

소 성판별 수정란 생산을 위한 체외수정란 할구 분리 연구

이세영^{1*}, 고응규¹, 조상래¹, 이재영¹, 김찬란¹, 김성우²

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터, ²농촌진흥청 국립축산과학원 한우연구소

Studies on *in vitro* Embryo Splitting as a method for Bovine Embryonic Sexing

Se Young Lee^{1*}, Yeoung-Gyu Ko¹, Sang-Rae Cho¹,
Jae-Yeong Lee¹, Chan-Lan Kim¹, Sung Woo Kim²

¹Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA

²Hanwoo Research Institute, National Institute of Animal Science, RDA

요약 본 연구는 소 2, 4, 8세포 단계 초기 수정란의 할구를 분리하여, 할구 일부는 성판별 등 유전자 검사에 활용하고, 일부는 배양하여 배반포를 생산하고 이식하기 위한 연구의 기초자료를 확보하기 위해 수행되었다. 도축 난소에서 난자를 회수하여 체외수정란을 생산한 뒤, 체외수정 26시간, 50시간 후 2~8세포기의 초기 수정란을 선별하여 공시하였다. 수정란에 0.1% pronase를 처리하여 투명대를 제거 후 pipetting하여 할구를 분리하였고, 할구는 7~8일간(IVF=day 0) 배양하여 수정란 분리시기 및 발달 단계별로 할구의 분할율, 배반포 발달율, 배반포의 총 세포수를 조사하였다. 할구의 분할율은 체외수정 26시간 후에 분리한 2, 4세포기 유래 할구가 각각 83.3%, 69.1%로, 50시간 후의 2, 4세포기의 할구 28.5%, 18.1%에 비해 높았고($p<.01$), 배반포 발달율은 26시간 후에 분리한 2세포기의 할구가 36.1%로 가장 높았다($p<.01$). 발달된 배반포를 3.7% paraformaldehyde에 고정 후 DAPI(4', 6-diamino-2-phenylindole)시약으로 핵 염색하여 총 세포수를 조사한 결과, 할구에서 유래한 배반포 모두 분리시기에 관계없이 대조군 99개에 비해 적은 세포수를 보였다($p<.01$). 본 연구를 통해 할구분리는 체외수정 26시간 후의 2 세포기의 수정란을 활용했을 때, 배반포 발달율이 36.1%로 가장 유리한 것으로 확인되었다. 따라서, 착상 전 수정란의 성판별이나 유전자 검사시, 2 세포기 수정란을 분할하여 각각 배반포생산, PCR 등으로 이용하는 것이 효율적인 것 보인다. 또한 향후 할구분리 기술을 활용해 배반포를 생산하고 이식하여 성(性) 선택적 산자를 생산하기 위해서, 할구 유래 배반포의 총 세포수 증가를 위한 지속적인 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

Abstract This study was conducted as basic research into producing blastocysts using embryo splitting technology and subsequently subjecting BTMs (blastomeres) to genetic testing, including sex determinations. *In vitro* fertilized (IVF) embryos were produced from the ovaries of slaughtered cows. 26 and 50 hours after IVF, 2-8 cell stage embryos were selected, treated with 0.1% pronase to remove the zona pellucida, and split by pipetting. BTMs were cultured for 7 to 8 days (IVF=day 0). Blastomere cleavage and development rates and total cell numbers were investigated with respect to the time of embryo splitting and embryonic developmental stage. BTM cleavage rate was significantly higher in BTMs (SB) from 2-cell (83.3%) and 4C-SB (69.1%) splits at 26 hours after IVF than in 2C-SB (28.5%) and 4C-SB (18.1%) splits at 50 hours ($p<.01$). The blastocyst developmental rate was significantly higher from 2C-SB (36.1%) splits after 26 hours ($p<.01$). After fixation in 3.7% paraformaldehyde, total cell numbers were counted by DAPI staining. Significantly fewer blastocysts were derived from BTMs than untreated blastocysts (control). This study confirms that the 2-cell stage 26 hours after IVF is the most efficient stage for the production of sex-specific embryos. Additional research is needed to increase the total cell number of blastocysts derived from BTMs.

Keywords : Bovine, Embryo Splitting, Blastomere Developmental Rate, Sex Determination

본 논문은 농촌진흥청 고유연구사업(PJ01488102)지원에 의해 수행되었음.

