란의 반복성과 유전력에 미치는 영향을 시험하였으며 과배란에 따른 정액 주입량, 암소의 연령, 그리고 과배란처리 조건이 동일한 상태에서 이식가능한 수정란의 채란 반복성이 0.13으로 매우 낮은 경향이었고 유전력은 0.03으로 추정되었다고 보고하였다. 이러한 결과는 과배란 처리시에 환경

적인 요인이 매우 중요하게 작용하고 있음을 지적하였다. 또한 미래에 있어서 하나의 개체에 대하여 과배란 반응을 예측할 수 있을 가능성이 있음을 시사하였다. 생산성이 높은 도입품종의 수입이 증가하여 한우 유전자원의 멸실위험이 증가하게 되었고 적은 수의 한우집단으로 인하여 근친이 심화되기 쉬우며 유전적 다양성은 감소하게 되는 추세이고 특히 외래질병 유입의 위험성은 높아졌으므로 보존가치가 높은 수정란을 확보하기 위해서 한우의 과배란 처리에 따른 난소의 반응과 채란에 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

다배란을 처리하여 수정란을 생산하고 저장하기 위해서 선발된 공란우는 다유형 또는 고급육형으로써 고급육계통은 육질에 대한 육종가 상위 20% 이내의 자손에서 외모심사 등에 결격사유가 없는 개체를 선발하여 공란우로 공시하였고 다유형은 어미의 유량을 측정하거나 또는 어미의 이유시 체중을 기준으로 육종가 상위 20% 이내의 종빈우 중에서 성장발육의 충실도 및 외모심사의 결격사유가 없으며 또한 법정 전염병 검진 결과 정상인 개체에서 공란우를 선발하였으며 연령은 2세에서 10세에 이르기까지 다양하였다. 따라서 본 시험에서는 고급육계통 27두와 다유계통 28두 등 총 55두의 공란우를 선발하여 공시하였다.

2. 다배란처리방법

다배란처리용 PEG 30% FSH 1회 투여제제의 제조는 Polyethyleneglycol(PEG, Fisher Biotech, U.S.A : M.W. 800) 3g을 생리적 식염수 10ml에 용해하여 PEG 30%(W/V) 용액을 만들고, Folltropin-V(Vetrepharm, Canada)를 생리식염수 1ml에 용해한 후 Folltropin-V 1ml와 PEG 30%용액 9ml를 혼합하여 잘 섞은 후 사용하였다. 공란우의 다배란처리방법은 발정 발견후 11일째에 PEG 30% FSH 용액을 견갑부에 1차 피하주사하고 48시간후에 PG-F₂α (Lutalyse, Upjohn) 25ml을 근육주사하며 다시 48시간후 발정을 확인하여 발정이 확인된 개체는

각각 12시간후와 24시간후에 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시하였다.

3. 수정란회수 및 검사

수정란의 회수는 7일차에 실시하였으며 관류액은 Vigro(Pullman,USA) 1000ml를 사용하였고 채란전에 좌우 난소에 존재하는 황체수를 조사하였으며 채란이 끝난 후에는 PGF_{2α} 25ml(Lutalyse, Upjohn)를 근육주사하여 미채란 수정란의 착상을 방지하였다. 채란이 끝나고 회수된 관류액은 10분 이내 실험실에 도착하여 실체현미경 위의 37℃ Warm plate에서 조사하였으며 발달 단계가 지연되지 않으며 세포질의 윤곽이 뚜렷한 수정란을 1등급으로, 세포질의 표면에 1~2개의 debris가 존재할 때 2등급으로, 3개 이상의 debris가 존재할 때 3등급으로 판정하였고 회수된 수정란은 D-PBS액에서 신속히 5회 이상 세척하였다.

4. 수정란의 동결보존

수정란의 동결액은 D-PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco)액에 10%의 FCS(우태아혈청, Gibco)를 첨가하고 1.8M Ethylene glycol을 항동해제로 사용하였으며 0.22μm acro disk로 여과하는 방식으로 멸균하여 사용하였고 수정란 동결은 0.25ml plastic straw(IMV, France)를 E·O Gas로 멸균하고 사용직전에 동결배양액으로 1~2회 흡인, 제거하는 방식으로 세척한 후에 수정란을 적체하였으며 동결방법은 완만동결방식으로 상온에서 -6℃까지 분당 1℃씩 하강하고 -6℃에서 자동 식빙을 하였으며 10분간 평형한 후 -35℃까지 분당 3℃씩 하강하여 -35℃에 도달하면 액체질소에 침지하여 보존하였다.

