

15강

가축번식생리 조절 기술

서울대 이창규 교수

목차

- 1 인공수정
- 2 발정 동기화
- 3 수정란 이식
- 4 체외수정
- 5 성감별



01

인공 수정

▶ 경제동물의 번식 방법

■ 자연번식

- 암컷과 수컷의 교미



■ 인공수정

- 수컷의 정액을 암컷의 질 또는 자궁에 주입
- 수정란 이식



▶ 인공 수정의 과정

■ 정액 채취

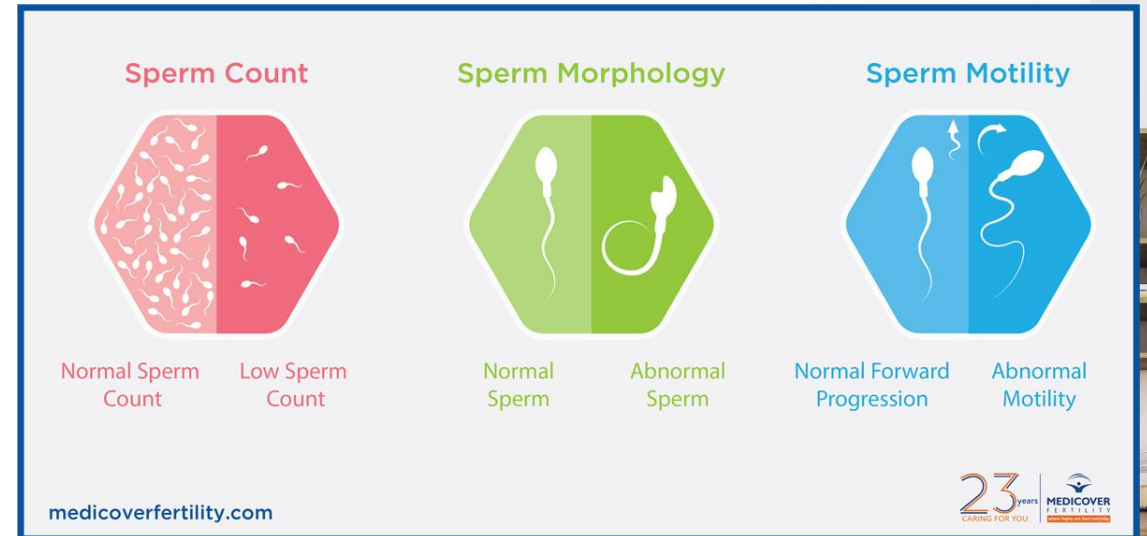
- ▶ 인공질 사용, 따뜻한 물이나 공기를 채울 수 있는 관의 형태
- ▶ 한쪽에는 수컷의 생식기가 다른 한쪽에는 사정된 정액을 모으는 튜브



▶ 인공 수정의 과정

■ 정액 검사

- 정액의 총량, 정자의 수, 기형 정자 비율, 정자의 생존율 및 정자의 활력 검사
- 정상적인 모양과 활력이 높은 정자의 수가 많을수록 인공 수정 후 수정률이 높음



▶ 인공 수정의 과정

■ 정액의 희석

- 정해진 농도로 희석, 다수의 암컷에게 사용 가능
- 외부에 노출된 정자에게 영양분을 공급하여 생존율과 활력을 유지
- 탈지우유 또는 난황, 동결방지제, 항생제 포함