*Correspondence : Se Young Lee(National Institute of Animal Science)

email: sylee251@korea.kr

Received September 22, 2023

Revised November 2, 2023

Accepted November 3, 2023

Published November 30, 2023

1. 서론

각국의 품종과 멸종위기종을 유지하고, 유전적으로 우수한 가축의 생산을 최대화하기 위해 체외수정란 생산, 수정란이식 등 동물 번식기술은 수십년동안 과학적, 기술적으로 발전되어왔다. 전 세계적으로 소의 체외생산 후 이식되는 배아는 연평균 12%의 성장율로 계속 증가하고 있으며, 국제수정란이식학회(IETS : International Embryo Transfer Society)는 2016년도에 역사상 처음으로 체외생산 배아의 수가 체내생산 배아의 수를 넘어섰다고 보고하였다[1].

체외수정란 생산과 수정란 이식의 효율이 증대됨에 따라, 원하는 성(性)의 자손을 선택적으로 이식하기 위한 성판별 기술이 각광받고 있다[2]. 특히 소에서 성판별은 농가소득과 직접적으로 연결되어있을 뿐 아니라, 가축의 검정사업에도 효과적으로 이용될 수 있어, 성판별 기술은 농가 소득 증진과 특정 유전자원 유지 등 산업적인 효과를 향상시키는 방법으로 매우 중요한 의미를 가지고 있다[3].

배아의 성판별을 위해 X, Y 정자를 분리한 뒤, 선택적으로 인공수정하는 연구가 진행되었으나[4], 성감별 정액의 수정능획득 및 수정란 발달능력이 현저히 낮은 문제점이 보고되었다[5]. 정자를 이용한 성판별은 번이가 심한 반면, 수정란을 활용한 성판별 방법은 체외수정 기술과 micromanipulator 사용 등 미세조작기술의 발달로 크게 개선되어 많은 연구가 이뤄지고 있다[3,6].

수정란 성판별을 위해 수정란에서 ICM(inner cell mass)은 피하고, TE(trophectoderm)의 일부 할구만을 생검(biopsy)하는 기술은, 착상 전 수정란에서 1개 또는 수 개의 세포를 분리해 내는 방법이다. Biopsy는 morula 단계에서 투명대에 acid tyroid's를 처리하여 구멍을 생성하고 이를 통해 흡인 피펫에 의해 할구를 분리하는 방법과[7], 상실매기 수정란의 투명대에 slit을 낸 후 배양하여 배반포단계로 진행하면서 빠져나오는 할구를 자르는 press-out 방법이 있다[8]. 이때, 많은 양의 할구를 분리하게 되면 수정란의 생존율에 영향을 줄 수 있어, 분리하는 할구의 양이 수정란의 생존성에 중요한 요인이 된다[9]. 이렇게 분리한 할구로 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 양성 특이적 DNA 서열을 증폭하고 검출한다. 이는 성별 결정에 비교적 정확하다고 알려져 있으나 정확도는 90%로, biopsy단계에서 cell damage를 최소화 하기 위한 적은 양의 샘플채취로 인해 배아 DNA가 불충분할 수 있으며

[10], 분리과정에서 세포손상이 우려되는 단점이 보고되고 있다[7]. 또한, 수정란의 성판별 방법은 micromanipulator와 같은 고가의 장비와 숙련된 전문가의 기술을 필요로 하기 때문에[10], 경제적 활용성 등의 이유로 수요가 감소하여 산업화된 기술로 발전시키기 어렵다고 보고되고 있다[10,11].

복제 가축생산을 위한 비핵이식법의 일종인 수정란 할구분리법은, 초기 수정란 단계에서 배아를 2, 4 심지어 8개의 세포로 분리한 후, 개별적으로 배양하여 유전적으로 동일한 개체를 생산하는 생식 복제의 접근법으로서, 질병조사 등 유전자진단의 가능성을 높이고, 불임치료, 유전자 치료 등 생식 의학연구에 활용할 수 있는 기술이지만 연구가 미진한 수준이다[7].

본 연구에서는 소 초기수정란 할구분리 기술을 활용하여 이식가능한 수정란을 생산하고, 나머지 할구는 성판별 등 유전자 검사에 활용하기 위한 기초 연구로서, 수정란 분리시기와 발달단계에 따른 할구의 분할율, 배반포 발달율, 배반포의 총 세포수를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 난자의 체외성숙

난자회수를 위해 도축장에서 회수한 난소를 100 U/ml penicillin과 100 ug/ml streptomycin이 첨가된 생리 식염수(35~37℃)가 담긴 보온병에 담아 5시간 이내 실험실로 운반하였다. 직경 2.0~6.0 mm 난포로부터 18 G 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 난자를 흡입, 회수하였다. 회수된 난포내용물 중 균일하게 부착되어 있는 난자-난구세포 복합체(COCs : cumulus-oocyte complexes)만을 골라 배양하였다. TCM-199(Gibco)을 기본배양액으로하여 10% FBS(Gibco), 7 µg/ml FSH(Vetoquinol USA Inc), 500 IU/ml hCG (Intervet International BV), 0.2 mM sodium pyruvate (Sigma), 0.785 ml L-cysteine(Sigma)를 첨가한 후 38℃, 5% CO₂ 조건으로 22시간 동안 체외성숙 배양하였다[12].

