

**수정정보조액을 이용한 한우 및 젖소의 암송아지
생산비율 향상기술 개발**

**(Increase of Female Calf Production Rate of
Hanwoo and Dairy Cow Using Artificial
Insemination Buffer)**

경 상 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수정보조액을 이용한 한우 및 젓소의 암송아지 생산비율 향상기술 개발”
과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 7월 25일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 공 일 근

세부연구책임자 : 공 일 근

연 구 원 : 진 종 인

연 구 원 : 방 재 일

연 구 원 : 최 병 현

연 구 원 : 하 아 나

연 구 원 : 김 성 수

연 구 원 : 조 현 태

연 구 원 : 이 경 림

협동연구기관명 : 남해축협

협동연구책임자 : 류 영 실

요 약 문

I. 제 목

수정보조액을 이용한 한우 및 젓소의 암송아지 생산비율 향상기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 인공수정 시 수정보조액을 이용한 암송아지 생산비율 향상기술 개발 및 산업화
2. 수정보조액 조성비 및 제조방법의 최적화
3. 수정보조액의 운송 보관 및 활용기술 확립
4. 암소 생산을 최대 80% 이상 생산 가능하게 하는 수정보조액 기술 확립
5. 수정보조액을 이용한 인공수정 기술 확립
6. 수정보조액을 활용하여 인공수정 시 수태율 향상 기술 확립
7. 농가 현장에서 직접 사용할 수 있는 기술 보급
8. 수정보조액 주입기 개발 및 현장 실용화 확립
9. 수정보조액을 활용한 암송아지 생산비율 향상 기술의 산업화

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 암송아지의 생산비율 향상시킬 수 있는 수정보조액 제조의 최적화
2. 제조, 보관 및 활용 시 효율화 방법 개선
3. 주입위치(자궁경관 추벽)의 비교분석과 최적화
4. 주입 후 인공수정까지의 노출시간의 최적화
5. 수정보조액 주입기 개발
6. 현장 활용을 위한 최적화 기술 개발
7. 실제 농가에 적용하여 암송아지 생산비율의 조사
8. 현장 적용 시 노출되는 문제점 검토 및 개선책 마련
9. 수정보조액으로 생산된 산자들의 성장과 번식능력 분석
10. 수정보조액의 이용한 암송아지 생산에 활용하는 산업화 적용
11. 동결정액 제조 시 수정보조액의 첨가에 의한 암송아지 생산비율 향상 가능성 검토
12. 체외수정 시 수정보조액의 첨가에 의한 암컷 수정란의 생산비율 향상 가능성 조사

IV. 연구개발결과

1. 수정보조액의 장기간 저장은 -20°C 에서 보관 확정
2. 수정보조액을 주입하기 위한 Steel Gun을 자체 제작
3. AI Sheath를 이용한 수정보조액 주입방법 개발
4. 주입위치에 따른 연구결과 자궁경관 2~4추체에 주입하였을 때 수태율이 높음
5. 수정보조액의 적정주입량을 10ml로 하였을 때 최적의 효과를 낼 수 있음
6. 수정보조액의 주입용량을 5ml로 결정
7. 수정보조액의 노출 시간은 10분이 최적의 효과를 낼 수 있음
8. 체외수정란 생산에서는 수정보조액을 활용가능성이 없는 것으로 판단됨
9. 수정보조액의 노출 시간은 암송아지 생산에 있어서 결정적인 역할을 하는 것으로 판단됨

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 고급육 한우, 고능력 젖소의 암송아지를 안정적으로 생산, 개량의 효과의 극대화
2. 고능력 젖소 및 고급육 한우 밀소의 안정적인 생산기반 확충
3. 소고기시장의 완전개방에 따른 특화된 고급육 생산 기지화 구축
4. 암소비육 등의 특화된 브랜드 구축 가능
5. 고등등록우에게만 수정보조액을 이용하여 암송아지 생산
6. 착유우의 경우 세대교체용 암소 생산할 수 있고 특히 고능력 암소의 세대교체를 용이
7. 낙농 농가에서 선택적 임신이 가능하여 농가 소득보전 및 경제적 이익의 극대화
8. 현재의 인공수정사 및 수의사들을 활용한 보급이 단기간에 가능함
9. 단기간 내에 전국 판매망 구축이 가능하여 산업화 용이함
10. 다른 성감별 방법과 비교하여 가격 경쟁력을 갖추
11. 암소에 대한 요구가 있는 곳은 어디나 수출이 가능하여 세계시장에 수출 할 수 있음

SUMMARY

I. Subject

Increase of female calf production rate of Hanwoo and dairy cow using artificial insemination buffer(AIB)

II. The purpose and need for research and development

1. Improve the rate of female calf production using AIB during AI
2. Optimization of making method and the rate of component
3. Establishment of transfer, storage and technique of AIB application
4. Establishment of AIB's technique to coverage about 80% of cow.
5. Establishment of artificial insemination technique to use AIB
6. Establishment of improve the rate of birth after artificial insemination.
7. Propagation of technique to use it themselves in their farm
8. Establishment of practical use and development of technique to insertion of AIB
9. Industrialization of the improving technique of the rate of female calf to use AIB

III. The substance of study and range

1. Optimization of making AIB to increasing the number of female cow's birth
2. Improvement of efficiency method when making, keeping and implicating
3. Development of AIB inspirator
4. Before artificial insemination, Optimization of exposure time after injection
5. Optimization, comparison and analysis of injection part (cervical plica)
6. Development of optimize for applied field application.
7. Research of birth rate of female cow applied on farmhouse.
8. Take measures and examine about exposure problems when applied field.
9. Examination of reproduction and growth ability
10. Cow production to apply on industrialization using AIB
11. Check improving rate of production possibility when treated with AIB to make frozen semen.

12. Check possibility of improving rate of female embryo when treated with AIB during artificial insemination.

IV. Result of research and development

1. Decided to store AIB at -20°C for long time.
2. Making access steel gun to injection of AIB
3. Development of the AIB injection method to use AI Sheath
4. Create a effective technique when expose AIB during 10min
5. Decided to 5ml injection volume of AIB
6. High conception rate when injection on 2nd~4th fold cervix following research finding
7. Create an effective technique when decided to make 10ml volume of injection titration
8. Don't have application possibility to product in vitro fertilized embryo
9. The expose time of AIB is crucial role to make female calf

V. Plan for research result and application of result

1. Maximization of improvement effect and stable production of high class meat Hanwoo and female calf from high ability dairy cattle
2. Expansion of stable production for high ability dairy cattle and donor of high class meat Hanwoo
3. Base conversion Establishment of specialized high class meat production according to opening market of meat
4. Possible to build specialized brand like fattening up of cow
5. Production of female calf using AIB for advanced registry cattle
6. Product of a shift in generations cow for milch cow and especially easy to shift in generation for high class cow
7. Maximizaion of farm's economic income and income conservation when dairy farm can choose pregnancy
8. Easy to industrialization of build sales network in whole country in short time
9. Preparation for competitive price compare with different method of identify the sex
10. Possible to export any other country in the world who demands on cow

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. The present condition in domestic and foreign countries

Chapter 3. Materials, methods and results

Chapter 4. Accomplishment and contribution to related subjects

Chapter 5. Achievement and plan to contribution

Chapter 6. Information obtained from foreign countries during research

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

국내의 축산산업에서 개량의 중요성은 매우 크다. 산자의 능력은 부모의 유전능력에 많은 영향을 받으며 이는 직접적으로 농가의 이득과 밀접한 관계에 있다. 현재까지 가축개량을 위한 방법으로 널리 보급되어 있는 일반적인 기술이 인공수정 방법이다.

인공수정은 우수한 씨수소의 능력을 충분히 활용하여 원하는 형질의 정액을 선택적으로 선별이 가능하며, 종모축의 이용효율을 증대시켜 가축개량을 촉진할 수 있다. 또한 종모축의 유전력을 조기에 판정할 수 있으며, 아버의 혈통을 분명히 알 수 있어 근친을 피한 계획교배가 가능하다. 그리고 지난해 구제역으로 인한 가축의 살처분으로 인하여 한우와 젃소 개체수가 많이 줄어있고, 특히 낙농을 하는 농가에서는 수컷보다 암컷의 선호도가 매우 높다.

현재 인공수정을 이용한 종모축를 생산에는 많은 어려움이 있으며, 이는 농가에서 원하는 성별을 가진 산자를 선택하여 생산하기 힘들다. 이를 보완하기 위하여 성감별 정자를 이용한 동결정액을 생산하는 방법이 연구되고 있다.

성 감별 정자를 이용한 산자의 생산방법은 sex chromosome의 염색체 분석을 이용한 방법이 이용되고 있는데(King, 1984; Iwaskai and Nakahara, 1990; Sohn et al., 1996), H-Y antigen을 이용한 방법 (Williams, 1986; Utsumi et al., 1996; Yu et al., 1999), 수정란의 발달 속도에 따른 차이를 이용한 방법(Williams, 1986; Avery et al., 1989; Itagaki et al., 1995), male 과 female 수정란의 대사작용을 이용한 X-연쇄 효소를 이용한 방법(Lee et al., 1987), Y-specific DNA의 PCR을 분석하여 생산하는 방법(Agrawala et al., 1992; Kudo et al., 1993; Bredbacka et al., 1995; Itagaki et al., 1996) 그리고 Biopsy의 PCR을 이용하는 방법(Kim et al., 2000, 2003)등이 있어왔다. 최근에, Flowcytometer 방법은 XX와 XY정자를 분리하여 인공수정하는 방법이 사용되고 있다(Johnson, 1991; Abeydeera et al., 1998; Tubman et al., 2004; Wheelera et al., 2006; Cerchiaro et al., 2007).

그러나 이러한 방법들은 수태율과 산자생산의 효율이 낮고, 가격 또한 매우 높게 형성되어 일반농가에서 사용하기에는 부담이 되고 있는 현실이다.

이에 따라 고급육 한우, 고능력 젃소의 암송아지를 안정적으로 생산함으로써 고능력우를 활용한 개량효과를 극대화시키기 위한 방법의 하나로 수정정보조액을 이용한 인공수정은 고능력 젃소 및 고급육 한우 밀소의 안정적인 생산기반 확충을 할 수 있으며, 핵군 및 고급육 한우 밀소의 안정적 공급을 위한 암송아지 생산 비율을 확대함으로써 축산업 기반을 확충할 수 있다. 따라서 본 연구팀에서는 이를 통한 선행연구가 진행되었으며, 암송아지의 생산비율을 향상시키기 위하여 인공수정 시 수정정보조액을 활용하는

방법을 개발하여 고품질 한우 번식우군의 안정적인 생산기반을 확립하고자 하였다.

2. 경제·산업적 측면

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 현재 국내의 인공수정은 동결정액을 이용하여 실시되고 있으며 농가에서 선호하는 형질을 선택적으로 사용하여 개량할 수 있다.
- 산자를 생산하는 방법에는 인공수정 이외에 수정란이식을 통하여 우수한 산자의 생산이 가능하나 수정란을 구입하기가 쉽지 않으며 특히 과배란 방법을 이용한 수정란의 경우 많은 비용 때문에 농가의 부담이 된다.
- 수정란 이식의 경우 성감별법을 통하여 암컷 수정란을 생산할 수 있으나 효율이 떨어지며 국내에 성감별 수정란을 생산하는 곳이 전무하다.
- 과배란을 이용한 수정란 생산방법을 대체하기 위하여 OPU(Ovum Pick-up) 기술이 이용되고 있으나 아직까지 산업화 과정에 있으며, 본 연구실에서만 생산이 가능하다.
- OPU 유래 수정란은 생산 효율이 높다는 장점이 있으나, 성감별 정자를 이용하여 수정란을 생산하는 방법은 연구단계에 있으며 산업화까지는 넘어야 할 과제들이 많다.
- 국내에서는 성감별 정자의 생산이 이루어지고 있으나 소량으로 생산되며, 가격 또한 높으며, 수태율 또한 만족할 만한 수준에 도달하지 못하고 있다.
- 이에 따라 AIB를 이용한 인공수정을 이용하면 우수한 어미의 형질을 이어받은 산자의 암컷 산자를 안정적으로 생산 가능하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내기술개발현황

- 가. 한우 체외 수정란 및 성 감별 수정란 이식에 의한 송아지 생산에 대한 연구를 통하여 성감별 수정란의 수태율을 조사(2008)
- 나. 성감별된 한우 체외수정란의 수정란 이식을 위한 연구(2003)
- 다. 한우 및 젖소에서 H-Y antibodies 및 PCR 등을 이용한 수정란의 성감별과 성감별 수정란의 이식(1998)
- 라. PCR기법에 의한 소 수정란의 성감별(1999)
- 마. 흰쥐 H-Y 항혈청을 이용한 생쥐배의 성감별에 관한 연구(1994)
- 바. X-, Y-정자로 분리된 돼지 액상 및 동결정액 생산과 보급에 관한 연구;액상정액의 보존온도와 기간 및 처리과정에 관한 기술개발 연구(1995)

2절. 국외기술개발현황

- 가. 성감별 정자를 이용한 인공수정(1999)
- 나. 성별의 선택 : X와 Y염색체를 가진 정자를 cytometric에 의한 효율적 선별방법 연구(1999)
- 다. 산자의 생산을 위한 포유류의 정자를 선택적으로 선별(2006)
- 라. 성감별 정자를 이용하여 X염색체를 가진 돼지의 체외수정란 생산(1999)
- 마. DNA의 차이를 기반으로 cytometric 분리에 의하여 X와 Y염색체를 가진 정자의 분리(1995)
- 바. DNA의 reanalysis에 의한 X와 Y정자의 성별비율에 대한 연구(1999)
- 사. 성감별 정자의 체외수정과 인공수정의 방법 개선(1999)
- 아. 가축생산에 있어서 성감별 정자의 활용(1999)
- 자. 과배란을 이용한 수정란 생산에 있어서 성감별 정자의 활용(2006)
- 차. X와 Y염색체 정자의 선별 시 생산량의 증가를 위한 연구(1999)
- 카. 성감별 정자의 상용화에 영향을 미치는 문제점에 관한 연구(1999)
- 타. 가축의 체외 수정란 생산에 성감별 정자 기술의 응용(2006)
- 파. 낙농 생산 시스템에 성감별 정액의 활용(2004)
- 하. 일반 정자와 성감별 정자의 인공수정 시 산자의 생산율에 관한 연구(2005)