▶ 인공 수정의 과정

- 정액의 동결 보존
 - 액체 질소를 이용하여 동결
 - 반영구적으로 보존이 가능
 - 운반에 용이



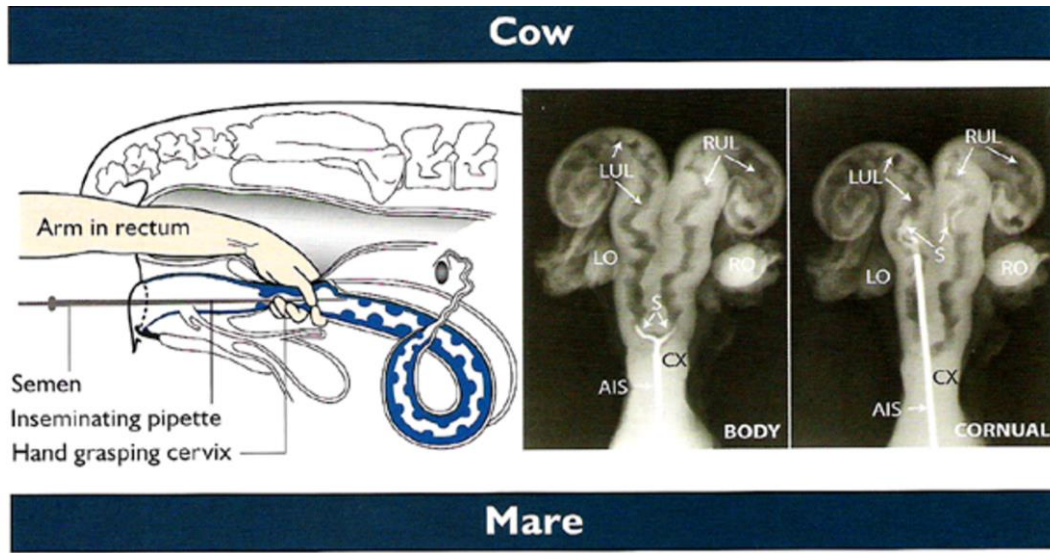
▶ 인공 수정의 과정

■ 정액의 주입

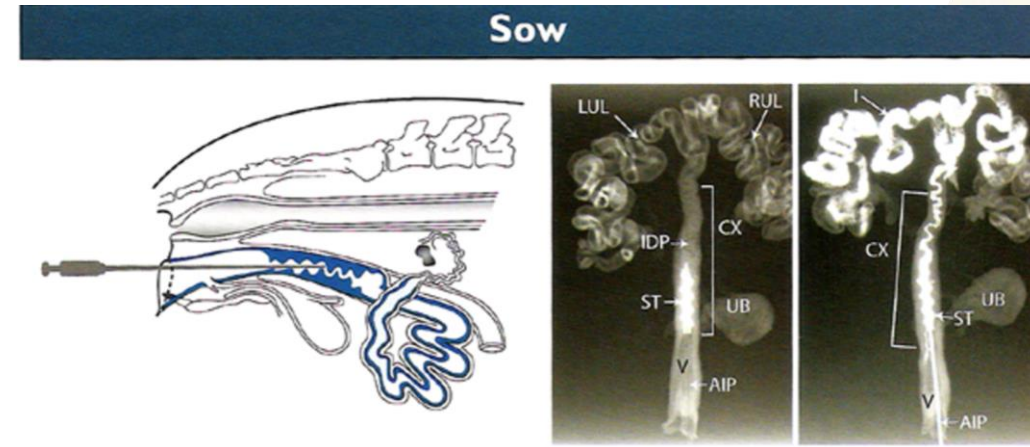
- 수정 적기의 암컷의 자궁에 동결-융해한 정액을 주입
- 따뜻한 물에서 완전히 녹인 후 바로 사용
- 소와 같은 대동물의 경우 암컷의 항문을 통해 직장으로 손을 넣어 직장 바로 밑으로 지나가는 암컷의 생식기 위치 파악
- 정액 주입기를 질을 통해 삽입, 자궁경관을 통과하도록 좌우로 조작
- 가능한 황체가 존재하는 쪽의 자궁각에 주입하여 수정률을 높임



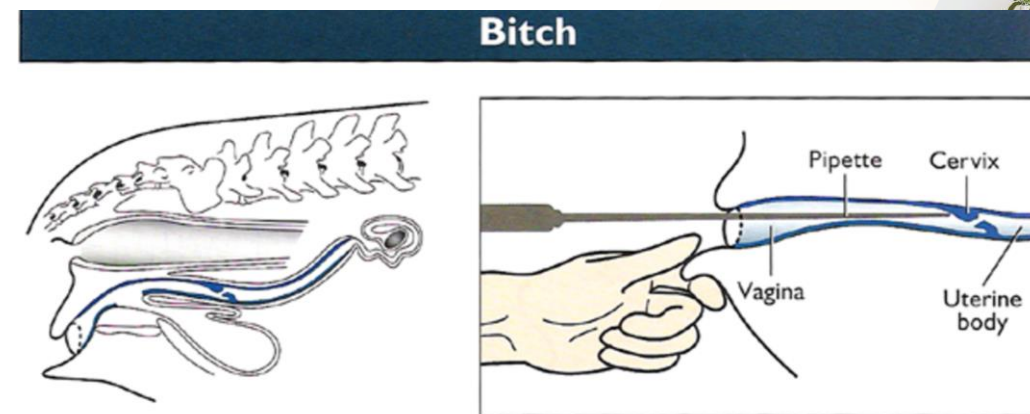
▶ 자궁 경부를 통과해 주입



▶ 자궁 경부에 주입



▶ 질에 주입



▶ 인공 수정의 장단점

■ 인공 수정의 장점

- 직접적인 교미가 불필요 (공격적인 수컷의 행동)
- 좋은 형질을 멀리 떨어진 장소까지 전달 가능
- 희석된 정액사용으로 수많은 번식 가능
- 번식 시기와 규모를 조절 가능

■ 인공 수정의 단점

- 전문 장비와 숙련된 기술자 필요



▶ 생식기 질병

■ 자연 번식으로 인한 생식기 접촉

➤ 다양한 질병에 노출

- 브루셀라증: 유산 및 조산, 불임, 고환염 및 부고환염
근절이 어려워 살처분 정책, 경제적 피해
- 트리코모나스병: 초기 태아 유산, 반복적인 불임 증상



▶ 생식기 질병

- 인공 수정으로 인한 생식기 질병
 - 생식기 전염병 발생 및 생식기 점막 손상
 - 기구세척과 소독 부주의, 정액 처리의 부주의
 - 기술 숙련도가 낮을 경우
 - 인공 번식의 근본적인 문제가 아닌 부주의에 의한 것



02

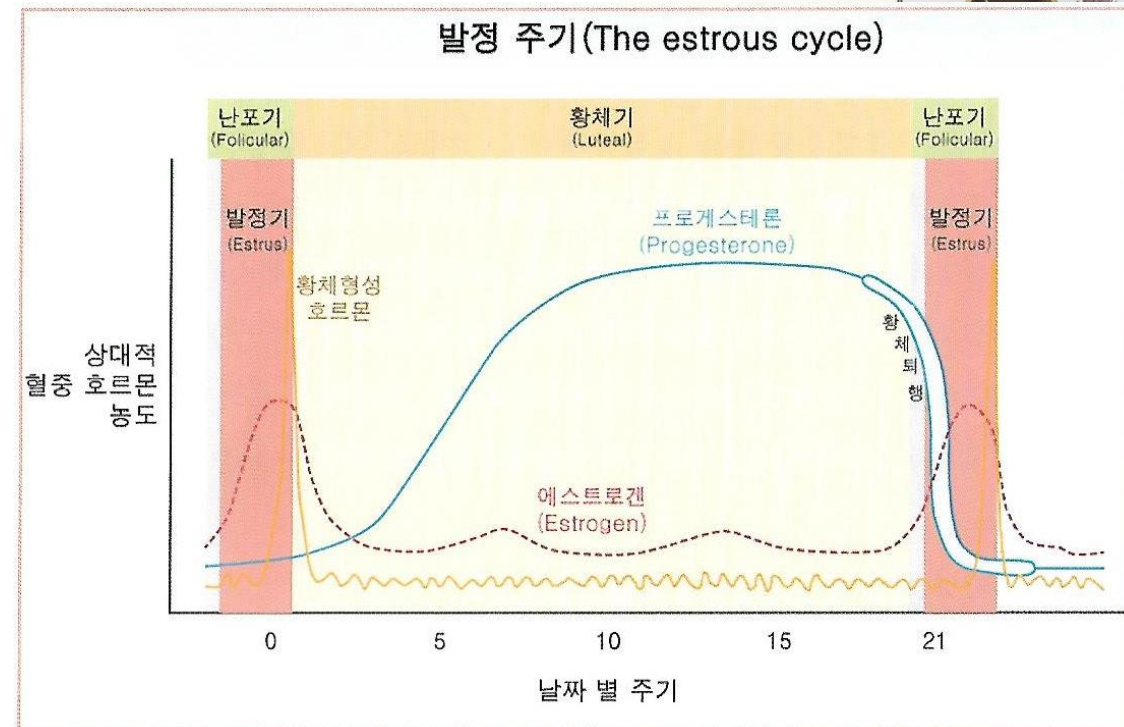
발정 동기화

▶ 발정

- 번식을 위해 암컷에서 교미욕이 발현된 상태
 - 적정 시간의 호르몬의 생산 및 분비에 의해서 조절

■ 발정주기

- 암컷이 발정을 하고 다음 번 발정을 되풀이하기까지의 시간
- 호르몬의 지배로 주기적으로 발생
- 외부의 호르몬으로 발정주기 조절 가능



▶ 발정주기의 조절

■ 난포자극호르몬 (FSH)