결과 및 고찰

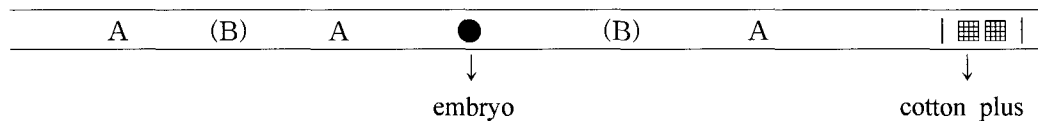


Fig. 1. Diagrammatic representation with loading of embryo for freezing.
A : cryoprotective solution, B : air bubble column

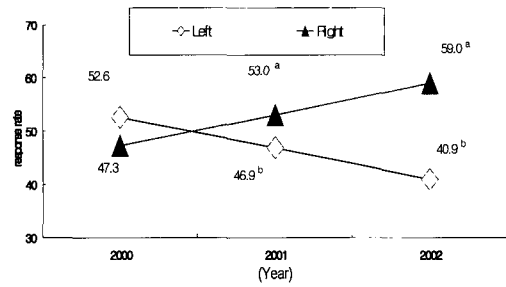


Fig. 2. Response of corpus luteum following superovulation in Hanwoo.

^{a,b} Means with different superscript are significant different(P<0.05)

1. 황체의 반응과 수정란의 채란율

과배란처리에 따른 좌우측 난소의 황체 생성율은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 좌측난소 평균 47.1%(242/513)에 비하여 우측난소의 평균이 52.8%(271/513)로써 우측의 반응이 유의적으로 높게 나타나는 경향이였다. 임 등(2000)은 한우에서 과배란 처리시 FSH 종류에 따른 황체 반응수가 FSH-P 투여구에서 5.48±1.90개, Super-ov 투여구에서 2.27±2.60개, Folltropin-v 투여구에서 10.33±1.57개로써 본 연구에 비하여 대체적으로 황체의 반응이 낮게 나타났음을 보고하였으며, 또한 FSH 제제에 따른 반응의 차이는 LH가 포함된 함량이 적을수록 반응이 높게 나타나는 경향이였다.

연도별 회수 수정란수와 이식 가능 수정란수는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 2000년도에 각각 7.45개와 5.55개, 2001년에 8.57개와 7.42개 그리고 2001년도에 7.12개와 6.37로써 회수 수정란수와 이식가능 수정란수에 있어서 연도별로 다소 감소하는 경향이였다. Yaakub 등(1998)은 육우에서 농후사료를 일일 3kg 급여한 구와 자유채식 시킨 구에서 과배란 처리하였을 때 전체 회수 수정란수는 각각 9.5±0.9개와 6.5±0.9개로써 본 연구의 7.12

~8.57개의 유사한 경향을 보였으나 이식가능 수정란 채란수에 있어서는 각각 4.8 ± 0.7 개와 2.8 ± 0.4 개로써 본 연구의 5.55~7.42개보다는 전반적으로 다소 낮은 성적을 보고하였으며 특히 공란우의 살전 정도가 심해질 경우 수정란 생산성이 저하되는 경향이 뚜렷하였음을 보고하였고 다른 시험에서 미경산 육우의 사료급여를 고영양과 중등 영양 수준으로 급여하였을 때 난포의 생성수가 각각 12.8개와 20.3개로써 과비는 난포의 발달을 저하시킬 수 있음을 보고한 바 있다(Nolan 등, 1998).

Shyam 등(2002)은 과배란 반복처리에 따른 수정란 생산성 조사에서 회수된 수정란 총수와 이식가능 수정란 수가 각각 9.4개와 4.5개로써 회수된 수정란수는 본 연구의 7.12~8.57개보다 다소 높은 반면 이식 가능 수정란 수에 있어서는 오히려 본 연구의 5.55~7.42개보다는 다소 낮은 생산율을 보여 상반된 결과를 얻었으며 이러한 원인은 채란회수가 빈번하여 반복채란에 따른 내성과 과배란처리 방법의 차이에 기인한 것으로 사료된다.