거. 홀스타인 종에 성감별 정자로 인공 수정 후 임신율에 관한 연구(2006)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 1차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
수정보조액 제조 최적화	<p>자궁경관 내에서 정자의 운동성을 조절할 수 있는 성분을 이용한 수정보조액의 조성비 결정, 정자의 생존율 및 독성 실험을 실시하고 최적의 주입용량을 결정함. 또한 이들의 장기간 보관할 수 있는 냉동보관 온도 및 기간의 확정이 필요함. 실제 농가에 수송할 때 수송조건의 비교분석 및 체외수정란의 생산 시 활용 가능성 등을 조사함.</p>	<p>수정보조액의 제조를 위해서 자궁 내에서 정자의 운동성을 조절할 수 있는 성분으로 수정보조액의 조성비를 조절하여 제조 완성하였다. 수정보조액이 정자의 생존성, 독성 여부 등을 조사하여 최적의 조성비를 결정하였다. 제조된 수정보조액으로 체내에 주입하는 적정용량을 조사하여 5ml로 결정하였다. 제조된 수정보조액의 장기간 저장은 -20℃에서 보관하는 것이 가장 무난한 것으로 판단되었고, 저장기간은 현재까지 1년까지 별 무리없이 저장이 가능하였다. 농가 현장까지의 수송은 냉동 저장된 수정보조액의 변질을 막기 위해 Styrofoam box에 Dry Ice 또는 얼음을 채워 수송하였다. 체외수정 시 수정보조액을 이용한 암수정란의 생산을 위한 연구는 보완 실험이 더 필요한 것으로 판단된다.</p>
수정보조액 주입기구 최적화	<p>수정보조액을 자궁경관 2-푼벽에 주입하기 위한 주입기구의 개발은 기존의 AI sheath를 활용한 주입기구 set를 자체 제작하여 생산하였다.</p>	<p>수정보조액을 자궁 내 2-푼벽에 안전하게 주입하기 위해서는 주입기구를 개발하였다. 이를 위해 Staal Gun을 자체 제작하여 AI Sheath와 Syringe를 이용하여 완벽하게 수정보조액을 주입할 수 있었다. 이때 기존의 AI sheath는 plastic 재질로서 질과 자궁경관 내에서 자유롭게 조작하기 불가능하여 이를 지탱해 줄 수</p>

		<p>있는 steal gun을 제작하였다 . 이때 자궁경관의 손상을 예방할 수 있을 뿐만 아니라 AI sheath의 자율적인 조작이 가능하도록 Gun의 직경 , 길이, 재질 등을 종합적으로 고려하여 제작하였다. 또한 AI sheath를 장착할 때 자궁경관 내에 주입되는 선단 부위의 오염을 방지하기 위하여 Gun의 손잡이 부분에 AI sheath를 조작할 수 있게 제작하였다.</p>
<p>인공수정 보조액을 이용한 시술 및 암송 야지 생산</p>	<p>수정보조액의 주입기술은 주입 부위, 주입 후 노출시간 등을 조사하였음</p>	<p>수정보조액의 안전한 자궁경관 내 주입을 위하여 2-4축벽 내에 주입을 실시하였다. 실제 대부분의 정자들은 자궁경관 내 함몰부위인 정자저장소에 저장이 되기 때문에 이 부위의 조건을 변화시킴으로서 궁극적으로 정자의 운동성 및 활력도를 조절할 수 있다. 또한 자궁 내에 직접 주입한다면 훨씬 많은 양의 수정보조액을 주입해야 하는 비경제적인 조건이 될 것이다. 자궁경관 내의 조건을 변화시키는데 요구되는 최소한의 시간이 약 10-15분 정도 소요되는 것으로 판단된다.</p>

2. 1차년도 세부연구수행 결과

[제1세부과제] 수정보조액과 주입기 개발 및 암송아지 생산비율 향상기술 개발

○ 수정보조액 제조 최적화

- 자궁경관 내에서 정자의 운동성을 조절할 수 있는 성분을 이용한 수정보조액의 조성비를 결정하고 수정보조액을 처리하였을 때 정자의 생존성과 활력도 등을 통해서 수정보조액의 toxicity 분석하여 최종 농도 및 조성비를 결정하였다. 성분과 농도의 정보는 특허 관계상 공개하지 못하였다.
- 주입량의 결정은 자궁경관에 주입하기 때문에 약 5 ml 정도가 적적 용량으로 판단되었다. 즉, 저장, 수송 및 주입 등의 조건을 종합적으로 고려할 때 5 ml 용량이 가장 적합한 용량으로 판단되었다 (그림 1).



제조 과정



포장 및 저장

그림 1. 수정보조액의 제조과정.

- 수정보조액의 저장온도에 따른 성상변화 및 성능저하 여부를 조사하여 보관조건의 확립을 통해 이용성 확인한 결과 -20°C 이하의 냉동상태로 저장하여 변질을 막고 장기간 저장이 가능할 것으로 판단되었다. 또한 장기간의 저장은 현재까지 약 10개월간 저장한 결과 성분의 변화없이 효과를 발휘하는 것으로 보아 1년 이상 충분히 장기간의 저장도 가능할 것으로 판단된다. 계속적으로 1년 이상 장기간 저장하면서 수정보조액의 효능에 변화없이 사용 가능한 지에 대한 조사가 이루어져야 할 것으로 판단된다 (그림 1).
- 수정보조액의 수송은 냉동된 상태로 수송이 요구되며 이러한 조건을 충족하기 위해서 Styrofoam box 내에 ice pack 또는 dry ice 등과 함께 포장하여 수송을 한 결과 매우 만족

스러운 결과를 얻었고 전혀 문제가 발생하지 않았다. 또한 수송된 후 이들을 -20℃ 냉동보관을 함으로서 지속적으로 저장 및 이용이 가능하였다.

- 체외수정란의 생산에 의한 성비조절이 가능한지를 검토한 결과 체내와 달리 체외에서 수정 보조액에 대한 정자의 내성은 매우 약했고 노출시간에 따라 정자의 생존성이 급격하게 저하되는 경향을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 체외수정란의 성비조절 수정란의 생산에는 한계점이 있는 것으로 판단하였다.
- 수정보조액의 작용 메카니즘은 정자의 활력도(운동성)를 전체적으로 저하시킴으로써 상대적으로 XY 정자의 운동성을 보다 더 저하시키는 영향을 미친다. 이는 궁극적으로 XX정자의 수정 가능성을 상대적으로 증가시키는 결과를 얻을 수 있다. 일반적으로 체외수정에서 빠른 발달단계의 수정란이 XY (숫컷) 수정란의 비율이 매우 높다. 이는 XY정자가 체외수정에서 먼저 수정에 이르게 되며 최종적으로 XY수정란이 분할과 배반포기 배까지 먼저 발달하는 결과를 얻게 되는 것이다. 본 수정보조액은 이러한 사실에서 정자의 운동성을 저하시켜 상대적으로 XY정자의 수정능력을 저하시키고 반대로 XX정자의 수정을 증가시킬 수 있는 것이다. 이러한 기본 메카니즘을 이용하여 체내에서 인공수정에 활용하면 평균 80% 이상의 암송아지를 생산할 수 있는 기술을 개발할 수 있는 것이다. 예비실험에서도 이와 같은 기술로 245두의 송아지(한우 및 젃소)를 생산한 결과 201두(82.04%)의 암송아지를 생산하는 결과를 얻은 바 있다. 즉, 위에서 설명하고 있는 가설을 충족시키면서 원하는 결과를 얻을 수 있는 것이다. 그러나 본 수정보조액은 완전히 XY정자를 죽이거나 제거하는 것이 아니기 때문에 80%를 훨씬 상회하는 암송아지의 생산에는 한계가 있을 것으로 판단된다.
- 본 연구기간에 수정보조액을 이용한 인공수정을 실시한 결과 산자생산은 아직 시기적으로 이르지 못하였고 단지 수정율을 얻을 수 있었다. 또한 한우에서는 실제적인 기술을 하지 못하였다. 왜냐하면 한우 숫 송아지의 가격이 훨씬 높은 상태에서 축주들이 한우 암송아지를 생산하기 위한 연구에 매우 소극적이었다. 그리하여 젃소에서 본 연구를 수행하게 되어 전반적으로 수정율 등이 낮은 것으로 판단된다. 1년차가 연구기간이 끝나고 2년차 연구가 시작되면서 송아지 생산이 가능할 것으로 판단되어 암송아지의 생산비율에 관한 연구결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.
- 2년차에서는 젃소뿐만 아니라 한우에서도 수정보조액을 이용한 인공수정을 실시하고자 한다. 궁극적으로 암송아지의 생산을 위한 최적의 조건을 정립하는데 최선을 다하고자 한다.

○ 수정보조액 주입기구의 개발

- 그림 2에서 보는 바와 같이 수정보조액을 자궁경관에 효과적으로 주입하기 위해서 새로운 주입기구를 개발하였다. 기존의 AI sheath 를 이용하면서 이를 guide 및 지탱해 줄 수 있는 steal Gun을 자체적으로 제작하였다.
- 자궁경관 2-4추체에 주입하기 위해 기존의 인공수정 sheath를 이용하고 이를 고정시킬 수 있는 주입기구(Gun)를 제작하였다. 자궁경관에 직접 주입되는 AI sheath 선단부위는 오염을 방

지해야 할 필요성이 있어서 AI sheath를 Gun 내에 주입할 때 편리함을 도모하기 위하여 그림 2에서와 같이 Gun 손잡이 부위에 홈을 파서 AI sheath 조작할 수 있게 제작하였다. 또한 AI sheath를 Gun 내로 주입할 때는 선단부위의 반대편이 먼저 Gun의 선단부위로 주입하여 장착해야한다.

- 자궁경관 내에 주입해야 하기 때문에 주입기구에 의한 자궁경관의 손상 등을 예방하기 위해 적절한 직경, 길이 및 재질 등을 충분히 고려한 주입기구의 제작하였다. 이때 Gun의 선단부위는 적절한 rounding 주어서 질내에서 뿐만 아니라 자궁경관 내의 조직들에 손상을 입히지 않도록 제작하였다.
- 이러한 개념을 바탕으로 제작한 주입기구를 실제 현장에서 사용할 때 보완해야할 점 등을 확인하여 시술하기 편리하면서 효율적인 주입기구를 제작 완료하였다.
- 향후 수정보조액 및 주입기구의 현장실용화를 위해 주입기구를 대량생산하고 저렴한 가격으로 제작하여 안정적인 생산체계를 구축하였다.

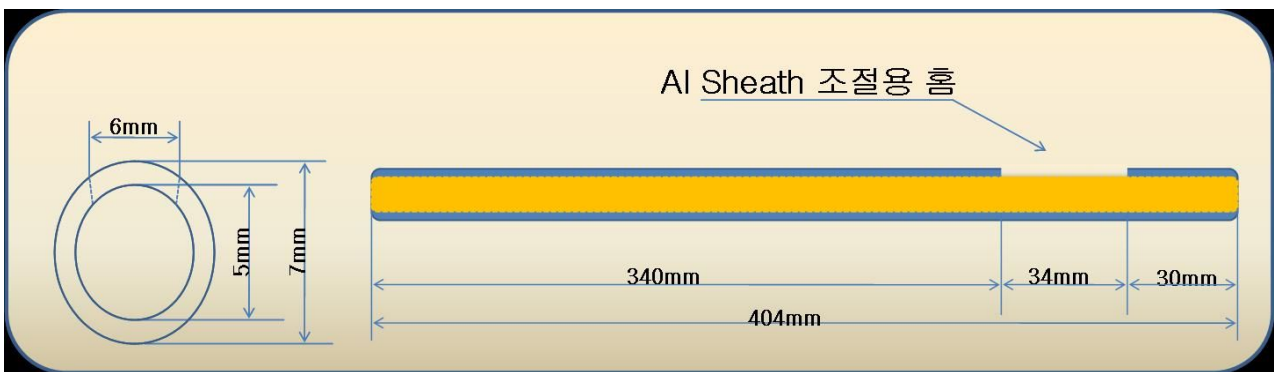


그림 2. 주입기구의 도면과 모형.

○ 수정보조액을 이용한 인공수정기술 확립

- 그림 3에서와 같이 수정보조액의 주입과 약 10-15분 노출시간이 경과한 후 동결정액의 주입 방법 등을 설명하고 있다. 정상적인 발정이 발현된 개체에 수정보조액을 주입하는 방법으로 일반적인 인공수정과 같은 방법으로 주입한다. 다만 수정보조액의 주입부위를 자궁 내가 아니고 자궁경관 2-4주벽 사이에 주입하는 것과 주입 후 약 10-15분 정도 노출시간을 주어 자궁경관의 조건을 변화시킨 후 동결정액을 같은 부위에 주입하는 방법이다. 위에서 수정보

조액의 작용기작을 설명한 것과 같이 반드시 자궁경관에 주입하여야 한다. 또한 동결정액의 주입부위도 수정정보조액의 주입부위와 같은 자궁경관 2-4추벽에 주입하여 그 효과를 배가시켜야 한다.



그림 3. 수정정보조액의 주입과 인공수정 이용방법.

- 냉동보관중인 수정정보조액을 온수에 용해하거나 체온으로 용해하여 주입기구에 장착하여 자궁경관의 2-4추벽에 5 ml 수정정보조액을 서서히 주입한다. 이때 가능한 자궁경관 내에 주입 되도록 세심하게 주의하여야 하며 주입과정에서 자궁경관의 손상을 입히지 않도록 주의해야 한다. 실제 주입 시 AI sheath 만 자궁경관 내에 주입됨으로 Gun에 의한 자궁경관의 손상은 없는 것으로 판단된다 (그림 4).



그림 4. 수정정보조액의 장착과 시술과정.

- 수정보조액을 주입 후 약 10-15분 정도 노출시간이 경과한 이후에 정상적인 동결정액을 이용한 인공수정을 실시한다. 이때 주입부위를 자궁 내가 아니라 수정보조액을 주입한 같은 위치에 정액을 주입하였다 (그림 5).



그림 5. 수정보조액 시술 후 인공수정준비 및 시술과정.

- 이러한 과정에서 수정보조액을 주입하고 노출시간에 따른 수태율 및 암송아지 생산 효율 등은 본 연구의 예비실험에서 10-15분의 노출시간이 가장 효율적이라는 결과를 얻었으므로 최적의 노출시간인 10-15분으로 전 실험을 수행하였다.
- 주입부위를 자궁경관 및 자궁 내에 주입하였을 때의 성적도 비교분석하여 최적의 주입부위의 조사는 예비실험에서 자궁경관에 주입해야 만이 충분한 효과를 얻을 수 있을뿐만 아니라 수정보조액의 소비량도 줄일 수 있었다. 그래서 본 연구에서는 주입부위를 자궁경관 2-4추벽에 주입하는 것으로 결정하여 전 과정을 수행하였다.
- 인공수정 시 사용될 수정보조액의 농도는 본 연구의 예비실험에서 최적의 농도를 찾았으며 특허출원관계로 밝히지 않았다.