- 난소 안의 난포가 발달하는 원인
- 암컷에 난포자극호르몬을 주사하면 그 시점에서 발정주기가 시작되는 원인
- 동시에 한 무리의 암컷들이 주사를 통해 거의 동시에 발정을 시작



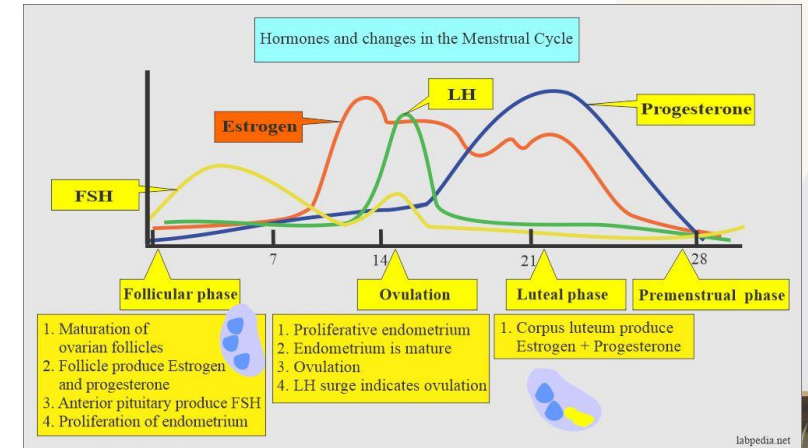
발정 동기화

2. 발정 동기화

▶ 발정주기의 조절

■ 프로게스테론

- ▶ 뇌하수체의 황체자극 호르몬에 의해 난소의 황체에서 분비
- ▶ 지속적으로 프로게스테론을 분비하는 기구를 이용하여 황체를 유지하다가 호르몬 투입을 중단하여 두 그룹에서 동시에 난포를 발달시킴



▶ 발정동기화의 장점

- ▶ 한 목장에서 암컷들이 모두 같은 시기에 발정 시작
-> 동시에 인공 수정이 가능
- ▶ 임신과 분만도 같은 시기에 일어난다
-> 다수의 동물 관리가 용이



03

수정란 이식

▶ 수정란 이식의 배경

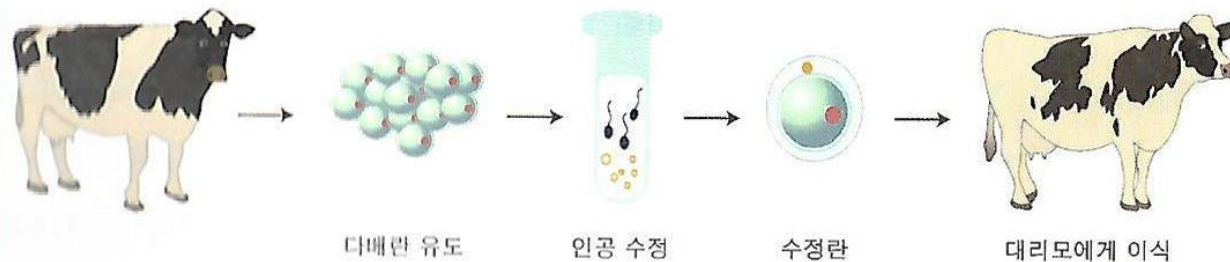
- ▶ 우량 수컷의 유전자를 널리 사용 가능
- ▶ 대부분의 암컷들은 연간 한 번 밖에 자손을 생산하지 못함
- ▶ 우량 암컷의 유전자를 확장 시키려는 연구
- ▶ 수정란 이식을 이용해 우량 암컷이 1년에 많은 수의 자손을 생산



▶ 수정란 이식

■ 수정란 이식의 과정

- 가장 유용한 특성의 공여 동물과 임신을 유지할 수 있고 건강하게 자랄 수 있는 대리모 동물을 선발
- 두 그룹 모두 발정주기를 같은 시기로 동기화
- 번식 주기를 조절하는 호르몬(난포자극 호르몬)을 이용하여 한 번에 다수의 난자를 배란시키는 과배란 또는 다배란 유도



수정란 이식

3. 수정란 이식

STEP 1
Synchronization of recipients with donor

Recipients

Donor

STEP 2
Superovulation of donor

Donor

A

B

STEP 3
Inseminate donor with semen from genetically superior bull

Arm in rectum

Semen inseminating pipette

Hand grasping cervix

LUH RUH

LO

S

AIP

STEP 4
Recovery and identification of viable embryos

Donor

Goal: To nonsurgically collect (flush) embryos from the donor for transfer.
Reason: To recover viable embryos.

How: Before the procedure is started a local anesthetic is injected to cause relaxation of the rectum. At day 6-8 a specialized catheter is inserted into the uterus. The catheter has a small balloon that can be inflated to prevent retrograde flow of the flushing medium. A flushing medium is then introduced into the uterus, lavaged and then returned through the catheter to a collection vessel. The ovary in the photo has ten-7 day CL.

(Ovarian specimens courtesy of Dr. B.R. Lindsey, Minitube of America, www.minitube.com)

STEP 5
Transfer of viable embryos into synchronized recipients

Recipient

Goal: To deposit a potentially viable embryo into the uterine horn of each recipient.
Reason: To achieve pregnancy in each recipient.
How: A single embryo is placed into the uterine horn using a transfer pipette. Note that both the donor (step 4) and recipient here have CL at similar stages of leutinizization. Thus, the uterine environment in the donor and recipient are quite similar.