2.2 정자준비 및 체외수정

체외수정을 위해 난구세포가 잘 확장된 성숙난자를 선별하였다. 정액은 KPN 동결정액을 사용하였다. 37℃에서 1분간 동결정액을 용해하고 TALP(tyrodé's albumin-lactate pyruvate, Sigma) 용액에 10 ug/ml heparin

(Sigma), 5 mM caffeine(Sigma), 1.387 mM D-glucose(Sigma), 6 mg/mL BSA(Sigma)이 첨가된 으로 시약으로 세정한 뒤, 307G에서 6분간 원심분리 후 같은 방법으로 1회 추가 washing하였다. 정자는 같은 용액에 1×10^6 개/ml 농도로 조정하여 준비하였고, 38°C, 5% CO₂ 조건에서 약 6시간동안 체외수정을 실시 하였다. 수정란은 CR1 배양액에 아미노산을 첨가하여 변형시킨 mCR1aa 배양액(MK biotech, Korea) 100 ul droplet에 옮겨, 38°C, 5% CO₂, 5% O₂ 조건에서 할구분리 전까지 체외 발생을 유도하였다[12,13].

2.3 초기배 할구 분리 및 배양

체외수정 26시간, 50시간 후에 적정크기의 2, 4, 8세포기의 초기 수정란을 선별하여 공시하였다. 할구분리는 다음과 같이 실시하였다. 먼저, Gwatkin[14]가 제시한 방법에 따라 pronase(Roche)를 활용하여 0.1% pronase 용액을 제조하고, 공시된 수정란을 0.1% pronase 50 ul droplet에서 1분~1분 30초간 정치하였다. 그리고 투명대의 형태가 변형되었을 때 빠르게 50 ul droplet의 Ca²⁺ Mg²⁺-free PBS로 옮겨 조심스럽게 pipetting하여 투명대를 분리하고, 2차례 washing하였다. 투명대가 제거된 할구세포를 37°C hot plate에서 CR2 배양액 50 ul droplet에 5분간 정치하여 서로 붙어있는 할구세포들을 이완한 후, 직경 135um의 denuding micropipette (denupet, Germany)을 이용하여 조심스럽게 pipetting하여 할구를 분리하였다(Fig. 1a). 이때, 4~8-cell의 세포들은 여러 개의 할구가 붙어있는 Fig. 2b와 같이 multi blastomere형태로 분리하였고, 1개의 blastomere로 count하였다. 분리된 할구는 CR2 배양액(MK biotech, Korea) 100 ul에서 38°C, 5% CO₂, 5% O₂조건에서 7~8일간 배양하였고, Tagawa[15]가 제시한 방법에 따라 하나의 수정란에서 유래된 자매 할구들은 함께 배양 하였다(Fig. 1).

2.4 배반포 발달을 분석 및 총 세포수 조사

분리된 할구의 체외발생을 유도하기 위해 체외수정 후 7~8일까지 배양을 실시하고, 배반포 발달을 및 총 세포수를 조사하였다. 배반포는 3.7% paraformaldehyde에 1시간동안 정치하여 고정한 다음, PBS에 washing 후 DAPI(4', 6-diamino-2-phenylindole, Sigma)시약을 이용하여 핵염색을 실시하였다. 형광현미경(Nikon Ti-U, Japan)하에 총 세포수를 직접 count 하였다.

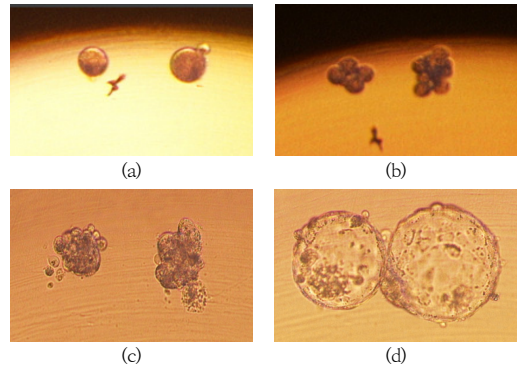


Fig. 1. *In vitro* development BTMs derived from of 2 cell bovine embryo (a) Split BTMs from 2 cell (2C-SB) after 26h of IVF (day 1), (b) 2C-SBs cultured for 2 days, (c) 2C-SBs cultured for 6 days, (d) 2C-SBs cultured for 8 days (IVF = day 0)
*(a),(b) magnification is 4×, (c),(d) is 10×