○ 수정보조액의 시술에 따른 결과

수정보조액을 이용한 인공수정 시 얻은 수정율의 결과는 표 1, 2, 3에서와 같다. 본 연구에서 젃소를 대상으로 수정보조액을 이용한 인공수정을 실시하였으며, 총 348두에 대해 실시한 결과를 농가별, 산차별, 수정회차별로 분석하였다. 농가별 수정율은 표 1에서와 같이 다양한 수정율을 보이고 있는데 전체적으로 52.1% 수정율을 보이고 있으며 농가별로 36.9% - 74.5%의 성적을 얻었다. 특히 G농가의 경우 36.9% 수정율로서 매우 낮은 성적을 보이고 있는데 이는 사양조건이 결정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 두당 수정횟수는 평균 1.9회로서 농가별 수정율에 따라 두당 평균수정횟수가 변화되는 것을 알 수 있었다. 즉 G농가의 경우 평균수정횟수가 2.7회로서 C농가의 1.3회보다 유의적으로 높은 수정회수를 보이고 있다. 또한 2007-2008년

도에 각 농가별 인공수정율 및 전체 농가의 평균수정율과 수정정보조액을 이용한 인공수정 후 수정율에는 유의적인 차이가 없는 것으로 판단된다. 즉, 이는 수정정보조액을 이용한 인공수정 시에도 수정율의 저하에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

기본적으로 인공수정에 의한 수태율은 다양한 조건들에 의해 영향을 미치는 것으로 판단된다. 농가, 산차, 시술자, 정액종류 및 수정횟수 등이 수정율에 결정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 시술자, 정액종류 등은 무시하고 자료를 분석하였고 농가별, 산차별, 수정회수별로 수정율까지 분석하였다. 본 연구가 시작되고 5월부터 시술을 시작하였지만 임신기간이 있어서 현재까지 분만성적을 확보하지 못 하였다. 아마도 2년차 연구가 진행되는 중에 분만이 이루어져 분만을뿐만 아니라 암/수의 성비, 즉 암송아지의 생산비율에 대한 정확한 정보를 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

표 1. 농가별 인공수정률

농가	두수	수정횟수 (평균 수정횟수/두)	수정정보조액 사용 후 수정률 (%)	2007-2008년도 일반 수정률 (%)
A	45	81 (1.8)	55.6	55.4
B	36	67 (1.9)	53.7	50.7
C	38	51 (1.3)	74.5	83.3
D	66	126 (1.9)	52.4	45.0
E	56	108 (1.9)	51.9	53.9
F	66	124 (1.9)	53.2	44.4
G	41	111 (2.7)	36.9	51.2
계	348	668 (1.9)	52.1	50.6

수정정보조액을 이용한 인공수정 시 산차별 수정율을 조사한 결과는 표 2에서와 같다. 7농가의 자료를 종합 분석한 결과 미경산우를 비롯한 7산차까지 산차별 수정율을 분석하였다. 미경산우에서 67.1% 수정율을 얻었으나 산차가 증가할 수록 수정율이 급격히 낮아지는 성적을 보이고 있다. 특히 3산차 투여 44.0% 까지 낮아진 것을 확인 할 수 있는데 젖소에서 산차가 증가할 수록 수정율이 낮아지는 것은 일반적인 경향과 일치하는 것으로 판단된다. 4, 5, 6, 7산에서는 시술두수가 충분하지가 못해 정확한 분석을 하는 것이 어렵다고 판단되며 전체적인 수정율이 52.1%의 성적은 일반적인 인공수정과 유사한 것으로 판단된다. 전 농가의 수정율을 수정정보조액을 이용한 수정율과 2007-2008년도 수정율 평균과의 비교에서 유의적인 차이를 보이지 않고 유사한 결과를 보이고 있다. 각 산차별 성적에서도 유사한 결과를 얻은 것으로 보아 수정정보조액을 이용한 인공수정 시 수정율에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

표 2. 산차별 수정률

산차별	두수	수정횟수	수정보조액 사용후 수정률 (%)	2007-2008년도 일반 수정률 (%)
미경산우	53	79	67.1	66.7
1산차	111	221	50.2	51.7
2산차	99	193	51.3	48.4
3산차	33	75	44.0	48.1
4산차	24	51	48.0	48.0
5산차	15	28	53.6	45.9
6산차	9	15	60.0	100
7산차	4	6	66.7	50.0
계	348	668	52.1	50.6

표 3에서는 수정회차별 인공수정율을 나타내고 있다. 총 348두에 인공수정을 실시한 결과 1차수정에서 164두가 수정이 되어 47.1% 수정율을 얻었고, 2차, 3차, 4차 및 5차 수정에서 각각 51.6%, 57.3%, 55.3% 및 100% 수정율을 얻었다. 즉, 1차수정에서 수정되지 않고 재발정이 온 개체에 2차수정을 실시하였고, 3차, 4차, 5차 수정도 같은 방법으로 수정을 실시하였다. 전체적으로 52.1% 수정율에서 유의적인 차이가 없었으며, 5차수정에서는 100% 수정율을 보인 것이 특이한 결과였다. 전 농가의 자료를 1, 2, 3, 4, 5차 수정에 따른 수정율을 수정보조액을 이용한 인공수정과 2007-2008년도 수정율과의 비교에서 유사한 결과를 또한 얻고 있음으로써 수정보조액을 이용한 인공수정에 따른 수정율에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

표 3. 수정회차별 수정률

수정횟수	임신두수	재발정 두수	수정보조액 사용후 수정률 (%)	2007-2008년도 일반 수정률 (%)
1차 수정	164	184	47.1	42.0
2차 수정	95	89	51.6	57.8
3차 수정	51	38	57.3	58.3
4차 수정	21	17	55.3	60.0
5차 수정	17	0	100	100
계	348	-	52.1	50.6

3. 2차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
수정보조액을 활용하여 인공수정 시 수태율 향상 기술 확립	수정보조액을 이용한 인공수정 시 수태율에 영향을 미치는 지에 대한 연구를 수행하였다. 자궁경관 내에서 정자의 운동성을 조절할 수 있도록 제조되었는데 주성분은 Tris -buffer에 Arginine과 몇 가지를 첨가하여 제조하였다. 수정보조액을 이용한 인공수정방법은 수정보조액을 주입기구를 이용해 자궁경관 2-4추체에 주입하고 약 10여 분 노출시간 후 일반 인공수정방법으로 동결정액을 이용해 정액을 자궁경관 2-4추체에 주입하였다.	<ul style="list-style-type: none"> . 수정보조액을 이용한 인공수정은 주입기를 이용해 수정보조액 5 mL를 자궁경관 2-4추체에 주입하여 약 10분간 조건의 변화를 유도한다. . 약 10분 후 동결정액을 이용한 일반 인공수정기술로 수정보조액이 주입된 같은 위치에 동결정액을 주입하여 수정을 완료한다. . 5명의 시술자(인공수정사)가 1농가에 352두의 한우 및 젖소에 시술한 결과 수정율은 평균 56.8%로서 일반 인공수정을 55.75%와 유의적인 차이를 보이지 않았다. . 한우와 젖소의 수정보조액을 이용한 수정율비교에서 61.0%와 48.7%로서 한우가 유의적으로 높았다. 이는 젖소의 착유, 사양관리 등에 의한 차이라고 판단된다. 또한 일반 인공수정율과의 비교에서도 유사한 결과를 얻었다. . 수정보조액을 이용한 인공수정의 수정율이 일반 인공수정의 수정율과 차이가 없다는 것은 수정보조액을 이용한 인공수정기술을 현장에 접목이 가능하다고 판단된다. . 농가별 수정율의 차이가 수정보조액을 인공수정이나 일반 인공수정에서도 유의적으로 나타나고 있다. 이러한 결과는 농가별 사양관리체계의 차이가 이러한 결과의 차이를 보이는 것으로 판단된다. . 수정보조액의 제조는 Tris-buffer에 Arginine과 그 외 몇 가지를 첨가하여 제조하였다. 제조 후 -70°C deep freezer에 저장하면서 냉동상태로 수송을 하였고 시술 직전에 용해하여 주입

<p>주입위치 (자궁경관 추벽)의 최적화</p>	<p>수정보조액의 주입위치를 확정하기 위해서 자궁경관 2-4추벽과 자궁경관을 통과한 자궁체에 주입하는 2가지 방법을 비교분석하였다. 수정보조액은 궁극적으로 자궁경관의 조건을 변화시켜 정자의 활력도를 조절하는 것이기 때문에 자궁경관에 주입하는 것이 최선이다. 그러한 현장에서 인공수정사 및 수의사들의 일반 인공수정은 자궁경관을 통과한 자궁체에 주입하는 방법을 사용하고 있기에 수정보조액의 주입위치에 따른 산자생산효율을 비교분석하고자 하였다.</p>	<p>하였다. . 수정보조액의 주입을 위해 자체개발한 주입기구를 활용하였다. 수정보조액을 자궁체 2-4추벽과 자궁체에 주입하는 2가지 방법을 비교하였다. . 생산된 송아지 총 200두 중에서 자궁경관 2-4추벽에 주입하여 생산된 송아지 148두 중 암송아지는 115 두(77.7%)로서 자궁체에 주입한 31두 (59.6%)보다 유의적으로 높았다. 이러한 결과에서 수정보조액의 주입위치로는 자궁경관 2-4추벽에 주입하는 것이 수정보조액의 효과를 높일 수 있는 것으로 판단된다. . 자궁경관 2-4추벽에 안전하게 주입하기 위해서는 AI sheath를 stainless 주입기구 내로 삽입한 후 약 3 ml공기를 흡입한 후 수정보조액을 AI sheath 내로 주입한다. . 대부분의 정자들은 자궁경관 내 함몰부위인 정자저장소에 저장이 되기 때문에 이 부위의 조건을 변화시킴으로써 궁극적으로 정자의 운동성 및 활력도를 조절할 수 있다</p>
<p>수정보조액의 주입량 최적화</p>	<p>수정보조액의 적정 주입량을 결정하기 위해 2, 5, 10 ml수정보조액을 자궁경관 2-4추벽에 주입하여 수정율 및 암송아지 생산비율을 비교분석하였다. 정자의 저장소인 자궁경관의 조건변화가 가장 효율적인 주입량을 얻고자 하였다.</p>	<p>. 2, 5, 10 ml 수정보조액을 자궁경관에 주입하여 비교분석한 결과 2, 5, 10 ml에서 51.8%, 77.7% 와 76.7% 로 2 ml 영향을 미치지 못하였으나, 5, 10 ml에서는 암송아지의 생산비율이 높게 나와 유의적인 영향을 미쳤다. . 이러한 측면에서 적정 주입량은 5 ml 수정보조액으로 충분한 결과를 얻을 수 있다고 판단된다. . 주입량을 10 ml 이상으로 높이는 것이 암송아지 생산비율의 향상으로 이루어지지 않는다면 주입방법과 용량, 작업능력 및 비용 등을 고려하면 5 ml 주입이 적정량으로 판단된다. . 주입기구를 자궁경관을 통과시킨 후 다시 자궁경관 내로 후퇴시킨 후 서서</p>

		<p>히 주입하면서 주입기구를 후퇴시켜 자궁경관 내에 충분히 주입될 수 있게 주입한다.</p>
<p>주입 후 인공수정까지의 노출시간의 최적화</p>	<p>수정보조액의 주입 후 동결정액을 이용한 인공수정까지 어느 정도의 노출시간으로 자궁경관 내의 조건을 가장 효율적으로 변화시킬 수 있고 본 연구목적에 부합하는 조건인가를 알아보고자 5, 10, 15분간 노출시간을 비교 분석하였다.</p>	<p>. 5, 10, 15분간 노출 후 인공수정 시 생산된 압송아지의 비율은 36.8%, 79.2%, 77.2%로서 10분과 15분에서 1분간 노출보다도 유의적으로 높은 압송아지의 생산비율을 얻을 수 있었다. 그러나 10분과 15분간의 노출시간에는 유의차가 없어 10분 정도의 노출시간이 적합하다고 판단된다.</p> <p>. 10분간의 노출시간이 현재의 연구결과 가장 적합하다고 판단되지만 현장에서 수정사, 수의사들이 느끼는 바는 매우 긴 시간으로 불만을 토로하고 있다.</p> <p>. 이러한 노출시간을 최소한으로 줄여줄 수 있는 수정보조액의 농도, 주입량 및 노출시간 등에 대한 최적화가 요구된다.</p> <p>. 한우농가와 젃소농가에는 약간의 차이가 있지만 한우농가에서는 자가인공수정이 이루어지지 않고 있기 때문에 이러한 문제, 노출시간의 최소화가 반드시 이루어져야 할 것으로 판단된다.</p>
<p>농가 현장에서 직접 사용할 수 있는 기술 보급</p>	<p>현장에서 수정보조액을 주입하기 위한 기술적인 문제점은 해결되었다. 즉 수정보조액의 제조, 주입기구의 제작 등을 이용하여 정상적으로 주입하면서 인공수정이 가능하였다. 그러나 지속적인 주입을 위한 주입기구의 오염문제, 노출시간의 문제점 등은 해결되어야 할 부분이다.</p>	<p>. 수정보조액의 시술과정에서 주입기구의 반복적인 사용에 따른 개체간 오염 및 전염 가능성이 제기되어 주입기구를 2개 이상 구비하면서 사용할 수 있게 조치하였고 또한 기존의 일반 인공수정과 같이 sleeve를 사용하여 개체간 전염 가능성을 최소한으로 줄일 수 있게 지도하였다.</p> <p>. 최소한 10분 이상의 노출시간이 요구되는데 시술자들이 느끼는 10분은 매우 긴 시간으로서 노출시간을 최소한으로 줄일 수 있는 방법을 요구하고 있다.</p> <p>. 현장에 시술자들이 느끼는 애로사항을 해결하지 못하면 아무리 좋은 기술 일지라도 현장에 적용되지 못하고 사라지는 것이다. 그래서 본 연구결과를 현장에 효율적으로 접목시키기 위해서는 이러한 애로사항을 반드시 해결해야만 가능할 것으로 판단된다.</p>

4. 2차년도 세부연구수행 결과

[제1세부과제] 인공수정 보조액을 이용한 시술 및 암송아지 생산

○ 수정보조액을 활용한 인공수정 시 수태율 향상 기술 확립

- 수정보조액을 이용한 인공수정 시 수태율에 영향을 미친다면 활용 가치가 없을 것이다. 기존의 인공수정과 수정보조액을 이용한 인공수정 시 수태율에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 비교분석이 필요하다. 표 1에서와 같이 12농가에서 총 352두에 수정보조액을 이용한 인공수정으로 200두가 임신하여 56.8% 수정율을 보였다. 같은 농가에서 전년도 일반 인공수정으로 얻어진 55.7%의 평균 수정율과 차이가 없었다. 즉 이는 수정보조액을 이용한 인공수정에 따른 수정율의 저하에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되어 수정보조액을 이용한 암송아지 생산을 위해 이용 가능할 것으로 판단된다.