▶ 수정란 이식

■ 수정란 이식의 과정

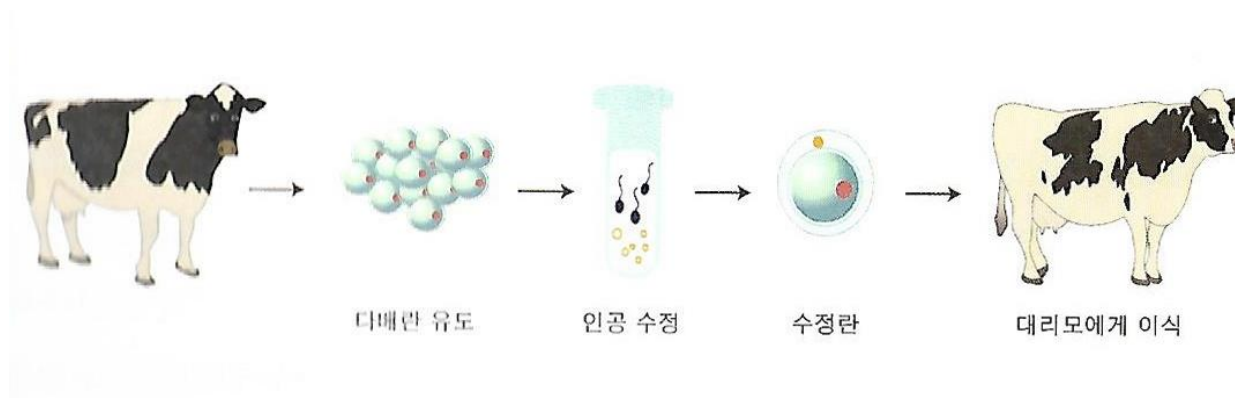
- 2~3일 후, 발정이 원인이 되는 프로스타글란딘 주사
- 48시간 후 암컷의 발정이 진행
- 인공수정이나 자연적 교배
 - > 여러 개의 난자가 수정이 되려면, 보통의 인공수정보다 많은 양의 정액을 사용



▶ 수정란 이식

■ 수정란 이식의 과정

- 수정된 난자들을 일주일 후에 회수
- 수정란 품질검사를 실시, 적합한 성숙 단계와 정상적인 수정란들을 이식하여 사용
- 다른 개체의 자궁에 이식하여 임신과 분만을 유도



▶ 수정란 이식의 장점

- ▶ 인공 수정은 수컷 쪽에서 가축 개량을 촉진하는 방법인 데 반하여 수정란 이식은 암컷 쪽에서 가축 개량을 촉진
- ▶ 우유 생산량, 임신율, 산자수 등을 개량
- ▶ 우수한 암컷으로부터 많은 산자 생산
- ▶ 후대 검증으로 암컷의 중요 형질들을 개량



▶ 수정란 이식의 장점

- ▶ 수정란을 액체 질소에 동결 보존
- ▶ 검역과정 없이 양질의 동물을 반입, 반출
- ▶ 대리모에 두 개의 수정란을 이식시키는 방법으로 쌍둥이 자손 생산
- ▶ 서로 다른 품종 간의 이식을 통해 빠른 시간에 특정 품종이나 계통으로 교체 가능



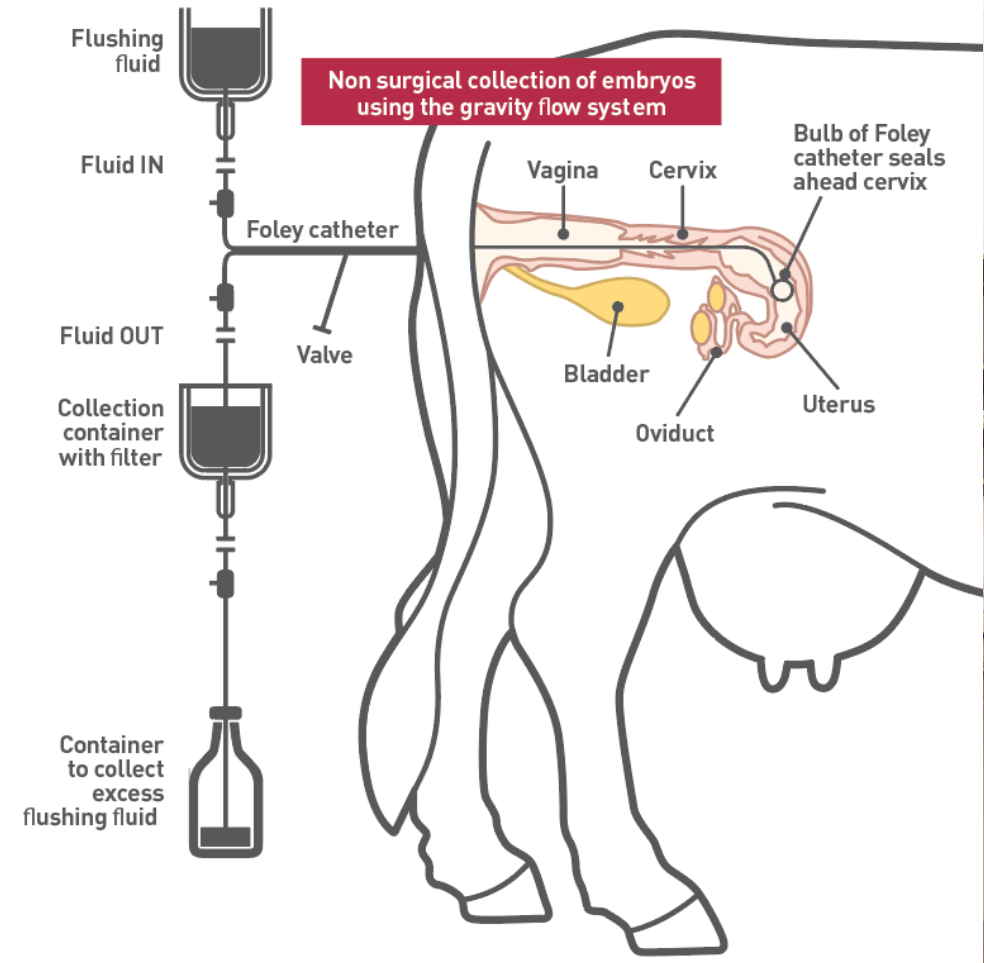
▶ 수정란 이식의 문제점

- ▶ 과배란을 위한 호르몬 처리 시 난자의 질 저하
- ▶ 인공 수정과 병행하여 집중적으로 사용될 때 다양한 유전적 기초가 좁아져 육종의 악화



▶ 수정란 이식의 문제점

- ▶ 난관에 있는 수정란은 외과적 수술을 통해서만 회수 가능
- ▶ 카테터라는 수정란 회수 기구가 필요
 - > 길고 얇은 고무 튜브로 자궁경을 거쳐 자궁각까지 통과
 - > 밸브를 가지고 있어 용액이 역류되지 않게 막음