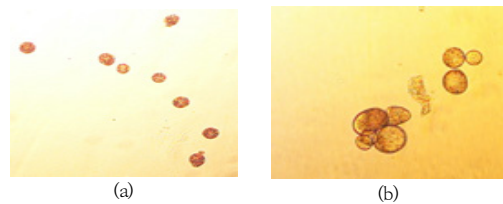


Fig. 2. Split BTMs from 8 cell (a) Individually split BTMs, (b) Multiple split BTMs
*Magnification is 4×

2.5 통계 분석

실험에서 수행된 통계분석은 SAS GLM을 이용한 분산분석을 실시하였다. 할구의 분할율, 배반포 발달율 및 총 세포수의 평균간 유의성 검증은 Duncan의 다중검증법(Duncan's multiple range test)으로 분석을 실시하였다. *p*-값이 0.01보다 낮은 실험군은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

3. 결과

3.1 수정란 할구 분리시기, 발달단계에 따른 할구의 분할율 분석

체외수정 26시간, 50시간 후에 분할된 할구의 분할율(cleavage rate)을 수정란 발달단계에 따라조사하였다 (Table 1). 체외수정 26시간 후 분리된 할구(그룹 1)의

Table 1. *In vitro* cleavage rate and developmental rate of split BTM in relation to embryo cell stage and split time

Group*	Stage of BTMs**	No. of embryos used	No. of BTMs used	No. of BTMs cleaved(%)	No. of blastocysts developed(%)
1	2C-SB	38	72	60(83.3%) ^a	26(36.1%) ^a
	4C-SB	44	136	94(69.1%) ^a	22(16.1%) ^b
	8C-SB	20	78	46(58.9%) ^{ab}	5(6.4%) ^b
2	2C-SB	7	14	4(28.5%) ^{cd}	0
	4C-SB	8	22	4(18.1%) ^d	0
	8C-SB	43	168	70(41.6%) ^{bc}	14(8.3%) ^b

*Group 1 : split after 26 hours of IVF, Group 2 : split after 50 hours of IVF

** BTM, blastomere: 2C-SB, split BTM from 2-cell; 4C-SB, split BTM from 3~4-cell; 8C-SB, split BTM from 5~8-cell;

^{a-c}Means in the same columns with different superscripts differ($p < .01$)

발달을 조사를 위해 사용된 수정란은 102개, 체외수정 50시간 후 분리된 할구(그룹 2)의 발달을 조사를 위해 58개의 수정란을 사용하여, 총 160개의 수정란을 사용하였다.

그룹 1에서 2-cell 수정란에서 분리한 할구(2C-SB) 72개를 배양했을때, 정상적인 분할을 보인 할구는 60개로 할구의 분할율은 83.3%로 나타났고, 3~4-cell 수정란에서 분리한 할구(4C-SB) 136개 중 정상적인 분할을 보인 할구는 94개로 69.1%, 그리고 5~8-cell 수정란에서 분리한 할구(8C-SB) 78개 중 46개가 정상분할하여 58.9%의 분할율을 보였다. 그룹 2에서는 2C-SB 14개 중 4개가 분할하여 28.5%, 4C-SB 중 4개가 분할하여 18.1%, 그리고 8C-SB 168개중 70개가 정상 분할하여 41.6 %의 분할율을 보였다. 할구의 분할율은 그룹 1의 2C-SB, 4C-SB가 유의적으로 높게 나타났다($p < .01$).

3.2 수정란 할구 분리시기와 발달단계에 따른 배반포 발달율 분석

체외수정 26시간, 50시간 후에 분할된 할구의 배반포까지의 발달율을 조사한 결과는 다음과 같다(Table 1).

그룹 1에서 2C-SB 72개 중, 배반포로 발달된 할구는 26개로 36.1%의 배반포 발달율을 보였다. 4C-SB는 136개 중 22개로 16.1%, 8C-SB는 78개 중 5개가 배반포로 발달하여 6.4%로 나타났다. 그룹 2에서는 2S-CB, 4S-CB 각각 4개가 분할과정을 거쳤으나, 배반포까지 발달하지 못하였다. 8S-CB는 168개 중 14개가 배반포로 발달하여 8.3%의 발달율을 보였다.

배반포 발달율은 그룹 1의 2C-SB가 다른 단계의 할구보다 유의적으로 높게 나타났으며($p < .01$), 그룹 2에서는 8C-SB만 배반포단계까지 발달하였고, 2C-SB, 4C-SB 중 배반포까지 발달한 할구는 없었다.