표 1. 수정보조액을 이용한 농가별 인공수정 후 임신율의 비교

농가	AI 시술 두수	수정보조액 이용한 수정율 (%)	2009년도 일반 인공수정 수정율 (%)	비고
A	27	17 (62.9)	61.2	
B	33	18 (54.5)	52.0	
C	34	18 (52.9)	54.1	젖소
D	30	14 (46.6)	48.3	
E	45	23 (51.1)	45.7	젖소
F	21	13 (61.9)	57.0	
G	19	12 (63.1)	60.4	
H	28	14 (50.0)	49.2	
I	26	20 (76.9)	72.5	
J	29	22 (75.8)	71.1	
K	18	11 (61.1)	58.5	
L	42	18 (42.8)	39.0	젖소
계	352	200 (56.8)	55.7	

- 한우와 젖소의 수정율 비교분석에서 한우(61.0%)가 젖소(48.7%)보다 유의적으로 높은 성적을 얻었다. 이는 착유와 사육환경에 따른 결과로 판단되며 일반 인공수정에서도 유사한 결과를 얻은 것으로 보아 대체적으로 한우의 수정율이 높은 것으로 판단된다. 또한 농가별 수정

율의 차이를 보이고 있는데 특히 한우농가(D)와 젃소농가(L)에서 평균 이하의 낮은 수정율을 보이고 있었다. 이는 일반 인공수정과 수정보조액을 이용한 인공수정에서도 유사한 결과를 얻어 수정보조액을 이용했기에 낮은 수정율을 얻은 이유는 아닌 것으로 판단된다. 즉 사육환경과 사양관리체계가 뒤처지는 것인 아닌가 판단된다.

표 2. 젃소와 한우의 인공수정율 비교

품종	AI 시술 두수	수정보조액 이용한 수정율 (%)	2009년도 일반 인공수정 수정율 (%)	비고
젃소	121	59 (48.7)	46.2	
한우	231	141 (61.0)	58.9	
계	352	200 (56.8)	55.7	

- 수정보조액의 제조는 Tris-buffer에 Arginine과 그 외 몇 가지 다른 성분을 첨가하여 제조하였다. 충분히 녹인 후 적정량을 10 ml tube에 분주하여 봉합한 후 -70°C deep freezer에 저장하였다. 수송은 수정보조액이 냉동된 상태로 수송하였고 시술 직전 체온 또는 온수에 녹여서 주입방법에 따라 주입을 실시하였다.

○ 주입위치(자궁경관 추벽)의 최적화

- 수정보조액의 주입위치를 확정하기 위해서 자궁경관 2-4추벽과 자궁경관을 통과한 자궁체에 주입하는 2가지 방법을 비교분석하였다. 수정보조액은 궁극적으로 자궁경관의 조건을 변화시켜 정자의 활력도를 조절하는 것이기 때문에 자궁경관에 주입하는 것이 최선이다. 그러한 현장에서 인공수정사 및 의사들의 일반인공수정은 자궁경관을 통과한 자궁체에 주입하는 방법을 사용하고 있기에 수정보조액의 주입위치에 따른 산자생산효율을 비교분석하고자 하였다. 표 3에서와 같이 자궁경관 2-4추벽에 주입하여 생산된 송아지 중에서 암송아지는 115두로서 77.7%로서 자궁체에 주입한 31두(59.6%)보다 유의적으로 높았다. 이러한 결과에서 수정보조액의 주입위치로는 자궁경관 2-4추벽에 주입하는 것이 수정보조액의 효과를 높일 수 있는 것으로 판단된다.

표 3. 수정보조액의 주입위치별 생산된 송아지의 성비 비교

주입위치	송아지 성비		
	암송아지 (%)	수송아지 (%)	총 두수
자궁경관 2-4추벽	115(77.7)	33(22.3)	148
자궁체	31(59.6)	21(40.4)	52
계	146(73.0)	54(27.0)	200

- 수정정보조액을 이용한 인공수정 시 자궁경관에 안정적으로 주입하기 위해서 개발된 주입기를 활용하면 자궁경관의 손상없이 안전하게 주입할 수 있다. 그림 1에서와 같이 본 연구실에서 개발 제작한 수정정보조액 주입기구의 장착은 기존의 AI sheath를 stainless 주입기구 내로 삽입한 후 약 3 ml 공기를 흡입한 후 수정정보조액을 AI sheath 내로 주입한다. 이때 자궁경관 내로 주입될 AI sheath 끝 부분의 오염을 방지하기 위해 수정정보조액 주입기구 연결부위에 흡을 파서 AI sheath 를 주사기와 연결시킬 수 있게 제작하였다. 또한 주입기구 끝 부분에 약 5 cm 정도 AI sheath 가 노출될 수 있게 크기를 조절하여 실제 자궁경관 내에 주입되는 부분은 AI sheath 만 노출되게 하였다. 이러한 조건에서 AI sheath 는 구부러지거나 휘어지지 않고 질과 자궁경관 내에서 시술자가 자유롭게 조작할 수 있는 힘을 받게 되는 것이다.



그림 1. 수정정보조액을 주입하기 위한 주입기구의 장착과 자궁경관 2-4추벽에 주입하는 과정.

- 수정정보조액은 Tris-buffer에 Arginine과 그 외 몇 가지를 성분을 첨가하여 자궁경관 내의 조건을 변화시켜 정자의 활력도, 즉 운동성을 조절할 수 있게 하는 것이다. 이러한 성분의 가장 효과적인 기능을 할 수 있는 곳은 자궁경관으로서 실제 정자가 자궁경관 추벽 내에서 저장되면서 장시간의 수명을 유지하고 지속적으로 정자의 상행을 통해서 수정 확률을 높인다. 이때 정자의 활력도, 운동성을 조절할 수 있는 환경에 노출시킴으로서 상대적으로 암정자의 수정확율을 높이는 것이다. 이러한 측면에서 수정정보조액의 주입위치는 자궁경관 2-4추벽이 가장 효율적으로 판단된다.

○ 수정정보조액의 주입량 최적화

- 수정정보조액의 주입위치가 자궁경관 2-4추벽이 자궁체보다 효율적이다. 그리하여 적정 주입량을 결정하기 위해 표 4에서와 같이 2, 5, 10 ml 수정정보조액을 자궁경관에 주입하여 비교분석하였다. 수정정보조액의 주입량에 따른 암송아지의 생산비율은 5, 10 ml에서 77.7%와 76.7%로 유사한 비율을 얻을 수 있었다. 그러나 2 ml 주입량은 어떠한 영향을 미치지 못한 것으로 판단된다. 이러한 측면에서 적정 주입량은 5 ml 수정정보조액으로 충분한 결과를 얻을 수 있다고 판단된다.
- 주입량은 10 ml 이상으로 높이는 것이 암송아지 생산비율의 향상으로 이루어지지 않는다면

주입하는 방법과 용량, 작업능률 및 비용 등을 고려하면 적정량으로 판단되는 5 ml 수정보조액을 주입하는 것이 바람직하다고 판단된다. 그러나 2 ml 수정보조액은 자궁경관 내의 변화를 유도하는데 충분한 량이 되지 못하는 것으로 판단된다.

- 5 ml 수정보조액의 자궁경관 내 주입을 위해 가장 효과적인 방법은 2-4 추벽에 충분히 노출될 수 있도록 주입해야 한다. 즉, 주입기구를 자궁경관을 통과시킨 후 다시 자궁경관 내로 후퇴시킨 후 서서히 주입하면서 주입기구를 후퇴시켜 자궁경관 내에 충분히 주입될 수 있게 주입한다. 이때 자궁체나 질내에 수정보조액이 일부 유출될 수 있으나 큰 문제는 되지 않고 가능한 많은 량의 수정보조액이 자궁경관 내에 주입될 수 있도록 주입하는 것이 최선의 방법이다.

표 4. 수정보조액의 적정 주입량의 비교분석

주입량 (ml)	송아지 성비		
	암송아지 (%)	수송아지 (%)	총 두수
2	14 (51.8)	13 (48.2)	27
5	42 (77.7)	12 (22.3)	54
10	23 (76.7)	7 (23.3)	30
계	79 (71.2)	32 (28.8)	111

○ 주입 후 인공수정까지의 노출시간의 최적화

- 수정보조액의 주입 후 동결정액을 이용한 인공수정까지 어느 정도의 노출시간으로 자궁경관 내의 조건을 가장 효율적으로 변화시킬 수 있고 본 연구목적에 부합하는 조건인가를 알아보하고자 5, 10, 15분간 노출시간을 비교/분석하였다. 표 5에서와 같이 5, 10, 15분간 노출 후 인공수정 시 생산된 암송아지의 비율은 36.8%, 79.2%, 77.2%로서 10분과 15분에서 5분간 노출보다도 유의적으로 높은 암송아지의 생산비율을 얻을 수 있었다. 그러나 10분과 15분의 노출시간의 비교에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 측면에서 수정보조액의 주입 후 동결정액으로 인공수정의 실시는 약 10분간 노출을 유도한 후에 실시하는 것이 효과적일 것으로 판단된다.

표 5. 수정보조액의 노출시간이 산자생산의 성비에 미치는 영향

노출시간 (min)	송아지 성비		
	암송아지 (%)	수송아지 (%)	총 두수
5	12 (63.2)	7 (36.8)	19
10	38 (79.2)	10 (20.8)	48
15	17 (77.2)	5 (22.8)	22

계	67 (75.2)	22 (24.8)	89
---	-----------	-----------	----

- 현장에서 수정사와 수의사들이 농가에서 수정보조액을 이용한 인공수정에서 가장 애로사항을 느끼는 것이 바로 노출시간이다. 즉 주입에 따른 기술적인 것은 전혀 문제가 되지 않으나 수정보조액을 주입 후 최소 10분 정도 노출시간이 필요하다는 것은 시술자들에게 어려움으로 느껴지는 부분이다. 왜냐하면 한 농장에서 시술 후 다른 농장으로 이동을 해야 하는데 노출시간을 지키기 위해 기다려야 하는 것이 시술자들에게 어려움이 되는 것이다. 이러한 문제를 해결할 수 있는 방법은 노출시간 만큼을 시술비에 보상을 해주는 방법과 노출시간을 줄일 수 있는 대안을 찾는 것이다.
- 그러나 현재 수정보조액의 농도를 높여서 노출시간을 최소한으로 줄일 수 있는 방법을 찾기 위한 보완실험이 필요하다. 사육농가가 직접 주입하는 방법은 노출시간을 지킬 수 있는 즉 가장 정확한 방법으로 수정보조액을 주입할 수 있지 않을까 판단된다. 그러나 젖소의 사육농가에서는 이러한 자가 인공수정이 가능하지만 한우 사육농가에서는 거의 불가능하기 때문에 실제 현장에서 적용하는 데는 한계점이 있는 것이 사실이다.

○ 수정보조액을 이용한 체외수정란 생산에 활용 가능성

- 수정보조액을 이용하여 암컷 체외수정란의 생산도 가능한지를 알아보려고 본 실험을 수행하였다. 체내에서의 조건 변화에 따른 암송아지의 생산은 가능하였는데 이러한 원리를 체외수정란을 생산하는데도 적용이 가능하다면 매우 효율적으로 활용할 수 있을 것으로 판단되어 실시하였다. 표 6에서 보는바와 같이 수정보조액을 이용한 체외수정란의 생산은 적용이 불가능하였다. 즉 체내에서의 조건변화는 가능하지만 체외에서는 정자와 수정란의 생존에 좋지 못한 영향을 미쳤다. 특히 정자의 생존에 나쁜 영향을 미쳐 수정율이 매우 저조하였다. 이러한 측면을 고려하면 차기년도에 수정보조액의 농도를 다양하게 조절하면서 체외수정의 적정 조건을 정립하는 것도 중요할 것으로 판단된다.
- 수정보조액을 처리한 수정율 및 배반포 발달율에 대한 성적은 표 6에서와 같다. 대조구에서 분할율과 배반포 발달율은 80.1%와 30.3%인데 반해 수정보조액의 처리구에서는 39.5%와 5.3%로서 유의적으로 낮았다. 이러한 이유는 체외수정 시 수정보조액의 처리에 따른 정자의 사멸이 매우 높게 나타났다. 즉 수정보조액의 처리에 따른 정자의 운동성에 영향을 미치는 것이 아니라 생존에 영향을 미치는 결과였다.
- 이러한 측면에서 수정보조액을 이용한 체외수정란의 생산에 활용하기 위한 방법을 찾기 위해서는 적정 농도와 노출시간의 조절에 대한 체계적인 추가 연구가 필요하다고 판단된다. 또한 이렇게 처리된 조건에서 생산된 수정란의 성비를 PCR을 이용한 분석을 한다면 수정보조액을 암컷 체외수정란생산에 활용할 가능성을 찾을 수 있을 것으로 판단된다.
- 그러나 체내에서와 달리 체외에서는 우리가 원하는 정자의 조건변화 결과를 얻을 수 있을지는 장담할 수 없는 실정이다. 이러한 내용들에 대한 추가연구를 차기년도에 심도있게 시도해 볼 필요성이 강하게

있다고 판단된다.

표 6. 수정정보조액 처리에 따른 수정란 생산 효율 비교

Type of treatment	No. of oocytes	No. of embryo cleaved (%)	No. of blastocyst at day 7 (%)
Control	287	230 (80.1)	87 (30.3)
AIB	225	89 (39.5)	12 (5.3)

* AIB (Artificial insemination buffer; 수정정보조액).

* AIB 농도는 AI에 이용한 같은 농도를 사용하였음.