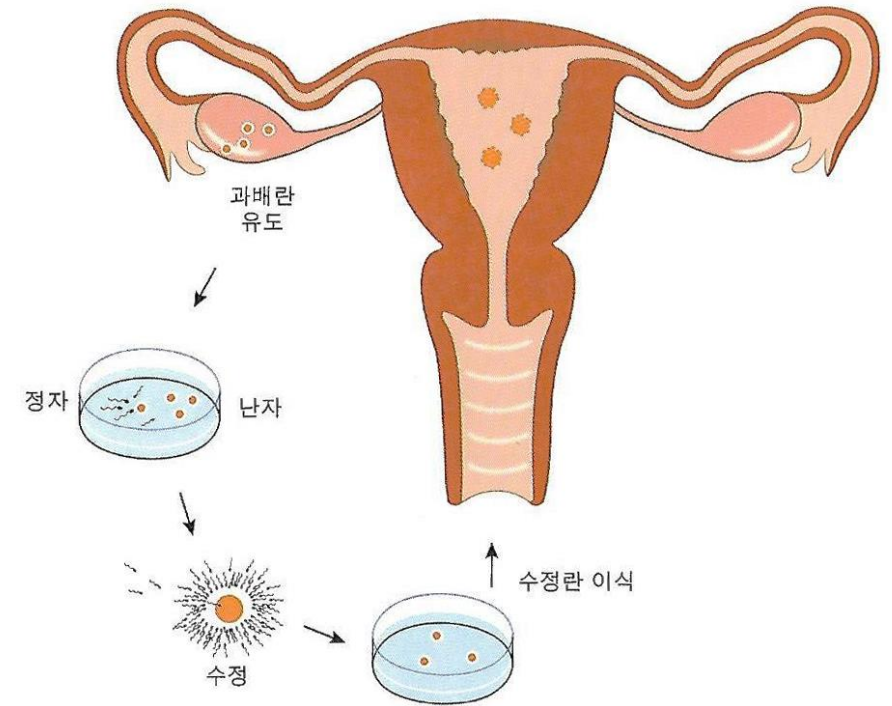
04

체외 수정

▶ 체외수정

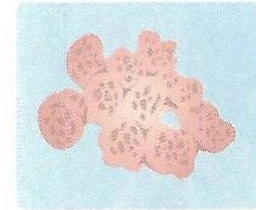
■ 체외수정의 과정

- 정자와 난자의 준비, 수정 및 수정 판정, 수정란 이식을 통한 산자 생산 과정
- 체내와 비슷한 환경으로 정자와 난자를 수정이 가능
- 정자는 수정능 획득 과정이 필요
- 난자는 배란된 상태와 같은 성숙이 필요
- 비외과적 이식이 가능한 배란포기 수정란까지 배양

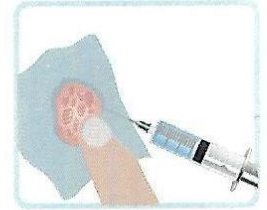


■ 난자의 성숙

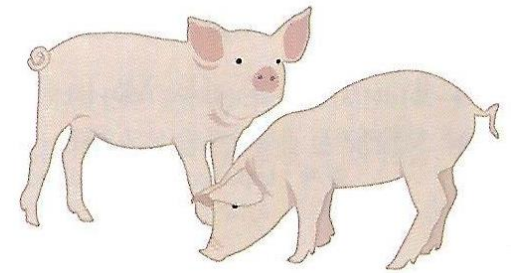
- 체내 성숙된 난자를 이용하는 경우 초음파와 복강경을 이용하여 난포에서 난자를 채취
- 소나 돼지의 경우 도축장에서 난소를 가져와 난포에서 주사기를 이용하여 미성숙 난자를 채취
- 감수분열이 진행되지 않아 성숙에 필요한 호르몬과 함께 배양