3.3 수정란 할구 분리시기, 발달단계에 따른 할구 유래 배반포 총 세포수 분석

할구 유래 배반포의 총 세포수 분석을 위해, 체외수정 후 7~8일간 체외배양한 배반포를 3.7% paraformaldehyde로 고정시킨 후 DAPI 시약으로 핵염색하여 총 세포수를 직접 count하였다. 대조구의 배반포는 0.1% pronase로 처리하여 투명대를 제거한 후, 같은 방법으로 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이, 총 세포수는 대조구 배반포에서 99±13개, 그룹 1의 2C-SB 47±15개, 4C-SB 38±10개, 8C-SB 43±25개였고, 그룹 2의 8C-SB 22±4개로, 대조구 배반포에 비해 할구 유래 배반포는 분리시기 및 발달단계에 관계없이 총 세포수가 모두 유의적으로 낮았다($p < .01$). 그룹 1 내 수정란 발달단계별 세포수의 유의적인 차이는 없었고 8C-SB 유래 배반포의 세포수는 그룹 1이 그룹 2보다 더 높았다($p < .01$).

Table 2. Mean(±SD) total cell number of blastocyst derived split bovine embryo

Group*	Stage of BTMs**	No. of used blastocysts	Total cell number
Control		3	99 ± 13 ^a
1	2C-SB	13	47 ± 15 ^b
	4C-SB	9	38 ± 10 ^{bc}
	8C-SB	2	43 ± 25 ^b
2	2C-SB	-	-
	4C-SB	-	-
	8C-SB	9	22 ± 4 ^c

*Group 1 : split after 26 hours of IVF, Group 2 : split after 50 hours of IVF; ** BTM, blastomere: 2C-SB, split BTM from 2-cell;

4C-SB, split BTM from 3~4-cell; 8C-SB, split BTM from 5~8-cell;

^{a-c}Means±SD in the same columns with different superscripts

differ($p < .01$)

4. 고찰

초기 수정란 할구세포 분리를 활용한 연구는 실용적 측면보다는 발생생물학적인 분야로 여겨져왔고, 경제적 활용성 등의 이유로 연구가 미진한 수준이다. 할구 분리 기술은 할구를 개별로 나누고 배양하여, 유전적으로 동일한 개체를 생산하는 생식복제의 접근법으로, 성판별, 유전자검사, 복제 가축생산 등 산업적으로 활용할 수 있다. 특히, 초기 단계의 수정란의 할구를 분리하여 배양할 경우, 수정란 이식을 위한 배반포로의 단계로 발달하기 전인 약 5~6일을 유전자 분석에 등에 사용할 수 있다는 이점이 있다.

본 연구에서는 성판별 수정란을 생산하고자, 체외수정 26시간, 50시간 후에 2~8 세포기의 정상 균등 분할된 수정란을 선별하여 0.1% pronase 처리로 투명대를 제거 후, pipetting하여 수정란의 할구를 분리, 배양하였다. 체외수정 후 7~8일째까지 배양을 실시하고, 수정란 발달단계와 분리시기에 따른 할구의 분할율, 배반포 발달율, 배반포의 총 세포수를 조사하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 분리된 할구의 분할율은 그룹 1의 2C-SB, 4C-SB에서 유의적으로 높게 나타났다 ($p < .01$). 소의 경우 수정 후 27시간 이후 분열하는 수정란보다, 27시간 이전에 분열하는 수정란의 생존력이 높다고 보고된 바에 따라[16], 체외수정 26시간 후에 분리된 그룹 1의 2, 4세포기의 수정란이 50시간에 분리된 그룹 2의 2, 4세포기 수정란에 비해 분열속도가 빠르고, 할구의 생존력이 높아 그룹간 차이가 나는 것으로 사료된다. 이는, 수정란의 분열속도가 분리된 할구의 발달율 및 생존율에 영향을 미치는 것으로 보인다.

할구의 배반포 발달율은 그룹 1의 2C-SB가 가장 높았는데($p < .01$), 실험동물은 다르지만 생쥐의 수정란 분할시 cell stage에 있어 초기 배를 이용하는 것이 생존율과 체외발생율이 높다는 보고[17,18]와 유사한 경향을 보였고, 이는 할구분리 시 수정란 발달단계가 분리 할구의 체외발생율에 영향을 미치는 것으로 보인다. 그룹 2의 2C-SB와 4C-SB 역시 초기 단계의 수정란에서 분리되었으나, 할구의 분할율과 배반포 발달율이 저조하게 나타났는데, 이러한 결과는 앞서 언급된 수정란의 분열속도가 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 2에서 보는 바와 같이, 할구 유래 배반포의 총 세포수는 대조구에 비해 수정란 할구 분리시기, 발달단계에 관계없이 모두 유의적으로 낮은 결과를 보였다 ($p < .01$). Loskutoff[19]는 소의 2C-SB 유래 배반포는