[제2세부과제] 수정정보조액을 이용한 시술 및 암송아지 생산

○ 농가 현장에서 직접 사용할 수 있는 기술 보급

- 수정정보조액을 이용한 인공수정의 현장적용에 필요한 기술은 정립되었다. 이를 위해서 요구되는 주입기구, 수정정보조액의 자체 제작생산을 하게되었으며 실제 현장에서 수정사 및 수의사들이 시술하는 과정에서 제기되었던 여러가지를 문제점들을 해결하여 현장에서 수정정보조액을 주입하면서 인공수정의 시술은 큰 문제가 없는 것으로 판단된다.
- 수정정보조액의 시술과정에서 주입기구의 반복적인 사용에 따른 개체간 오염 및 전염 가능성이 제기되어 주입기구를 2개 이상 구비하면서 사용할 수 있게 조치하였고 또한 기존의 일반 인공수정과 같이 sleeve를 사용하여 개체간 전염 가능성을 최소한으로 줄일 수 있게 지도하였다. 수정정보조액을 이용한 인공수정도 기존의 일반 인공수정기술과 같고 단지 주입기구의 약간의 차이점이 존재하기 때문에 이러한 기존의 기구들을 충분히 활용할 수 있는 것이다. 이러한 측면에서 수정정보조액을 이용한 인공수정의 확대 보급에는 큰 문제가 없는 것으로 자체 판단하고 있다.
- 그러나 현장에서 시술자들이 제기하고 있는 노출시간에 대한 문제점은 아직 해결하지 못한 상태이다. 즉 본 연구에서 최소한 10분 이상의 노출시간이 요구되는데 시술자들이 느끼는 10분은 매우 긴 시간으로서 노출시간을 최소한으로 줄일 수 있는 방법을 요구하고 있다. 그리하여 차년도 연구에서는 수정정보조액의 농도를 조절하여 노출시간을 최소한으로 줄여줌과 동시에 자궁경관의 변화를 유도하는데 효과적인 조건을 찾는 데 집중적인 연구가 필요하다고 판단된다.
- 현장에 실용화에 가장 큰 걸림돌은 이러한 노출시간이라고 판단된다. 실제로 수정사 및 수의사들이 지적하는 부분이었다. 즉 한 농장에서 여러 개체를 동시에 시술한다면 문제가 없지만 단지 1두와 같이 적은 수를 시술한다면 수정정보조액의 주입 후 최소한 10분간의 노출시간은 매우 긴 시간으로 느낄 수 있을 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 차년도에 노출시간을 최소한으로 줄일 수 있는 방법을 찾는 것은 매우 중요한 과제라고 판단된다.
- 현장에 시술자들이 느끼는 애로사항을 해결하지 못하면 아무리 좋은 기술 일지라도 현장에 적용되지

못하고 사라지는 것이다. 그래서 본 연구결과를 현장에 효율적으로 접목시키기 위해서는 이러한 애로 사항을 반드시 해결해야만 가능할 것으로 판단된다.



그림 2. 수정정보조액을 이용한 암송아지 생산.

- 암소 밀소를 생산하고자 하는 농가에서는 수정정보조액을 이용한 인공수정을 실시하고자 많은 요구가 있는 실정이다. 특히 젓소 사육농가에서는 젓소 밀소의 부족현상으로 암송아지의 생산하고자 하는 욕구가 강해 구제역 파동으로 더욱더 많은 요구가 있는 실정이다. 그리하여 수정정보조액을 제공하고는 있지만 농가를 직접 만나 교육시키지는 못하고 수정정보조액을 전달만 하고 있는 실정이다.

5. 3차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>수정보조액 이용한 인공수정 시 암송아지 생산비율 향상 기술 확립 및 연관성 분석</p>	<p>본 연구실에서 제조된 수정보조액을 deep freeze에 보관하면서 필요 시 현장에 공급하였다. 3차년도에는 한우와 젃소농가에 기술을 하였다. 대부분 한우농가는 전문기술자(수정사, 수의사)들에 의해 기술되었고, 젃소농가들은 자가 인공수정을 실시하는 농가에 기술되었다. 농가 당 약 50-100개의 수정보조액을 공급하여 기술되었다.</p> <p>기술방법은 일반적인 인공수정방법과 같으나 단지 다른 것은 수정보조액과 동결정액의 주입부위를 자궁체가 아니라 자궁경관의 2-4부위에 주입하는 것과 수정보조액을 주입 후 10-15분간 노출시간을 갖은 후 동결정액을 주입하는 것이 큰 차이점이다.</p>	<p>한우 및 젃소를 이용해 자가 인공수정과 전문 기술자에 의한 인공수정을 182두, 141두에 총 323두에 기술하여 60-90일째 임신감정을 실시하여 53.8 vs. 55.3% 수태율을 얻어 유의적인 차이가 없었다. 구제역의 여파로 겨우5월 말부터 목장에 방문하여 본 연구를 수행할 수 있었다. 그래서 현재(2012.03.31)까지의 산자생산은 매우 적은 숫자로서 한계점이 있었다. 자가 인공수정과 전문가 기술자에 의한 수정으로 암송아지의 생산비율은 74.2% vs. 65.0%로서 자가 인공수정에 의한 암송아지 생산 비율이 높았다. 이와 같은 결과는 전문가 기술자들은 수정보조액의 주입 후 10-15분간의 노출시간의 지키기가 쉽지 않다는 것이며 상대적으로 자가 기술자는 본인의 목장에서 기술하는 관계로 정확한 노출시간을 지킬 수 있었던 것이 큰 차이점이라고 판단된다.</p> <p>지난해 사상 유래가 없는 구제역이 전국적으로 확산되어 농가에 직접 기술을 할 수 있는 조건이 되지 않았을 뿐만 아니라 한우농가에서는 한우가격의 폭락으로 암송아지의 선호도가 떨어져 더더욱 시도하는 것이 매우 어려운 상황이었다. 그래서 첫 시작이 여름철에 시작이 되었고 그 진행상황도 매우 느리게 진행되어 현재까지 산자생산 두수가 매우 낮은 결과를 얻고 있다. 이러한 결과는 천재지변에 의해 어쩔 수 없는 결과로서 평가를 위한 보고서와 달리 최종보고서 작성 시 그동안 얻어진 결과를 정리한다면 좀 더 보완된 결과를 얻을 수 있지 않을까 판단된다.</p>

<p>수정보조액 주입 후 노출시간의 최소화 조건 정립하여 현장적용이 가능한 최적의 방법 개발</p>	<p>수정보조액의 주입 후 5, 10, 15분 동안 노출을 시킨 후 일반적인 인공수정 방법으로 동결정액을 이용하여 자궁경관 2-4주벽에 인공수정을 실시하였다. 현장에서 노출시간의 단축 필요성이 제기되고 있고 실제 시술자들에게는 10-15분간의 노출시간은 매우 장시간으로 여겨질 수 있어 10분 이상의 노출시간을 지키는 것이 어려움이 있었다.</p> <p>수정보조액의 주입은 자체 제작한 수정보조액 주입기구를 이용해서 실시하였다. 현장에서 주입기구에 의한 주입 시 수정보조액이 자궁 내 또는 질부위로 유출될 수 있어 가장 적정한 5 ml 수정보조액을 주입하였다.</p>	<p>냉동보관 중인 수정보조액을 온수나 체온으로 용해하여 수정보조액 주입기에 장착하여 자궁경관 2-4주벽에 주입을 실시하였다. 이때 가능한 자궁경관 내에 주입이 될 수 있도록 신중하게 주입을 하였고 일정 분량의 수정보조액은 자궁 내나 질내로 유출되었다.</p> <p>현장에서 가장 개선책을 요구하는 것이 주입 후 노출시간의 단축이었다. 그리하여 노출시간별 수정율과 암송아지 생산비율을 조사한 결과 5, 10, 15분 노출시간에 따른 수정율은 54.4, 51.4, 55.8%로서 유의적인 차이가 없었다. 그러나 암송아지 생산율에서는 50.0, 70.9, 78.9%로서 10, 15분의 노출시간이 5분간의 노출시간보다 유의적으로 높은 암송아지의 생산율을 보였다. 그러나 10, 15분의 노출시간 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과에서 수정보조액의 주입 후 자궁경관의 변화를 위해서는 최소한 10분 이상의 노출시간이 필요한 것으로 판단된다.</p> <p>현장에서 전문 시술자들은 노출시간을 최소한으로 줄여줄 수 있는 방법을 요구하고 있으나 현재까지의 연구결과에서는 10분까지 노출이 요구되는 것으로 판단되며 5분으로 줄였을 경우 수정율에는 유의적인 차이가 없었으나 암송아지의 생산에서는 유의적으로 저조한 생산율로서 현장에 적용 가능성이 없었다. 이러한 결과에서 향후 이러한 현장에서의 문제점을 개선하는 기술개발이 요구되는 것으로 판단된다.</p>
<p>수정보조액의 체외수정란 생산 가능성 검토</p>	<p>수정보조액을 이용한 암수정란의 생산 가능성을 조사하기 위해 수정보조액의 농도별, 노출시간별 정자의 생존성과 체외수정 후 수정율 및 배발</p>	<p>수정보조액을 이용한 체외수정란 생산에서 암컷 수정란의 생산비율을 높일 수 있는가를 조사하기 위해 AIB 농도에 따른 정자의 생존율과 노출시간을 찾고 최적의 조건으로 정자처리 후 체</p>

	<p>달을 등을 비교분석하였다. 대조군과 AIB 10%, 25%, 50% 농도와 10분, 20분, 40분, 60분 노출시간에 따른 정자의 생존율을 조사하였다. 또한 10% 10분, 25% 10분간 노출 후 생사염색을 통한 정자의 생존율을 조사하였고 최적의 농도와 노출시간이 10% AIB 농도와 10분간의 노출시간 후 체외수정란의 분할율, 배반포 발달율을 조사하였다. 이렇게 생산된 수정란을 Y-specific primer 이용한 PCR로 성비를 또한 조사하였다.</p>	<p>외수정 후 분할율과 배반포 발달율을 비교분석하였다. AIB 10%, 25% 50% 농도를 10, 20, 40, 60분간 노출하여 정자의 생존율을 확인한 결과 AIB 10% 10분간 노출하였을 때 30-40% 생존율을 얻었다. 그 외의 처리구에서는 생존율의 급격한 저하로 거의 사멸되었다. 생사염색의 결과 10% 10분 노출에서 51.9%, 25% 10분간 노출에서 23.9% 생존율을 얻었다. 그리하여 10% AIB 농도에서 10분간 처리구와 대조구로 체외수정란생산을 시도한 결과 분할율에서는 71.6%와 83.3%로서 유의적인 차이가 없었으나 배반포 발달율에서는 20.1%와 35.3%로서 유의적인 차이를 보였다. 이렇게 생산된 배반포 수정란을 이용하여 y-specific primer 를 이용한 PCR로 sexing 분석을 한 결과 암컷 수정란의 비율이 66.7%로서 유의적인 차이를 보였다. 그러나 체외수정 후 이식 가능한 발달단계인 배반포기 배까지의 발달율이 대조구에 비하여 저조하여 실제 수정란을 생산하여 이식하기 위해서는 AIB 농도 및 처리방법 등의 개선이 필요한 것으로 판단된다.</p>
<p>수정보조액을 이용한 인공수정의 산업화 가능성 검토를 위해 현장에서 간편하게 인공수정 가능한 적합한 주입부위의 결정(자궁경관 vs. 자궁내 비교분석)</p>	<p>수정보조액의 주입부위에 따른 수정율과 암송아지의 생산율을 비교분석하여 이들 기술의 산업화를 꾀하고자 하였다. 기존의 인공수정에서는 자궁경관보다 자궁내, 즉 자궁체나 자궁각에 정액을 주입하는 방법으로 시술을 하였다. 본 연구과제에서는 자궁경관에 수정보조액 뿐만 아니라 정액도 같은 부위에 주입해야 하는 것으로 전문 시술자들의 의구심을 많이 가졌다. 그리하여 자</p>	<p>기존의 인공수정은 자궁경관이 아니라 자궁경관을 통과한 자궁체 및 자궁각에 주입하는 방법을 사용하고 있다. 그러나 본 연구과제에서는 자궁경관에 주입함으로써 자궁경관의 조건을 변화시켜 암정자의 상대적인 운동성을 높여 수정율을 높이는 방법이다. 그러나 기존의 방법을 시술하고 있는 시술자들은 자궁경관에 주입하는 것에 대한 거부감이 높았다. 자궁경관과 자궁내에 각각 32쌍과 7쌍에 인공수정을 실시하였다. 수정율은 54.5 vs. 51.3%로서 유의적인 차이가 없었다. 그러나 암송아지의 생산율에는 70.6% vs.</p>

	<p>궁경관과 자궁 내에 주입에 따른 수태율과 암송아지 생산율을 비교분석하여 가장 효율적인 방법을 찾고 산업화를 기하고자 하였다.</p>	<p>53.8%로서 자궁경관에 주입하는 것이 유의적으로 높은 암송아지의 생산율을 얻었다. 수정조액의 주입량이 5 ml 정도로서 자궁경관에 주입하는 것에는 충분한 용량이지만 자궁 내에 주입용량으로는 불충분할 뿐만 아니라 자궁경관의 다양한 이로운 점을 십분 활용하는 측면에서 자궁경관에 주입을 하게되었다.</p> <p>이와같은 결과에서 자궁경관에 주입하는 것이 실제 암송아지의 생산에서 반드시 지켜져야 할 요인으로 판단되며 자궁 내에 주입했을 때에는 암송아지의 생산율을 해상을 기대할 수 없었다.</p> <p>자궁경관의 다양한 기능 중에서 오염미생물과 비정상적인 정자의 filtering 기능 및 정자의 수명을 연장시킬 수 있는 정자 저장소 등의 기능을 가지고 있다. 이러한 유리한 점을 충분히 활용하는 인공수정방법에 수정조액을 이용하여 암송아지의 생산율을 증가시키는 방법의 개발은 후보축의 확보를 위한 방법으로 매우 긴요하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.</p>
<p>농가 현장 적용 시 노출되는 문제점 개선책 마련. 특히 주입부위에서 자궁경관과 자궁 내에서 수정조액과 인공수정에서 편리성, 수정율 등에 대한 비교분석으로 현장적용에 가장 적합한 조건 확립</p>	<p>수정조액을 이용한 암송아지 생산을 위한 인공수정방법에서 현장에서 개선해야 할 점을 파악하고 가장 효율적인 방법을 찾고자 하였다. 이러한 것들 중에서 노출시간, 주입부위 및 주입기구에 의한 주입방법의 편리성 등을 현장에서 요구하였다. 이러한 방법에서 가장 효율적이고 수태율과 암송아지 생산율을 높일 수 있는 방법을 찾고자 주입기구의 개선, 주입부위의 결정, 주입량의 확정, 노출시간의 단축 가능성 등을 검토하여 최선의 방법을 찾고자 하였다.</p>	<p>기존의 인공수정에서는 정액을 직접 자궁 내에 즉 자궁체나 자궁각에 주입하는 방법을 이용한다. 그러나 이러한 과정에 다양한 오염원이 자궁 내로 진입될 수 있고 자궁 내막의 상처를 입힐 수 있다. 자궁경관에서는 점액과 정자 저장소 등의 기능을 가지고 있음으로써 인공수정과정에서 오염원의 차단과 정자의 저장으로 수명의 연장 등의 기능을 가질 수 있다. 그리하여 수정조액의 주입을 자궁경관으로 하였고 실제 주입량을 증가시켜 많은 양을 자궁 내에 주입한다면 정자의 저장기능이 거의 없기 때문에 본래의 목적을 달성하기 어려울 것이다. 또한 주입량을 몇배 이상으로 늘려야 하기 때문에 경제성이 없을 수 있을 것이다.</p> <p>주입 후 노출시간은 가장 직접적인 영향을</p>