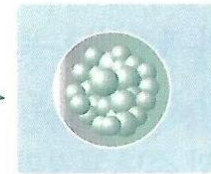
돼지의 난소



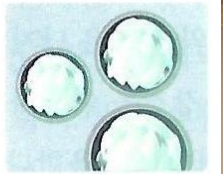
돼지의 난소에서
난자를 채취하는 모습



돼지 체외수정란
수정 직후

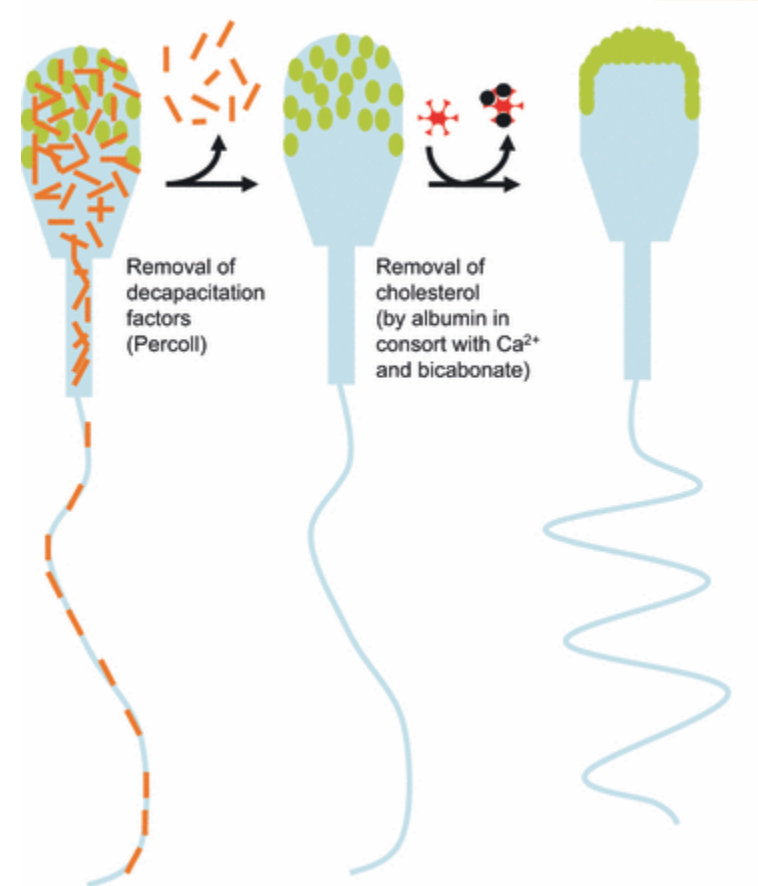


상실기



포배기

- 정자의 수정능 획득
 - 정자의 배양액에 헤파린이나 카페인을 이용하여 수정능을 유도



▶ 체외수정의 장점

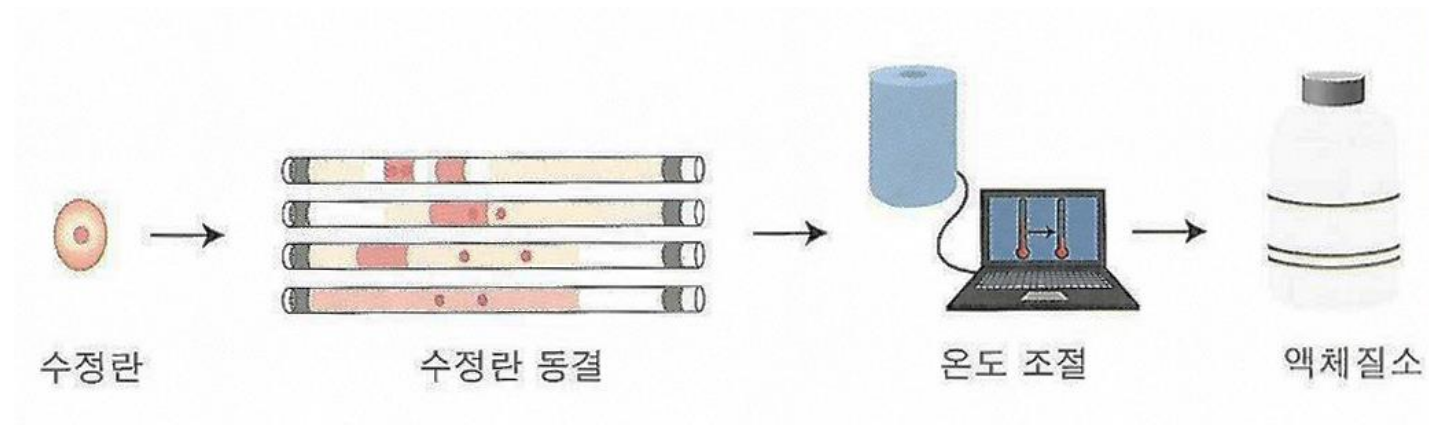
- 우수한 암컷 유전자의 이용 효율 높임
 - 다배란을 유도하는 대신 도출되는 암컷의 난소를 적출
 - 시험관 내에서 다수의 우수한 수정란 생산
- 인간의 불임 치료에 이용
 - 다수의 난자를 배란 직전의 난포에서 채취
 - 수정능 획득 전처리를 한 남성의 정자를 이용하여 체외수정 유도



▶ 수정란 동결

■ 수정란을 동결 보존

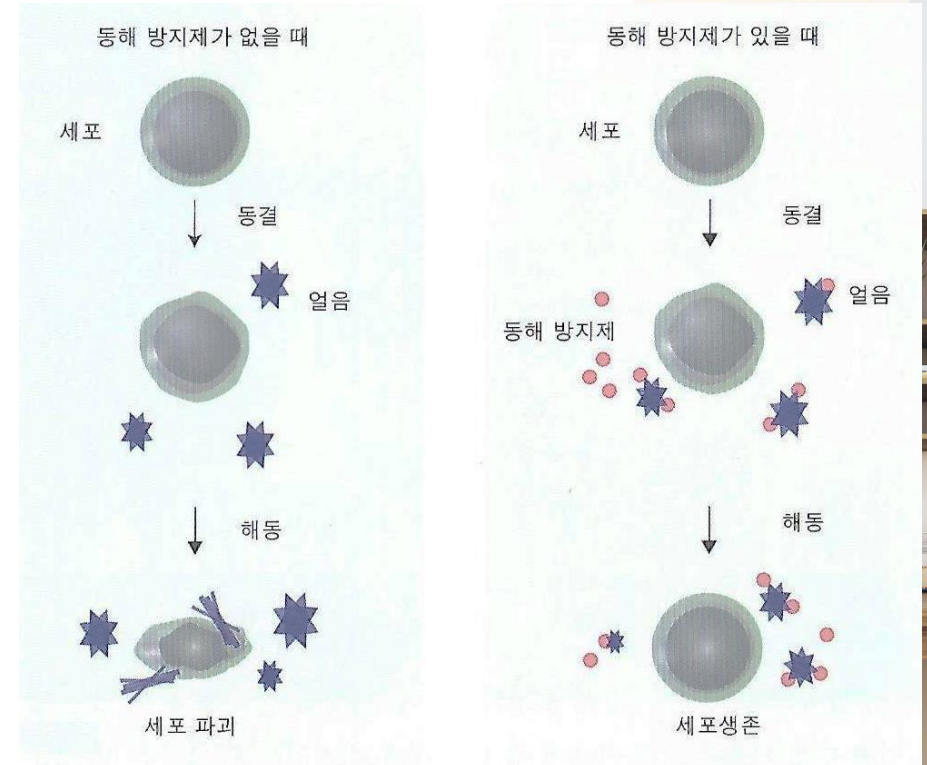
- 다배란 처리 및 체외수정 후 수정란을 액체 질소에 보관하는 기술
- 세포 내에서 대부분을 차지하고 있는 물을 삼투압 차이를 이용하여 제거한 상태에서 동결 보존



▶ 수정란 동결

■ 수정란을 동결 보존

- ▶ 다시 융해 시 적절한 방법으로 세포 내로 물을 되돌림으로 생존성 유지
- ▶ 동해 방지제: 글리세롤 및 단백류를 이용하여 만든 고장액, 동해를 방지하는 역할