정상 배아에서 발견되는 세포 수의 약 절반이라고 보고하였고, 본 연구에서도 2C-SB유래 배반포의 세포수는 평균 47 ± 15 개로 유사한 결과를 보였다. 할구 유래 배반포를 DAPI 염색한 결과, Fig. 3a는 탈출직전의 배반포로써, 염색을 위해 투명대를 제거하고 염색하는 과정에서 형태가 일그러진 모습이지만, 아래쪽 ICM 형태를 확실히 갖추고 있었다. 2, 4C-SB 유래 배반포(Fig. 3b, c)는 ICM, TE의 분포가 두드러지게 보이지만, 세포수가 확연히 적었고, 8C-SB 유래 배반포(Fig. 3d)는 ICM 분포가 두드러져 보이지 않았고, 육안으로도 적은 세포수를 보였다. Kelly[20]가 4~8세포기의 할구는 다른 할구와의 충분한 결합을 통해 일반적인 세포수를 구축할 경우 정상적으로 ICM과 TE를 구성할 있다고 보고한 바에 따라, 본 연구에서는 4~8세포기의 수정란 할구 분리시 할구들이 서로 응집할 수 있도록, 여러개의 할구들이 뭉쳐있는 상태의 multi blastomere형태로 분리, 배양하였다(Fig. 2b). 다만 본 연구에서 할구 배양시 투명대가 없는 조건으로 인해 할구의 3차원적인 배열이 어려웠고, 그로인한 구조적인 불안정으로, 발달과정에서 할구간 적절한 응집이 어려웠던 것으로 보인다. Loskutoff[19]의 연구에서는 정상 배반포 총 세포수의 1/4미만인 배반포에서는 송아지 생산이 어렵다고 보고하였고, Tsunoda[21]에 따르면 소의 4C-SB, 8C-SB의 경우 배반포의 ICM의 세포수가 적어 임신말기까지 발생율이 낮다고 보고함에 따라, 할구분리 기술 확립을 위해 할구 공투명대 삽입, 체외배양 환경개선 등을 통해 총 세포수 증진에 대한 연구가 지속적으로 수행되어야 한다고 판단된다.

본 연구를 종합해보면, 최근 번식기술이 향상되고 농가에서 송아지생산이 가능한 암컷의 수요가 많아짐에 따라, 원하는 성(性)의 자손의 생산을 위한 성판별 수정란 생산 기술의 일환으로 본 연구를 수행하였다. 본 연구에서는 성판별 수정란 생산을 위해, 보다 쉽게 활용할 수 있는 denuding micropipette을 활용하여 2~8세포기 수정란의 할구를 분리하고 배양하여 할구분리에 적합한 시기를 실험하였다. 그 결과 체외수정 26시간 후의 2 세포기의 수정란을 활용했을때, 배반포 발달율이 36.1%로 가장 유리한 것으로 나타났다. 따라서, 착상 전 수정란의 성판별이나 유전자 검사시, 2 세포기 수정란을 분할하여 각각 배반포생산, PCR 등으로 이용하는 것이 효율적인 것 보인다. 또한 향후 할구분리 기술을 활용해 배반포를 생산하고 이식하여 성(性) 선택적 산자를 생산하기 위해서, 할구 유래 배반포의 총 세포수 증가를 위한 지속적인 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

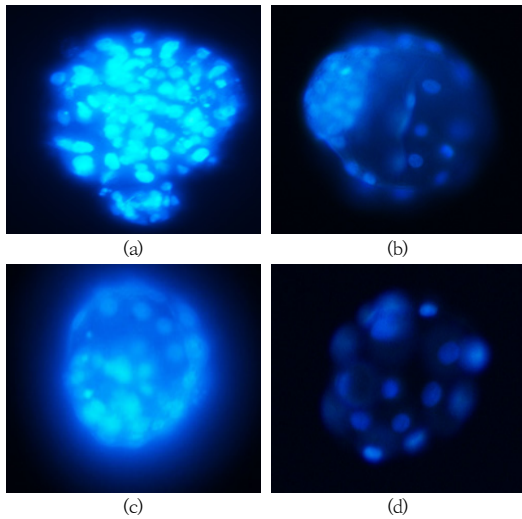


Fig. 3. Analysis of blastocyst total cell number using DAPI staining. (a) Intact blastocyst (b) Blastocyst derived from 2C-SB after 26h of IVF (c) Blastocyst derived from 4C-SB after 26h of IVF (d) Blastocyst derived from 8C-SB after 26h of IVF

** BTM, blastomere; 2C-SB, split BTM from 2-cell; 4C-SB, split BTM from 3~4-cell; 8C-SB, split BTM from 5~8-cell; *Magnification is 10×