		<p>미치는 것으로 판단된다. 최소 10분 이상의 노출시간이 요구되면 그 이하, 즉 10분으로 단축시켰을 때 수정율에는 유의적인 차이가 없었으나 암송아지의 생산율에는 유의적인 차이가 있었다.</p> <p>수정보조액의 주입은 AI sheath와 AIB주입기구를 이용해서 누구나 쉽게 주입이 가능하며 오염과 상처 등의 염려가 전혀없이 활용할 수 있는 기술과 기구를 개발하였다. 이와같은 기구와 방법 등의 기술로 수정보조액의 자궁경관 2-4층벽에 주입하여 10분 이상의 노출시간이 경과한 후에 일반적인 인공수정 방법으로 같은 부위에 정액을 주입하여 74% 정도 암송아지를 생산할 수 있는 기술을 개발 정립하였다. 이러한 기술들은 궁극적으로 우수한 후보축을 생산하는 방법으로 적극적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.</p>
--	--	--

6. 3차년도 세부연구수행 결과(자유기술)

[제1세부과제] 인공수정 보조액을 이용한 기술 및 암송아지 생산

- 지난해 전국적인 구제역이 만연하여 한우 및 젃소농가의 엄청난 피해와 국가적인 재앙을 맞이하게 되었다. 이러한 상황에서 한우 및 젃소의 비육우 가격의 폭락이 몰아닥쳐 실제 목장을 운영하고 하고 있는 농가의 입장에서 엄청난 고난을 겪고 있다고 하겠다. 이러한 상황에서 본 연구과제를 수행하여 현장에서 그 결과물을 얻어야 하는 입장에서 매우 난감하고 어찌할 바를 몰랐었던 시간이었다. 그러나 다행스럽게도 봄이 되면서 진정되었고 현장에 접근이 가능하여 본 연구과제, 즉 현장에서의 기술을 위한 사업을 진행할 수 있었다.
- 그러나 참여농가수가 급격히 줄어들었고 특히 한우농가에서는 전체적인 소값 하락에 암송아지의 가격이 상대적으로 더 떨어져 암송아지를 생산하기 위한 사업에 참여가 더더욱 어려움을 겪을 수 밖에 없었다. 그리하여 실제 암송아지의 생산이 필요한 젃소사육농가에 이러한 사업을 확대하여 시도하였다. 이러한 측면에서 좋은 비교실험을 수행할 수 있었던 것이 가장 중요한 결과를 얻을 수 있었다.
- 즉 한우에서는 대부분 전문기술자(수정사, 수의사)들에 의해 인공수정이 실시되고 있었으나 젃소목장에서는 거의 대부분 자가인공수정을 기술하고 있어 전문기술자와 자가인공수정사들 간에 노출시간의 비교분석이 가능하였다. 실제 전문기술자들은 시간을 다투는 것이라 한 목

장에서 1두를 시술하는데 15분간 노출시간동안 기다리기가 어려운 점이 있어 정확한 노출시간을 지키는 경우가 매우 드물었다. 그러나 상대적으로 자가인공수정의 경우 본인의 목장에서 시술함으로써 암송아지의 필요에 의해 시술을 하는 경우로서 정확한 노출시간을 충분히 지키면서 시술하여 이러한 노출시간에 대한 정확한 정보를 확보하는 것에 매우 만족스러운 결과를 얻을 수 있었다.

- 전체적으로 전국적, 국가적인 재앙을 맞이하여 현장에서의 결과를 얻는데 많은 어려움이 있었고 특히 한우에서는 한우가격의 하락으로 또한 암송아지의 기피현상으로 더욱 더 본 연구를 수행하는데 어려움이 있는 조건에서 수행하여 전체적인 표본이 적은 숫자임을 밝히고자 한다.

1) 수정보조액을 이용한 인공수정 시 암송아지 생산비율 향상 기술 확립 및 연관성 분석

- 본 연구는 수정보조액을 이용한 인공수정으로 암송아지의 생산비율을 높일 수 있는가는 확인하고자 하였다. 이와 같이 원하는 암송아지의 생산비율을 높일 수 있다는 것은 기존에 개량된 한우 암소로부터 인공수정의 기술로 후보축을 확보할 수 있다는 장점이 있을 것이다. 실제 농가에서 후보축을 받고자 할때 원하는 성의 산자보다 그렇지 못한 반대의 성의 산자를 생산하는 경우 목장의 운영에 지대한 영향을 미칠 수 있기 때문이다. 이러한 관점에서 수정보조액을 이용한 인공수정 시 암송아지의 생산비율을 높이고자 본 연구를 실시하였다.
- 한우와 젖소를 대상으로 자가 인공수정과 전문가 인공수정으로 실시하였는데 표 1에서와 같이 자가 인공수정에서 182두, 전문가 인공수정에서 141두에 시술하여 60-90일에 임신감정을 한 결과 53.8%와 55.3% 임신율을 얻었으나 유의적인 차이는 없었다. 그러나 2012. 03. 31 현재까지 생산된 총 51두의 송아지 중에서 각각 31두와 20두를 생산하였는데 그 중에서 74.2% (22두)와 65.0% (13두)의 암송아지를 생산하여 자가 인공수정에서 전문가 인공수정보다 유의적($P < 0.05$)으로 높은 암송아지의 생산비율을 얻을 수 있었다.
- 이러한 차이는 한우의 경우 대부분 전문시술자들에 의해 수행되어 정확한 노출시간을 지키지 못한 것이 가장 큰 문제로 판단되었으나, 젖소에서는 자가 인공수정에 의해 본 연구 사업이 이루어짐으로서 정확한 노출시간을 지킬 수 있어서 더욱 더 높은 암송아지의 비율을 얻을 수 있었던 것으로 판단된다.

표 1. 수정보조액을 이용한 인공수정에서 산자생산비율

시술형태	시술두수	수태율 (%)	생산된 송아지의 암·수 두수 및 비율 (%)		
			암송아지	숫송아지	총 생산두수
자가 인공수정	182	98 (53.8) ^a	23 (74.2) ^a	8 (25.8)	31
전문가 인공수정	141	78 (55.3) ^a	13 (65.0) ^b	7 (35.0)	20

계	323	176 (54.5) ^a	36 (70.6)	15 (29.4)	51
---	-----	-------------------------	-----------	-----------	----

* 총 생산두수는 2012.03.31 현재까지 생산된 송아지의 자료임.

* 임신감정은 수정 후 약 60-90일 후에 실시한 자료임.

* Values with different superscripts in same column were significantly different ($P < 0.05$).

- 본 연구과제는 지난해 5월 말부터 실제 농가에 시술이 시작되어 2012. 03. 31 현재 보고서 작성 시 산자생산에 관한 데이터를 정리하는데 한계가 있는 것이 사실이다. 그러나 자가 인공수정과 전문가 인공수정에서 실제 수태율에는 유의적인 차이가 없었지만 암송아지의 생산비율에는 자가 인공수정에 의한 시술이 유의적으로 높게 나타났다. 이는 시술 그 자체의 기술적인 것이 아니라 노출시간의 엄격한 적용이 산자의 성비에 결정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.
- 또한 기존의 인공수정사를 비롯한 전문 시술자들은 수정정보조액을 자궁경관에 주입하고 10-15분간 노출시간 후 동결정액도 같은 위치인 자궁경관 내에 주입해야 함에도 주입 후 노출시간을 지키는데 한계가 있었던 것으로 조사되었다. 이러한 현상은 노출시간의 부족으로 실제 암송아지의 생산비율에 결정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.
- 자궁경관에 주입하는 것은 수정정보조액에 의한 자궁경관의 조건의 변화를 유도하여 암정자가 상대적으로 수정될 확률을 높이는 기술이다. 자궁경관의 구조에는 정자저장소(Sperm reserve)의 기능이 있으며 이들에 정자의 저장은 정자의 생존율과 수명을 연장시키는 기능을 하고 있다. 즉 정자의 생존과 수명의 연장에 가장 적합한 조건을 가진 곳이 자궁경관이라는 것이다 (그림 1). 그리하여 본 연구에서 자궁경관의 조건의 변화를 수정정보조액을 이용하여 주었고 실제 이러한 조건은 숫정자의 상대적 활력도를 낮추어 줌으로서 암정자의 수정 가능성을 높여 실제 암송아지의 생산비율을 증가시키는 결과를 얻을 수 있었다.



그림 1. 수정정보조액의 자궁경관 2-4추벽에 주입하는 방법.

- 우수한 암소로부터 후보축을 얻기 위한 수정에서 일반적인 인공수정에서 암송아지를 얻을 수 있는 가능성은 약 50% 전후로 볼 수 있을 것이다. 그러나 후보축의 생산비율을 74.2% 까지 증가시켜서 약 25% 이상 더 높게 암송아지를 생산할 수 있다면 우수한 모축으로부터 후보축의 확보 가능성과 비율을 개선시켜 목장의 경영합리화에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다 (그림 2).



그림 2. 수정정보조액을 이용한 인공수정으로 생산된 송아지(한우)

- 수정정보조액 5 ml를 자궁경관 2-4주벽에 주입하는 것은 어렵지 않다. 그러나 5 ml 수정정보조액을 온전히 자궁경관 내에 머물게 할 수는 없다. 일부는 자궁 내에 또는 질 내로 흘러 내린다. 그러나 이러한 부분은 전혀 문제가 되지 않는다. 자궁 내로 주입되는 것은 자궁경관과 같이 긍정적인 영향을 미칠 수 있기 때문이다. 질내로 유출된 수정정보조액은 궁극적으로 수정에 전혀 영향을 미치지 못하기 때문에 고려대상이 아니다. 그리하여 가능한 질내로 역류되는 것보다는 자궁 내로 유출되는 것이 수정정보조액의 소비를 줄이고 조금이나마 긍정적인 영향을 받을 수 있도록 주입기술을 구사하는 것이 좋을 것이다.

2) 수정정보조액 주입 후 노출시간의 최소화 조건 정립하여 현장적용이 가능한 최적의 방법 개발

- 현장에서 가장 개선이 필요한 사항으로 노출시간의 단축이었다. 왜냐하면 전문 수정사의 경우 한 농장에서 시술 후 다른 농장으로 이동해야 하는데 수정정보조액의 주입 후 10-15분간의 노출시간 동안 기다려야 한다는 것은 매우 긴 시간으로 여겨질 수 있기 때문이다. 그리하여 노출시간을 최소한으로 단축시키면서 수정율과 암송아지 생산율에 영향을 미치지 않는 최적의 노출시간을 조사하였다.

- 수정정보조액의 주입 후 5, 10, 15분간의 노출시간 후 일반적인 인공수정을 실시하였다. 즉 자궁경관에 수정정보조액을 주입하고 5, 10, 15분간 노출시간이 경과한 후에 동결정액을 자궁경관에 주입하는 수정정보조액을 이용한 인공수정을 실시하였다. 표 2에서와 같이 5, 10, 15분의 노출시간에 따른 수태율은 54.4, 51.4, 55.8%의 수태율을 보여 노출시간에 따른 수태율에는 유의적인 차이가 없었다. 그러나 생산된 송아지의 성비는 10, 15분에서 5분보다 유의적으로 높은 암송아지 생산비율을 보였다 (70.8, 78.9% vs. 50.0%; $P < 0.05$). 그러나 10분과 15분의 노출시간 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

- 이러한 결과에서 수정정보조액을 이용한 인공수정에서 암송아지의 생산비율을 높이기 위해서는 반드시 최소 10분 이상의 노출시간이 반드시 필요한 것으로 판단된다. 노출시간을 5분까지 단축시켰을 때는 암송아지의 생산비율에 전혀 영향을 미치는 못하는 경우로서 본 연구의 목적에 부합하기 위해서는 반드시 최소한 10-15분 동안 노출시간을 가지는 것이 반드시 필

요하다는 것이 확인되었다.

표 2. 수정보조액의 노출시간에 따른 암송아지 생산비율

노출시간	시술두수	수태율 (%)	생산된 송아지의 암·수 두수 및 비율 (%)		
			암송아지	숫송아지	총 생산두수
5	57	31 (54.4) ^a	4 (50.0) ^b	4 (50.0)	8
10	146	78 (51.4) ^a	17 (70.9) ^a	7 (29.1)	24
15	120	67 (55.8) ^a	15 (78.9) ^a	4 (21.1)	19
계	323	176 (54.5)	36 (70.6)	15 (29.4)	51

* 총 생산두수는 2012.03.31 현재까지 생산된 송아지의 자료임.

* 임신감정은 수정 후 약 60-90일 후에 실시한 자료임.

* Values with different superscripts in same column were significantly different (P < 0.05).

- 실제 현장에서 노출시간의 단축을 강력하게 요구하고 있었으나 실제 노출시간을 5분으로 줄였을 경우 수정율, 즉 임신율에는 전혀 유의적인 차이가 없었으나 암송아지 생산비율에는 유의적인 차이를 보였다. 그리하여 수정보조액의 주입 후 노출시간의 준수가 암송아지의 생산을 위해서는 절대적인 요인으로 판단된다. 즉 5분으로 노출시간을 줄이는 것은 수정보조액을 이용한 암송아지의 생산방법에서는 가능하지 않았다.
- 그러나 현장에서 전문 시술자들은 노출시간의 단축을 요구하였으나 실제 노출시간의 단축은 암송아지의 생산비율에 절대적인 영향을 미침으로서 반드시 준수해야 할 요인으로 판단된다. 향후 수정보조액의 주입 후 노출시간의 단축을 위한 추가적인 연구가 수행되어 동결정액과 같이 희석하여 주입하는 방법과 최소한으로 노출시간을 줄일 수 있는 방법을 찾는 것이 수정보조액을 이용한 인공수정기술의 산업화에 결정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단되어 이러한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

3) 수정보조액을 이용한 인공수정의 산업화 가능성을 검토를 위해 현장에서 간편하게 인공수정 가능한 적합한 주입부위의 결정(자궁경관 vs. 자궁 내 비교분석)

- 현재 대부분의 인공수정사, 수의사 및 자가인공수정사들의 수정 형태는 동결정액을 자궁경관보다는 자궁경관을 통한 자궁체나 자궁각에 주입하는 방법으로 수정을 시키고 있다. 그리하여 본 사업에 참여하는 전문가 인공수정사의 경우 수정보조액을 자궁경관보다는 자궁 내에 주입하고자 하는 경향이 많았을 뿐만 아니라 자궁경관에 주입할 때 수정보조액이 질부위로 역류되는 것에 대한 염려가 많았다. 또한 정액이 이와 같이 역류되어 수정율의 저하를 염려하는 등의 기존의 수정방법과 달리 자궁경관에 주입하는 것에 대한 의구심이 많았다.