2. 이식가능 수정란의 채란수와 생산수

공란우의 연령에 따른 이식 가능 수정란의 생산능력 조사는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 임 등(2000)은 한우에서 3세 이하에서 3.25개, 4세에서 3.45개, 5세에서 5.27개, 6세에서 3.08개, 7세에서 4.00개, 8세에서 2.78개 그리고 9세 이상에서 3.94개가 채란되어 연령이 증가할수록 채란율이 떨어진다고 보고하였고 김 등(1997)도 산차가 증가할수록 채란 수정란수가 떨어진다고 보고한 반면

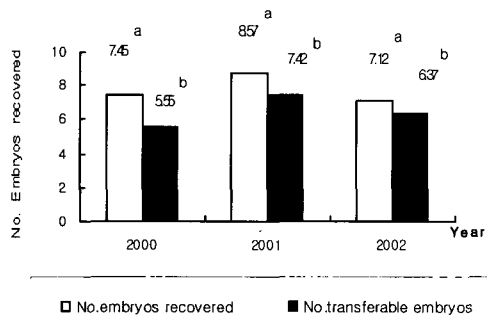


Fig. 3. Mean number of embryos recovered and transferable embryos on a yearly basis.

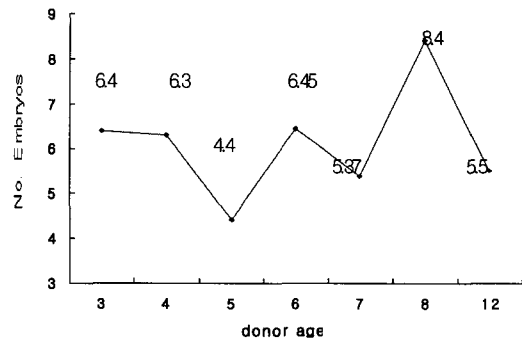


Fig. 4. Mean number of transferable embryos recovered following the age of donor.

Tonhati 등(1999)은 1세에서 6.09개, 2세에서 5.72개, 3세에서 6.57개, 4세에서 6.54개, 5세에서 5.67개, 6세에서 6.06개, 7세에서 5.82개, 8세에서 6.11개 그리고 9세에서 5.46개가 채란되어 연령이 채란에 미치는 영향은 없었다고 보고하였으며, 젖소의 연령별 채란시험에서 공란우의 나이가 3~9세의 범위에서는 이식가능 수정란수의 회수성적에 차이가 없었고(김 등, 1997), 본 연구에서도 3세에서 6.4개, 4세에서 6.3개, 5세에서 4.4개, 6세에서 6.45개, 7세에서 5.37개, 8세에서 8.4개 그리고 9세 이상에서 5.5개로써 유사한 성적을 얻었으나 본 연구의 채란성적의 차이가 다소 크게 나타난 것은 다배란 처리시 사용된 PEG 30% FSH 제제의 투여에 따른 흡수에 있어서 차이가 나타난 것으로 사료된다.

다유 및 고급육계통의 한우 공란우로부터 채취한 수정란의 생산량은 Table 1과 같다. 다유계통의 한우 종빈우 28두에서 이식가능한 수정란 174개를 생산하였고, 고급육계통의 한우 종빈우 27두에서 이식가능한 수정란 181개를 생산하여 총 355개의 수정란을 동결보존하였다.

Thatcher 등(2001)은 과배란처리에 따른 수정란 채란성적에 있어서 총 채란수는 9개였고 그중에서 이식가능란의 수는 5개라고 하였고, Moreira 등(2002)은 총 채란된 수정란수는 7.4개 그리고 이식가능란의 수는 5.4개로써 본 연구에서 얻어진 채란된 수정란수 8.7개와 이식가능란의 수 6.4개보다 다소 적은 성적을 보고하였다. 한편 Hasler 등(1987)은 각각 10.5개 및 7.5개로써 다소 많은 수정란을

Table 1. Production of embryos according to line in Hanwoo

Line	No. of donors	Stage				No. of embryos transferable
		Morula	Blastocyst	Deg	Total	
HMQ	27	114	67	18	199	6.70
MM	28	105	69	37	211	6.21
Total or Average	55	219	136	55	410	6.45

HMQ : High Meat Quality Line, MM : Much Milk Line.

채란하였음을 보고하였고 이는 계절, 품종, 비유, 공란우의 상태 등 다양한 요인에 의해 개선될 수 있음을 시사하였다.