5. 결론

본 연구는 소 초기 수정란 할구분리 기술을 활용하여 분리된 할구 일부는 성판별 등 유전자 검사에 활용하고, 일부는 배양하여 배반포를 생산하고 이식하기 위한 연구의 기초자료를 확보하기 위해 수행되었다. 도축난소에서 난자를 회수하여 체외수정란을 생산한 뒤, 체외수정 26시간, 50시간 후 2~8세포기의 초기 수정란을 선별한 후, 0.1% pronase를 처리하여 투명대를 제거하고 pipetting하여 분리한 할구를 7~8일간(IVF=day 0) 체외배양을 유도하였다. 수정란 할구 분리시기 및 발달 단계별로 할구의 분할율, 배반포 발달율, 배반포의 총 세포수를 조사하였다. 할구의 분할율은 체외수정 26시간 후에 분리한 2, 4세포기 유래 할구가 각각 83.3, 69.1%로, 50시간후의 2, 4세포기 28.5, 18.1%에 비해 유의적으로 높았고 ($p<.01$), 배반포 발달율은 26시간 후에 분리한 2세포기 할구가 36.1%로 유의적으로 가장 높았다($p<.01$). 배반포를 3.7% paraformaldehyde에 고정 후 DAPI 핵염색을 통해 총 세포수를 조사한 결과, 할구 유래 배반포 모두 대조구 배반포에 비해 유의적으로 낮았다($p<.01$).

본 연구에서는 성판별 수정란 생산을 위해, 보다 쉽게 활용할 수 있는 denuding micropipette을 활용하여 2~8세포기 수정란의 할구를 분리하고 배양하여 할구분리에 적합한 시기를 실험하였다. 그 결과 체외수정 26시간 후의 2 세포기의 수정란을 활용했을때, 배반포 발달율이 36.1%로 가장 유리한 것으로 나타났다. 따라서, 착상 전 수정란의 성판별이나 유전자 검사시, 2 세포기 수정란을 분할하여 각각 배반포생산, PCR 등으로 이용하는것이 효율적인 것 보인다. 또한 향후 할구분리 기술을 활용해 배반포를 생산하고 이식하여 성(性) 선택적 산자를 생산하기 위해서, 할구 유래 배반포의 총 세포수 증가를 위한 지속적인 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

References

- [1] L. B. Ferré, M. E. Kjelland, L. B. Strøbech, P. Hyttel, P. Mermillod, P. J. Ross, "Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods", *Animal*, Vol.14, pp.991-1004, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- [2] H. J. Lim, J. K. Son, H. B. Yoon, K. S. Baek, C. Y. Choe, S. Kim, E. G. Kwon, "Application of Embryo Transfer Technology", *Journal of Embryo Transfer*, Vol.28, pp.163-168, 2013.
- [3] R. Z. Han, H. R. Kim, Y. F. Diao, D. I. Jin, "Sex determination of *in vivo*-and *in vitro*-derived bovine embryos", *Korean Journal of Agricultural Science*, Vol.38, No.2, pp.269-275, 2011. DOI: <https://doi.org/10.7744/cnujas.2011.38.2.269>
- [4] L. U. C. Y. N. A. Kątska-Książkiewicz, B. O. Ż. E. N. N. A. Ryńska, M. I. C. H. A. Ł. Bochenek, J. O. L. A. N. T. A. Opiela, J. O. A. N. N. A. Jurkiewicz, "In vitro production of bovine embryos using flow-cytometrically sexed sperm", *Archives Animal Breeding*, Vol 49, pp.133-140, 2006. DOI: <https://doi.org/10.5194/aab-49-133-2006>
- [5] M. Zhang, K. H. Lu, G. E. Seidel Jr, "312 BLASTOCYST DEVELOPMENT OF MALE AND FEMALE BOVINE EMBRYOS PRODUCED BY IVF WITH FLOW CYTOMETRICALLY-SORTED SPERM", *Reproduction, Fertility and Development*, Vol 17, pp.306-307, 2004.
- [6] S. H. Kim, K. L. Kim, H. J. Lee, K. S. Jung, J. S. Baek, D. W. Jung, J. T. Yoon, "The Improvement of Sexing PCR Conditions and Survival Rate of Blastomere Separation Method in the Bovine Embryo", *Journal of Embryo Transfer*, Vol 28, pp.199-205, 2013.
- [7] M. Rahbaran, E. Razeghian, M. S. Maashi, A. T. Jalil, G. Widjaja, L. Thangavelu, M. Jarahian, "Cloning and embryo splitting in mammals: brief history, methods, and achievements", *Stem Cells International*