- 실제 수정정보조액은 자궁경관의 조건을 변화시키는 것으로 약 5 ml 정도의 용량으로서 자궁 내에 주입했을 때는 충분하지 않은 양으로 본 연구목적에 적합하지 않는 방법이다. 실제 인공수정 시 자궁경관에 주입함으로써 정자의 수명을 연장시킴과 동시에 지속적인 정자의 상행을 도와 난자와 만날 수 있는 기회의 증가로 수정율을 높일 수 있는 방법이다. 이러한 기술적인 내용과 함께 수정정보조액이 자궁경관의 조건을 변화시킴으로서 암정자가 수정에 참여할 수 있는 기회를 증가시킴으로서 궁극적으로 암송아지의 생산비율을 높일 수 있는 것이다.
- 표 3에서와 같이 자궁경관과 자궁경관을 통과한 자궁체나 자궁각에 주입하는 방법에 따른 수정율(54.5 vs. 51.3%)에는 유의적인 차이가 없었으나 암송아지의 생산비율(70.6% vs. 52.4%)에는 유의적인 차이를 보였다($P < 0.05$). 즉 수정율에는 유의적인 차이가 없이 자궁경관에 주입하는 방법이 더 높은 수태율을 보이고 있었다. 그러나 암송아지의 생산비율은 유의적으로 자궁경관에 주입하는 것이 높게 나타나고 있다. 이러한 결과는 수정정보조액의 주입으로 자궁경관의 조건을 변화시켜 줌으로써 수태율의 저하 없이 암송아지의 생산비율을 높일 수 있는 방법이라는 것을 증명하고 있다. 즉 자궁경관의 조건변화를 일으킬 수 있는 수정정보조액의 적절한 이용으로 암송아지의 생산비율을 인위적으로 조절할 수 있다는 것을 증명하고 있는 것이다.
- 실제 현장에서 활용되고 있는 수정방법인 자궁 내에 주입하는 것보다 자궁경관에 주입하는 것이 유리할 수 있다. 자궁경관은 정자의 저장소를 가지고 있음으로써 정자의 수명을 연장시켜 줄뿐만 아니라 자궁 내에 주입함으로써 주입과정에 자궁 내를 오염시킬 수 있고 또한 자궁 내막의 손상으로 수정 자체를 실패에 이룰 수 있기 때문이다. 그러나 자궁경관에 주입하면은 생존정자의 활력과 수명의 연장 및 오염원과 죽은 정자 등의 차단 효과를 또한 볼 수 있기 때문이다.

표 3. 수정정보조액의 주입위치에 따른 수태율과 암송아지 생산비율

주입위치	시술 두수	수태율 (%)	분만율 및 암송아지 생산비율		
			암송아지	수송아지	총 산자수
자궁경관	323	176 (54.5) ^a	36 (70.6) ^a	15 (29.4)	51
자궁 내	72	37 (51.3) ^a	7 (53.8) ^b	6 (46.2)	13
계	395	213 (53.9) ^a	43 (67.2) ^a	21 (32.8)	64

* 총 생산두수는 2012.03.31 현재까지 생산된 송아지의 자료임.

* 임신감정은 수정 후 약 60-90일 후에 실시한 자료임.

* Values with different superscripts in same column were significantly different ($P < 0.05$).

4) 수정정보조액의 체외수정란 생산 가능성 검토

- 체외수정란의 생산 시 AIB solution을 이용한 암컷 수정란의 생산비율을 증가시킬 수 있는지에 대한 연구를 위해 표 4와 같이 AIB solution, 1/2 solution, 1/4 solution 농도로 체외수

정 시 정자처리 및 체외수정을 유도하였다. 2년차에서는 수정율과 배반포발달율에서 유의적으로 AIB solution 처리구에서 낮은 결과를 얻어 실제 체외수정란의 생산 자체가 불가능하였다. 그리하여 AIB solution 농도를 줄여서 정자 및 수정란에 대한 영향을 줄여줌으로서 얻을 수 있는 결과를 얻고자 하였다.

- AIB를 이용한 체외수정란 생산으로 암컷 수정란의 생산비율을 증가시킬 수 있는가에 대한 연구를 위해 AIB 10, 25, 50%의 농도로 정자의 생존율을 검사한 결과 표 4에서와 같이 10% AIB 농도로 10분까지 약 30-40% 생존율을 나타냈고 다른 처리구의 AIB 농도에서는 사멸하였다. 이러한 결과는 AIB의 높은 농도에 직접적인 처리는 정자의 생존에 결정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 그리하여 최소 농도인 10% AIB 농도에서 10분간 정자처리를 하는 것이 체외수정에 공시할 수 있는 조건으로 판단되었다. 이와 같은 결과에서 AIB를 체내에 주입하여 자궁경관의 조건을 변화시키는 것은 가능하나 직접적인 노출에 대한 생존율에 직접적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 체외수정란의 생산을 위한 실험에서는 처리구 중에서 10% AIB 농도에 10분간 노출을 선택하여 이후의 실험에 활용하였다.

표 4. AIB 농도와 처리시간에 따른 정자의 생존율 비교

AIB conc. (%)	Sperm motility depend on exposed time (min)			
	10	20	40	60
10	30-40%	x	x	x
25	x	x	x	x
50	x	x	x	x

- 정자의 생사염색으로 정자의 생존율을 확인한 결과는 표 5에 서와 같다. 10% AIB에 10분간 노출시켰을 때 51% 생존 정자를 확인할 수 있었던 반면 25% AIB에 10분간 노출시켰을 때는 24% 급격히 줄어드는 경향을 보였다. 즉 이와 같이 AIB의 농도가 높아질수록 정자의 생존율에는 급격한 저하를 나타내는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 그림 3과 같이 Eosin B 염색으로 정자를 counting 하여 확인하였는데 사멸정자는 정자의 두부를 △표시하였고, 생존정자는 ○로 표시하였다. IVF를 위한 용해 후 정자처리과정 중 washing 단계에서 단계적인 AIB처리 결과 10% 이상의 AIB 처리는 정자의 생존을 급격히 감소시키며, 운동성이 거의 0에 가깝게 떨어졌다. 따라서 AIB를 IVF에 적용하기 위한 최적의 농도는 10% AIB이고, 처리시간은 10분으로 결정하여 이후의 체외수정란 생산을 위한 실험을 수행하였다.

표 5. AIB 농도와 처리 시간에 따른 Eosin B를 이용한 생사 염색

AIB Conc. & exposed time	No. of live and dead sperms counted (total sperm)	% of live sperms
10%, 10 min	192/185 (377)	51.9
25%, 10 min	76/241 (317)	23.9

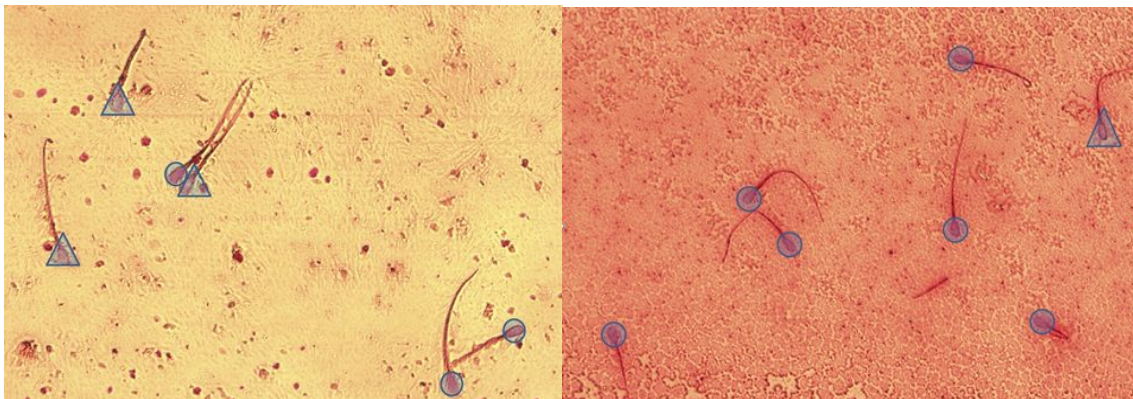


그림 3. AIB 처리에 따른 정자의 생산염색 시 정자의 염색상태. ○: live sperm, △: dead sperm. (좌) 10% AIB 10분, (우) 25% AIB 10분 처리

- 10% AIB 농도에서 10분간 정자처리를 하여 체외수정을 실시한 결과는 표 6에서와 같다. 일반정액과 AIB 처리에 따른 체외수정란 생산에서 분할율은 83.3% vs. 71.6%로서 유의적인 차이가 없었다. 그러나 배반포 발달율은 일반정액에서는 35.3%, AIB 처리 정액에서는 21.1%의 배발달율을 보여 유의적인 차이를 보였다. 즉 AIB 처리에 따른 체외수정란의 생산에서 분할율에는 유의적인 영향을 미치지 않았으나 배반포 발달율에는 유의적인 차이를 보여 이식 가능한 체외수정란의 생산에는 한계를 가지고 있는 것으로 판단된다.

표 6. AIB 정자처리에 따른 체외수정란생산 효율 비교

Sperm treatment	No. of presumed zygotes	No. of embryo cleaved (%)	No. of blastocysts at day 7
AIB treated	134	96 (71.6)	27 (20.1) ^b
Normal sperm	102	85 (83.3)	36 (35.3) ^a

* 10% AIB, 10분간 정자처리 후 IVF 실시함.

* Values with different superscripts were denoted significantly different (P < 0.05).

- AIB 처리에 따른 수정란의 발달율과 배반포기배의 암컷 수정란의 생산비율 증가 가능성을 확인하기 위해 대조구와 처리구의 수정란 12개씩을 Y-specific primer 를 이용하여 PCR하여 조사한 결과 대조구에서 12개 중 6개가 암컷 수정란으로, AIB 처리구에서는 12개 중 8개가 암컷으로 판정되었다 (그림 4, 표 7). 실제 인공수정 시 AIB 주입에 의한 암송아지의 생산은 약 74% 정도였는데 정자처리 후 체외수정 시 암컷 수정란의 생산비율은 약 67%로서 약간 낮은 경향을 보였다. 그러나 정자처리 및 체외수정에서의 체계적인 조절을 한다면 인공수정과 유사한 성적을 얻을 가능성이 있을 것이다.
- 그러나 이식 가능한 배발달율에서 35.3%와 20.1%로서 배발달율의 저조한 성적에 한계점은 분명히 확인할 수 있었다. 이러한 결과에서 정자처리방법의 개선, 체외수정과정의 개선을 도모한다면 AIB buffer 이용한 체외수정란의 생산에서도 체내주입에 의한 암송아지생산과 유사한 결과를 도출할 가능성은 있을 것으로 판단된다.

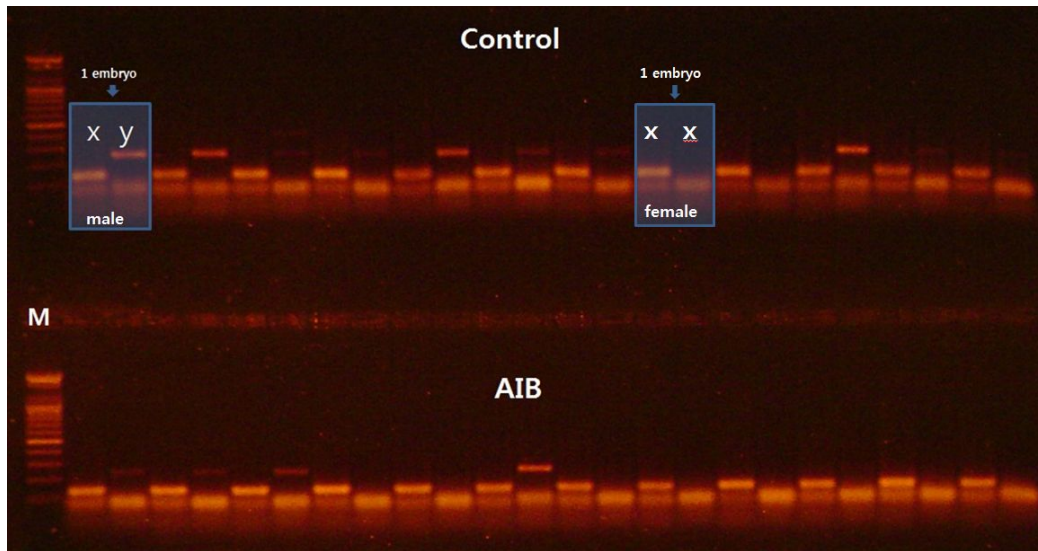


그림 4. Y-specific primer 이용한 수정란의 성비분석

표 7. 정자처리에 따른 체외수정란의 성비분석

Kinds of sperm treatment	No. of BL analysis	No. of female embryos	% of female embryos
Normal (Non-)	12	6	50.0 ^b
10% AIB for 10 min	12	8	66.7 ^a

* Values with different superscripts were denoted significantly different (P < 0.05).

- 이러한 결과에서 얻을 수 있는 결론은 AIB solution이 정자에 독성 영향으로 그 농도를 최소한으로 즉 10% AIB 농도까지 줄여야 정자의 생존에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 판단

된다. 즉 체외수정란의 생산에 AIB solution을 이용하는 방법으로 암컷수정란의 생산비율을 증가시키고자 하는 것은 실제 활용도에서 역 17% 정도의 암컷 수정란 성비의 개선 영향이 있는 것으로 판단된다.