05

성감별

▶ 성 결정 기작 활용

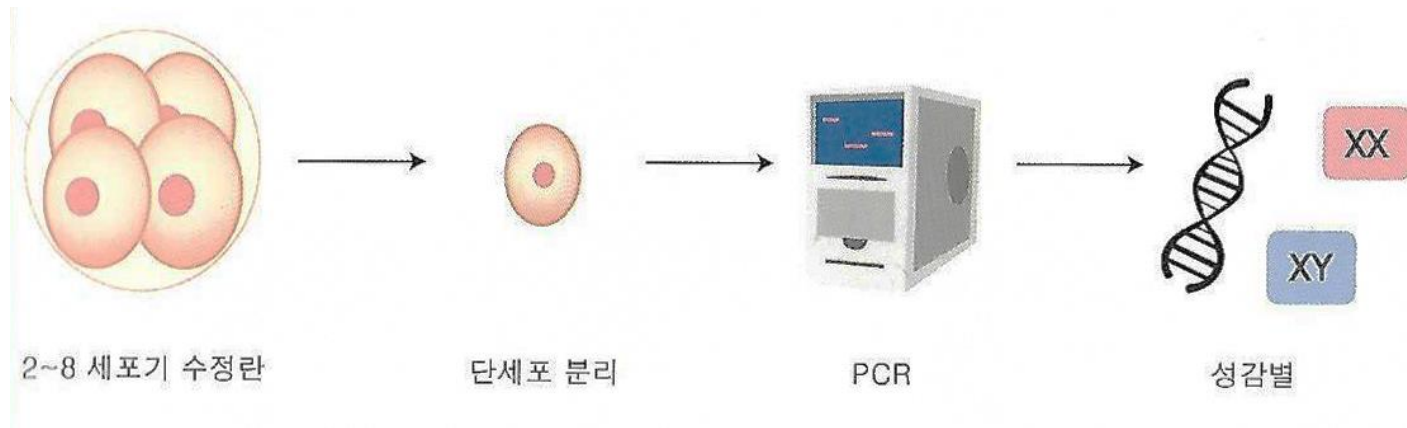
- 고기생산 혹은 낙농 등 사육목적에 따라 원하는 성별을 생산하기 위한 목적
- 자연적으로 태어나는 두 성별을 모두 기르게 되면 경제성과 생산효율이 떨어짐
- 성별을 원하는 방향으로 결정짓기 위한 연구



▶ 출산 전 태아의 성결정 방법

- 발생중인 배아의 성을 착상 전에 판별하여 원하는 성별만 착상

- 침투성 방법, 착상 전 세포 검사를 실시, 유전자를 추출하여 성 특이적 유전자가 존재하는지 확인



▶ 출산 전 태아의 성결정 방법

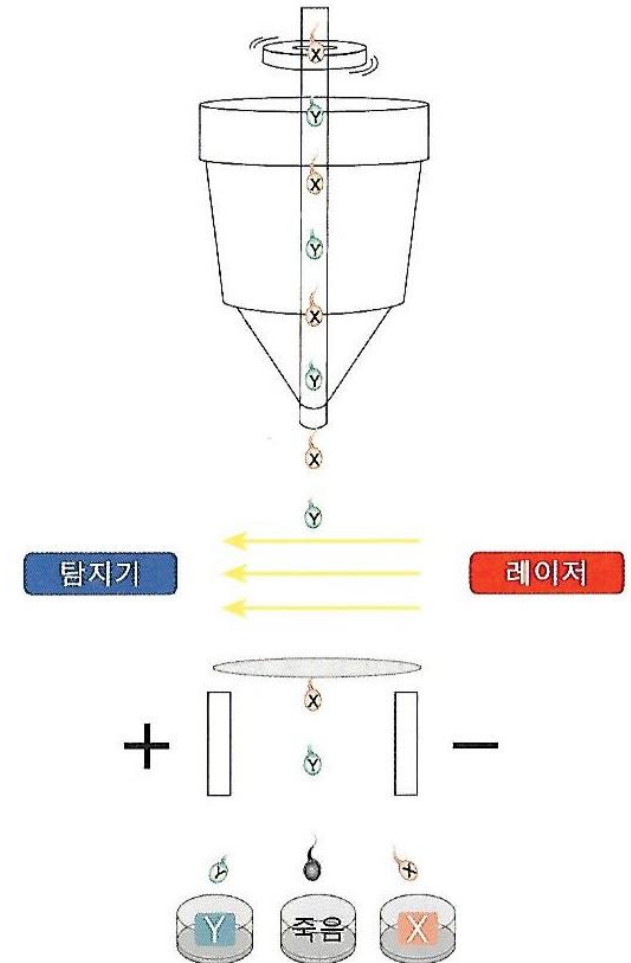
- 수정이 이루어지기 전 X, Y 염색체를 각각 보유한 정자를 분리하여 수정
 - Flow cytometry로 정자 DNA 함량을 형광으로 분석
 - 정자에서 성에 따라 다르게 발현하는 단백질의 면역학적 특성에 의하여 구별



▶ Flow cytometry를 이용한 정자 선별

■ Flow cytometry

- ▶ 유액 상태의 세포가 감지지역을 통과시 각 세포를 통과하는 형광 파장을 분석하여 세포 크기, 세포 내부 조성 등 세포의 특징을 동시에 측정하는 실험 기법
- ▶ 레이저를 통과한 빛의 산란정도를 분석하고, 파장 또한 분석
- ▶ 시료 내 특정 세포들만 선택적으로 분리 가능



▶ Flow cytometry를 이용한 정자 선별

■ Flow cytometry

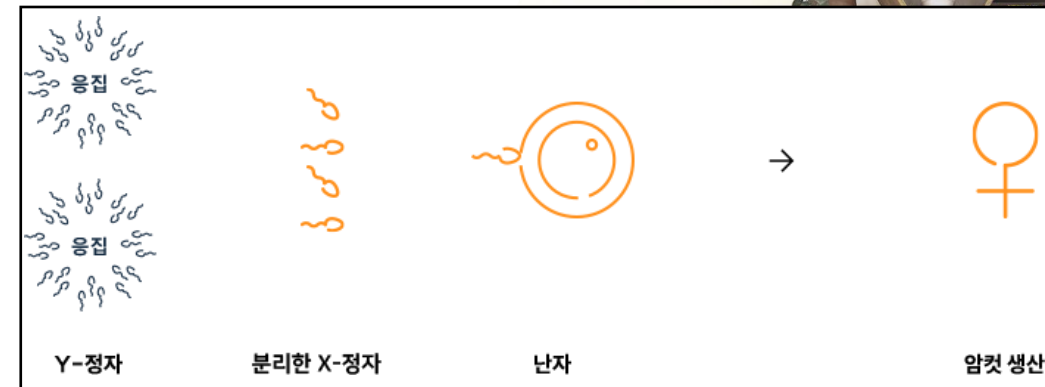
- ▶ X염색체가 Y염색체에 비해 DNA 양이 3.8% 가량 많으므로, DNA를 형광표지하여 레이저 조사, 다른 산란 양상을 보임
- ▶ Flow cytometry 내의 유체 흐름이나 sorting 시 발생하는 물리적 자극, 형광분석 시 발생하는 광학적 자극 등에 의해서 정자의 생존 감소, 운동성 감소, 세포막 손상, 미성숙한 첨체 반응 등이 일어날 수 있음 -> 수태율 감소
- ▶ 85~90%의 정확도 효율