- 2021, pp.1-11, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/2347506>
- [8] Y. J. Kim, G. N. Chong, H. L. Lee, S. W. Cho, Y. S. Kim, I. J. Yu, "Sex determination of biopsied Hanwoo embryos by polymerase chain reaction and embryo transfer with sexed blastocysts", *Journal of Embryo Transfer*, Vol 15, pp.219-30, 2000.
- [9] S. R. Cho, S. H. Choi, H. J. Kim, M. H. Han, C. Y. Choe, Y. G. Chung, D. S. Son, "Sex Detection and *In Vitro* Development of Biopsied Bovine Embryo for LAMP Based Embryo Sexing", *Journal of Embryo Transfer*, Vol.20, pp.169-176, 2005.
- [10] R. F. F. Lopes, F. Forell, A. T. D. Oliveira, J. L. Rodrigues, "Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions", *Theriogenology*, Vol.56, pp.1383-1392, 2001.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00641-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00641-0)
- [11] S. G. Moore, J. F. Hasler, "A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science", *Journal of Dairy Science*, Vol. 100, pp.10314-10331, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- [12] M. L. Leibfried-Rutledge, E. S. Critser, J. J. Parrish, N. L. First, "In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes", *Theriogenology*, Vol 31, pp.61-74, 1989.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90564-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90564-5)
- [13] J. J. Parrish, J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried-Rutledge, E. S. Critser, W. H. Eyestone, N. L. First, "Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen", *Theriogenology*, Vol.25, pp. 591-600, 1986.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90143-3)
- [14] R. B. L. Gwatkin, "Effect of enzymes and acidity on the zona pellucida of the mouse egg before and after fertilization", *Reproduction*, Vol 7, pp.99-105, 1964.
DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0070099>
- [15] M. Tagawa, S. Matoba, M. Narita, N. Saito, T. Nagai, K. Imai, "Production of monozygotic twin calves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system", *Theriogenology*, Vol 69, pp.574-582, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.003>
- [16] S. Sugimura, T. Akai, K. Imai, "Selection of viable *in vitro*-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes", *Journal of Reproduction and Development*, Vol.63, pp.353-357, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-041>
- [17] T. Takeda, T. Takedomi, T. Onihara, "Development of blastomeres isolated at the four-or eight-cell stage and embryos after bisection at the morula and blastocyst stages in the mouse", *Theriogenology*, Vol.31, pp. 262, 1989.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90670-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90670-5)
- [18] L. J. Wilton, A. O. Trounson, "Biopsy of preimplantation mouse embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*", *Biology of Reproduction*, Vol.40, pp.145-152, 1989.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod40.1.145>
- [19] N. M. Loskutoff, W. H. Johnson, K. J. Betteridge, "The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers", *Theriogenology*, Vol.39, pp. 95-107, 1993.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90026-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90026-2)
- [20] S. J. Kelly, Studies of the potency of the early cleavage blastomeres of the mouse, The early development of mammals, 1975, pp. 97-105.
- [21] Y. A. M. A. Tsunoda, A. McLaren, "Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres", *Reproduction*, Vol. 69, pp.315-322, 1983.
DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690315>

이 세 영(Se Young Lee)

[정회원]



- 2018년 9월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사
- 2021년 8월 : 경상국립대학교 응용생명과학부 (농학석사)

<관심분야>

번식생리학, 수정란이식

고 응 규(Yeoung-Gyu Ko)

[정회원]



- 1997년 8월 : 전북대학교 축산학과 (농학석사)
- 2004년 3월 : 동경대학교 수의학과 (수의학박사)
- 1994년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구관

<관심분야>

가축번식학, 세포생화학, 생명공학

조 상 래(Sang-Rae Cho)

[정회원]



- 2000년 2월 : 경상국립대학교 농업생명과학대학 축산학과 (농학 석사)
- 2003년 8월 : 경상국립대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2008년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구관

<관심분야>

생명과학, 유전공학

김 성 우(Sung Woo Kim)

[정회원]



- 1997년 8월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학석사)
- 2002년 2월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학박사)
- 1998년 1월 ~ 2002년 6월 : 한국 기초과학연구소 연구원
- 2022년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구관

<관심분야>

가축번식학, 생명공학, 동결학

이 재 영(Jae-Yeong Lee)

[정회원]



- 2017년 2월 : 건국대학교 동물자원학과 (농학사)
- 2023년 2월 : 부산대학교 동물생명자원학과 (이학석사)
- 2019년 9월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물번식학, 생명공학

김 찬 란(Chan-Lan Kim)

[정회원]



- 1999년 2월 : 서울대학교 수의학과 (수의학 학사)
- 2005년 3월 : 일본 기후연합대학원 오비히로대학 수의공중보건학과 (응용수의학 박사)
- 2006년 7월 ~ 2014년 9월 : 농림 축산검역본부 수의연구사
- 2014년 10월 ~ 현재 : 국립축산과학원 수의연구사

<관심분야>

예방수의학, 중소동물 임상, 수의공중보건학