결론적으로 한우에서 PEG 30% FSH 1회 투여에 따른 과배란 처리법은 과배란 반응과 수정란의 채란수에 있어서 FSH 점감법 또는 동량투여법에 비하여 처리에 소요되는 노동력을 경감시킬 수 있었으며 또한 이식 가능 수정란의 채란 성적에 있어서도 유사한 성과를 얻을 수 있으므로 한우에서 수정란 채란에 적절히 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

한우의 수정란을 보존하기 위하여 고급육계통과 다유계통의 공란우를 선발하여 과배란처리에 따른 황체의 반응, 황체수에 대한 채란된 수정란의 수 그리고 채란 수정란수에 대한 이식가능한 수정란 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 다유계통의 공란우는 이유시 체중에 대한 육종가 상위 20%이내, 고급육 계통의 공란우는 육질에 대한 육종가 상위 20%이내의 중빈우를 선발하였다. 과배란처리 방법은 발정후 11일차에 PEG 30% FSH를 견갑부에 피하주사로 1회 투여하고 13일차에 PGF_{2a} 25 mg을 투여하였으며 15일차와 16일차에 각각 2회씩 인공수정하였고 23일차에 채란하였다. 과배란처리에 따른 황체의 반응은 좌축난소가 47.1% (242/513), 우축난소가 52.8%(271/513)로써 우축의 반응이 좋게 나타났고 황체의 반응과 비교하여 채란된 수정란의 회수율은 79.9%(410/513)로 나타났다. 회수된 수정란 중에서 이식이 가능한 수정란은 86.5%(355/410)이었고 수정란의 발달단계에 있어

서 상실배는 61.6%(219/355), 배반포는 38.3% (136/355)로 나타났으며 두당 이식가능란 생산수는 6.4개였다.

참고문헌

- Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftinger M and Saacke RG. 2000. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J. Anim. Science*, 78:2081-2085.
- Hasler JF, Mccauley AD, Lathrop WF and Foote RH. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27(1):139-168.
- Im SK, Jean GJ, Park SB, Woo JS, Choi JG, Yeon SH and Yoon SB. 2000. Factors affecting on *In Vivo* embryo production in Hanwoo. *Korean J. Ani. Sci.*, 15(2):181-190.
- Kafi M, McGowan MR, Kirkland PD and Jillella, D. 1997. The effect of bovine pestivirus infection on the superovulatory response of friesian heifers. *Theriogenology*, 48:985-996.
- Moreira F, Badinga L, Burnley C and Thatcher W W. 2002. Bovine somatotropin increases embryonic development in super-ovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, 57(4):1371-1387.
- Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T and Kaneda Y.

2002. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of HCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 58(8):1597-1606.
- Nolan R, O'Callaghan D, Duby RT, Lonergan P and Boland MP. 1998. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology*, 50:1263-1274.
- Patterson DJ, Nieman NM, Nelson LD, Nelson C F, Schillo KK, Bullock KD, Brophy DT and Woods BL. 1997. Estrus synchronization with an oral progestogen prior to superovulation of postpartum beef cows. *Theriogenology*, 48:1025-1033.
- Shyam, Zawar, Mishra UK and Gaswade PG. 2002. Successful superovulation and recovery of embryos in repeat breeding crossbred cows. *Korean J. Emb. Trans.*, 17(3):235-238.
- Singh J, Brogliatti GM, Christensen CR and Adams GP. 1999. Active immunization against follistatin and its effect on FSH, follicle development and superovulation in heifers. *Theriogenology*, 52:49-66.
- Thatcher WW, Moreira F, Santos JEP, Lopes FL, Pancarci SM and Risco CA. 2001. Effects of Hormonal Treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55:75-89.
- Tonhati H, Lobo RB and Oliveira HN. 1999. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. *Theriogenology*, 51:1151-1156.
- Yaakub H, O'Callaghan D and Boland MP. 1998. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*, 51:1259-1266.
- 김일화, 손동수, 이호준, 이동원, 서국현, 류일선, 양병철, 이광원, 고문석. 1997. 젖소 수정란의 생산에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 12(1):103-110.
- 김홍률, 김덕임, 박노형, 김창근, 정영채, 윤종택, 전광주. 1997. 한우에서 FSH-P와 SUPER-OV에 의한 체내 수정란 생산에 관한 연구. II. 공란우의 조건에 따른 체내 수정란 생산에 영향을 미치는 요인. *한국수정란이식학회지*, 12(1):49-56.
- 임석기, 전기준, 박수봉, 우제석, 최재관, 연성흠, 윤상보. 2000. 한우에서 체내수정란 생산에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 15(2):181-190.

(접수일: 2003. 7. 1/ 채택일: 2003. 8. 2)