▶면역학적 방법을 이용한 정자 선별

■ Wholemom

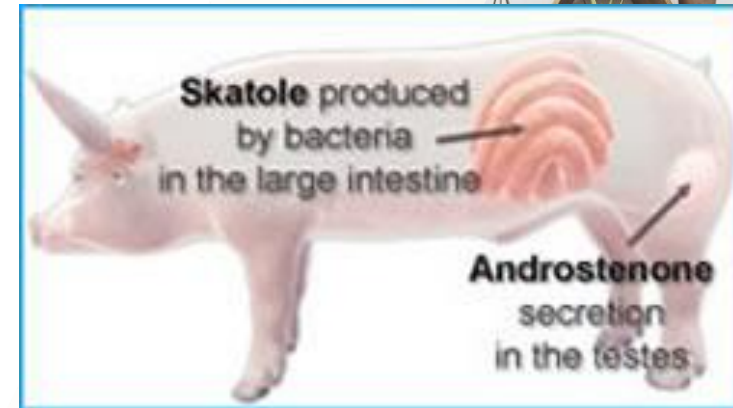
- ▶ Y 염색체를 가진 정자의 머리 부분을 인식하여 특이적으로 결합하는 단일 클론 항체
- ▶ Wholemom 처리 시 Y 염색체를 가진 정자들끼리 뭉쳐서 침전하여 정자 분리가 가능
- ▶ X 염색체를 가진 정자만 회수가 가능
- ▶ 정확도가 비교적 낮지만 물리적 손상이 적음



▶ 외과적 시술을 이용한 성선별

■ 수컷 돼지의 웅취

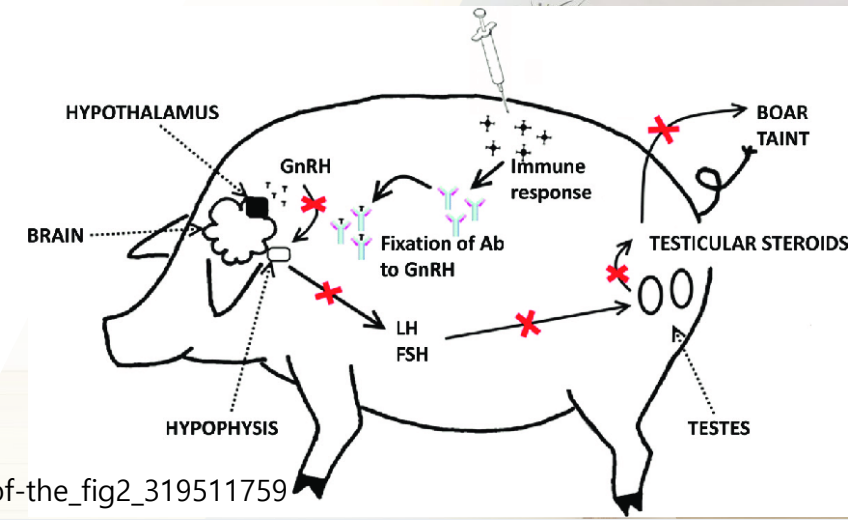
- ▶ 수컷 돼지의 성 결정 기작이 발현된 결과 웅취 형성
- ▶ Androstenone: Luteinizing Hormone이 정소의 Leydig cell에 작용되어 생성되는 스테로이드 호르몬
- ▶ Skatole: 대장에서 미생물에 의해 분해되어 합성된 뒤 지방조직에 축적되는 물질



외과적 시술의 대안

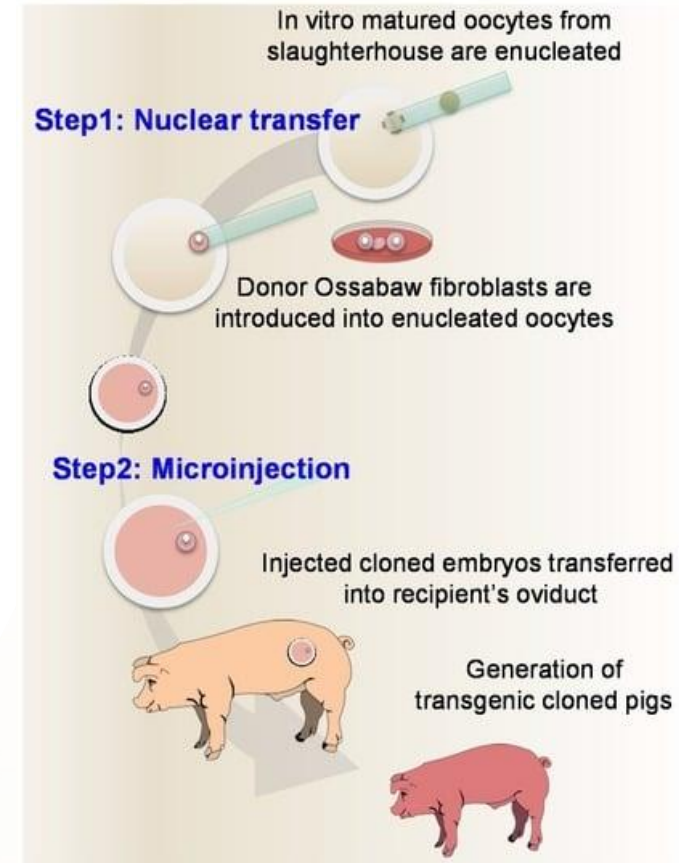
면역학적 거세

- Improvac®은 호주에서 개발된 약물로 현재 유럽의 주요 축산국가에서 외과적 거세 대신 사용
- GnRH와 구조가 유사한 analogue를 체내에 주입
- 돼지 자체의 면역 시스템이 GnRH에 대한 항체 형성, 수용체 결합 방해
- 뇌하수체 전엽에서 호르몬이 분비되지 못하므로 Androstenone이 합성되지 않음.
- 정소 크기가 감소하고, 웅취가 유의미하게 감소



▶ 외과적 시술의 대안

- 유전자 knockout 방법 연구 개발
 - 웅취를 유발하는 유전자가 제거된 형질전환 개체 생산
 - CRISPR/Cas9 유전자 가위를 미세주입방법으로 배아에 주입하여 웅취 유발 유전자 제거
 - 돼지 섬유아세포에서 유전자 가위를 이용하여 웅취 유발 유전자 제거 후, Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) 방법을 이용해 돼지 배아에 이식



감사합니다.

서울대 이창규 교수