- 현재까지 개발된 원하는 성의 수정란을 생산하기 위한 방법으로는 정자분리에 의한 암컷 또는 숫컷 정자를 이용하여 체외수정란을 생산하는 방법인데 이 방법도 정자의 활력도가 정자분리 과정에서 많은 노출시간과 손상으로 활력도의 저하 등의 이유로 수정율과 배발달율이 매우 저자한 실정으로 실제 산업화에 적용하는 데는 아직까지 해결되어야 할 부분이 많은 것으로 판단다. 또한 정액의 종류 즉 수놈의 개체에 따라 수정율 및 배반포발달율에 큰 차이를 보이는 결과를 보이고 있고 1회 체외수정 시 최소한 5개 이상의 성감별 정액을 이용해야 하는 것으로 비용측면, 즉 생산비에서 그 활용도를 고려해 보야 할 것으로 판단된다.
- 이러한 문제를 최종적으로 해결할 수 있는 방법이 성감별된 정자를 이용한 정자직접주입법(ICSI)을 이용하여 수정란을 생산하는 방법으로서 효율적인 배발달율을 얻을 수 있다. 그러나 이 또한 이식 가능한 수정란을 얻기 위해 많은 장비와 노력 및 한 사람이 수행할 수 있는 미세조작 난자의 숫자 등에 한계가 있어 실제 산업화에 활용하는 것은 초고능력우 등의 고도로 선발된 난자를 이용할 때 그 가치가 있을 것으로 판단된다.

[제2세부과제] 수정보조액을 이용한 시술 및 암송아지 생산

- 1) 농가 현장 적용 시 노출되는 문제점 개선책 마련. 특히 주입부위에서 자궁경관과 자궁 내에서 수정보조액과 인공수정에서 편리성, 수정율 등에 대한 비교분석으로 현장적용에 가장 적합한 조건 확립
- 농가 현장에서 가장 효율적으로 암송아지를 생산할 수 있는 수정보조액의 활용법을 정립하기 위하여 다양한 개선책을 마련하였다. 즉 기존의 인공수정에서는 자궁 내에 정액을 주입하는 방법을 주로 활용하였다. 그러나 본 수정보조액은 자궁경관에 주입하는 방법으로서 전문 시술자와 자가 인공수정사 모두에 의해 쉽게 주입할 수 있었다. 이때 수정보조액을 주입하기 위한 주입기구를 1년차에 제작하여 활용하였는데 이것은 기존에 활용하고 있는 인공수정 sheath와 이를 받쳐줄 수 있는 알루미늄 철제 주입기구를 함께 활용하면서 자궁경관에 주입하는데 전혀 불편함이 없도록 제작 활용하였다 (그림 3).



(AIB 주입기: 1년차 개발)



(AIB 주입기: 2년차 개발)

그림 3. 수정보조액의 주입을 위해 제작된 주입기.

- 주입부위는 자궁경관에 주입하는 기술적인 것이 문제가 아니라 전문기술자들은 기존의 주입 부위, 즉 자궁체 또는 자궁각에 주입하고자 하는 경향이 높았다. 왜냐하면 지금까지의 주입 방법에서 주로 자궁체에 주입하는 기술을 교육받아 자궁경관에 주입하는 것에 대한 의구심을 가지고 있었다. 자궁경관에 수정정보조액과 동결정액을 주입함으로써 정자의 저장소의 기능을 백분 활용할 수 있을 뿐만 아니라 수정정보조액의 기능으로 암정자의 운동성을 상대적으로 높여 수정 가능성을 높일 수 있었다.
- 수정정보조액의 주입 후 걱정 노출시간의 조정은 현장에서 적용하는데 가장 큰 문제로 인식되었다. 즉 전문 기술자들은 수정정보조액의 주입 후 약 10-15분간의 노출시간을 최소한으로 줄여줄 것을 요청하였다. 자궁경관의 조건을 변화시키기 위한 최소한의 시간과 기술자들의 기다리는 시간을 걱정 수준으로 줄이기 위한 노출시간의 단축을 시도한 결과 최소 10분까지는 필요하며 5분으로 줄였을 경우 암송아지의 생산비율이 낮아져 일반인공수정 시 얻을 수 있는 50% 정도로서 유의적인 차이가 없었다. 이는 최소한 10분까지 노출시간이 필요하며 그 이하로 줄이는 것은 수정정보조액의 기능을 얻을 수 없었다는 것을 확인하였다.
- 현장에서 암송아지에 대한 필요성이 현재는 젖소에서 훨씬 높은 경우이다. 즉 한우에서는 소값의 하락으로 암송아지에 대한 수요가 없고 젖소에서는 암송아지의 후보축을 받고자 하는 경우가 많은 것이 현실이다. 그래서 젖소에서 수정정보조액을 이용한 인공수정으로 암송아지를 생산하는 기술의 활용은 의미가 있을 뿐만 아니라 경제적으로 그 활용 가치가 매우 높다고 판단된다.
- 그리하여 젖소농가에서 자가 인공수정에 의한 수정정보조액을 이용한 인공수정은 암송아지를 생산하여 후보축 확보를 위한 방안으로 적극적으로 활용될 가능성이 있다고 판단된다. 왜냐하면 자가인공수정의 경우 노출시간의 엄수가 충분히 가능하나 전문 기술자에 의한 수정에서는 수정정보조액의 주입 후 10-15분간의 노출시간을 위한 기다림을 지키기가 어렵다는 것이 현실이었다. 그러나 자가인공수정의 경우 자기 목장에서 자기의 소들에게 시술하는 경우로서 충분히 가능성이 있으며 정확한 노출시간의 준수가 가능하여 실제 암송아지의 생산비율이 높게 나타나고 있다. 이러한 결과는 수정정보조액의 노출시간과 주입위치가 매우 중요한 요인으로 판단되고 있다. 실제 현장에서 활용되기 위해서는 반드시 이와같은 요인들의 준수가 성공 확률을 높이는 절대적인 요인으로 판단된다.



그림 4. 수정보조액의 활용으로 생산된 젖소 암송아지의 생산.

- 이상의 결과를 종합하면 목장 현장에서 수정보조액을 이용한 가장 효율적인 암송아지 생산 방법으로는 5 ml 수정보조액을 수정보조액 주입기를 이용하여 자궁경관 2-4추벽에 주입하고 약 10-15분 정도의 노출시간이 경과한 후 같은 부위에 일반인공수정과 같이 동결정액을 이용한 인공수정을 실시한다. 이와 같은 방법으로 약 74% 암송아지의 생산비율을 얻을 수 있었다. 이때 가장 중요한 요인으로 수정보조액의 주입위치(자궁경관 2-4추벽), 노출시간(10-15분) 등으로 판단되었다. 이와 같은 기술은 우수한 암송아지의 후보축을 생산하기 위해 기존의 인공수정기술을 활용하여 암송아지의 후보축을 생산하는데 적극적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 현장에서 보다 더 활용도를 높이기 위해서는 수정보조액의 노출시간을 줄일 수 있는 새로운 방법의 개발이 요구된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

가. [1년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	수정보조액과 주입기 개발 및 압송아지 생산 비율 향상기술 개발	수정보조액 제조 최적화	90	자궁경관 내에서 정자의 운동성을 조절할 수 있는 성분을 이용한 수정보조액의 조성비를 결정하고 수정보조액을 처리하였을 때 정자의 생존성과 활력도를 통해서 수정보조액의 toxicity 분석하여 최종 농도 및 조성비를 결정하였다. 주입량의 결정은 자궁경관에 주입하기 때문에 약 5 ml 정도로 하였다. 수정보조액의 저장온도에 따른 성상변화 및 성능저하 여부를 조사하여 보관조건의 확립을 통해 이용성 확인한 결과 수정보조액의 저장은 -20℃ 이하의 냉동상태로 저장하여 변질을 막고 장기간 저장이 가능한 것으로 판단되었다. 수정보조액의 수송은 냉동된 상태로 수송이 요구되며 이러한 조건을 충족하기 위해서 styrofoam box 내에 ice pack 또는 dry ice 등과 함께 포장하여 수송을 하였다. 체내와 체외에서의 동시 사용이 가능한지를 검토하여 이의 활용성을 분석하였다.
		수정보조액 주입기구 최적화	100	자궁경관에 수정보조액을 안전하게 주입하기 위해서 새로운 주입기구를 개발하였다. 자궁경관 2-4주벽에 주입하기 위해 기존의 인공수정 sheath를 이용하고 이를 고정시킬 수 있는 주입기구 (Gun)를 제작하였다. 자궁경관 내에 주입해야 하기 때문에 주입기구에 의한 자궁경관의 손상을 예방하기 위해 적절한 직경, 길이 및 재질 등을 충분히 고려하여 주입기구를 제작하였다. 제작한 주입기구는 실제 현장에서 사용할 때 보완해야 할 점 등을 확인하여 시술하기 편리하면서 효율적인 주입기구를 제작 완

				료하였다. 향후 수정보조액 및 주입기구의 현장실용화를 위해 주입기구를 대량생산하고 저렴한 가격으로 제작하여 안정적인 생산체계를 구축하였다.
1차 연도 (2009)	인공수정 보조 액을 이용한 시 술 및 암송아지 생산	수정보조액 사용 시 인공수정 실시 암소 구축	100	<p>농가 현장에서 직접 사용할 수 있는 기술로써의 수정보조액을 이용한 인공수정기술을 확립하였다. 정상적인 발정 발현된 개체에 수정보조액을 주입방법은 일반적인 인공수정과 같은 방법으로 주입한다. 다만 수정보조액의 주입부위를 자궁 내가 아니고 자궁경관 2-4주벽 사이에 주입하는 것과 수정보조액 주입 후 약 10-15분 정도 노출시간을 주어 자궁경관의 조건을 변화시킨 후 동결정액을 같은 부위에 주입하였다. 냉동보관중인 수정보조액을 온수에 용해하거나 체온으로 용해하여 주입기구에 장착하여 자궁경관의 2-4주벽에 5 ml 수정보조액을 서서히 주입하였다. 이때 가능한 자궁경관 내에 주입되도록 세심하게 주의하여야 하며 주입과정에서 자궁경관의 손상을 입지 않도록 주의하였다. 약 10-15분 정도 노출시간이 경과한 이후에 동결정액을 이용한 인공수정은 주입부위를 수정보조액을 주입한 자궁경관에 주입하였다. 이러한 과정에서 수정보조액을 주입하고 노출시간에 따른 수태율 및 암송아지 생산 효율 등을 비교분석하고자 하였다. 인공수정 시 수정보조액의 주입 위치와 노출시간을 조사하며 효율적인 수정보조액을 통한 인공수정기술을 확립하였다.</p>

나. [2년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	수 정보조액 과 주입기 개발 및 암송아지 생산 비율 향상기술 개발	수정보조액을 활 용하여 인공수정 시 수태율 향상 기술 확립	100	기존의 인공수정기술에 수정보조액을 활 용한 인공수정 시 수태율에는 차이가 없었 다. 12농가에서 총 35두에 수정보조액을 이용한 인공수정으로 200두가 임신하여 56.8% 수정율을 보였다. 같은 농가에서 전 년도 일반 인공수정으로 얻어진 55.75%의 평균 수정율과 차이가 없었다. 즉 이는 수 정보조액을 이용한 인공수정에 따른 수정 율의 저하에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되어 수정보조액을 이용한 암송아지 생산을 위해 이용 가능할 것으로 판단된다. 한우와 젃소의 수정율 비교분석에서 한우 (61.0%)가 젃소(48.7%)보다 유의적으로 높 은 성적을 얻었다. 이는 착유와 사육환경에 따른 결과로 판단되며 일반 인공수정에서 도 유사한 결과를 얻은 것으로 보아 대체 적으로 한우의 수정율이 높은 것으로 판단 된다.
		주입위치 (자궁경관 주벽)의 최적화	100	자궁경관 2-4주벽에 주입하여 생산된 송 아지 중에서 암송아지는 115두로서 77.7% 로서 자궁체에 주입한 31두 (59.6%)보다 유 의적으로 높았다. 이러한 결과에서 수정보 조액의 주입위치로는 자궁경관 2-4주벽에 주입하는 것이 수정보조액의 효과를 높일 수 있는 것으로 판단된다. 수정보조액 주입 기구의 장착은 기존의 AI sheath를 stainless 주입기구 내로 삽입한 후 약 3 ml 공기를 흡입한 후 수정보조액을 AI sheath 내로 주입한다. 이때 자궁경관 내로 주입될 AI sheath 끝 부분의 오염을 방지 하기 위해 수정보조액 주입기구 연결부위 에 흡을 파서 AI sheath를 주사기와 연결 시킬 수 있게 제작하였다.
2차 연도 (2010)	인공수정 보조 액을 이용한 시 술 및 암송아지	수정보조액의 주 입량 최적화	100	수정보조액의 주입량에 따른 암송아지의 생산비율은 5, 10 ml에서 77.7%와 76.7%로 유사한 비율을 얻을 수 있었다. 그러나 2

생산			ml 주입량은 어떠한 영향을 미치지 못한 것으로 판단된다. 이러한 측면에서 적정 주입량은 5 ml 수정보조액으로 충분한 결과를 얻을 수 있다고 판단된다. 주입량은 10 ml 이상으로 높이는 것이 암송아지 생산비율의 향상으로 이루어지지 않는다면 주입하는 방법과 용량, 작업능률 및 비용 등을 고려하면 적정량으로 판단되는 5 ml 수정보조액을 주입하는 것이 바람직하다고 판단된다. 그러나 2 ml 수정보조액은 자궁경관 내의 변화를 유도하는데 충분한 양이 되지 못하는 것으로 판단된다.
	주입 후 인공수정까지의 노출시간의 최적화	90	5, 10, 15분간 노출 후 인공수정 시 생산된 암송아지의 비율은 36.8%, 79.2%, 77.2%로서 10분과 15분에서 5분간 노출보다도 유의적으로 높은 암송아지의 생산비율을 얻을 수 있었다. 그러나 10분과 15분의 노출시간의 비교에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 측면에서 수정보조액의 주입 후 동결정액으로 인공수정의 실시는 약 10분간 노출을 유도한 후에 실시하는 것이 효과적일 것으로 판단된다.
수정보조액을 이용한 기술 및 암송아지 생산	농가 현장에서 직접 사용할 수 있는 기술 보급	100	수정보조액을 이용한 인공수정의 현장적용에 필요한 기술 정립을 위해 요구되는 주입기구, 수정보조액의 자체 제작생산을 하였으며 실제 현장에서 수정사 및 수의사들이 시술하는 과정에서 제기되었던 여러가지를 문제점들을 해결하여 현장에서 수정보조액을 주입하면서 인공수정의 시술은 큰 문제가 없는 것으로 판단된다. 그러나 현장에서 시술자들이 제기하고 있는 노출시간에 대한 문제점은 아직 해결하지 못한 상태이다. 즉 본 연구에서 최소한 10분 이상의 노출시간이 요구되는데 시술자들이 느끼는 10분은 매우 긴 시간으로서 노출시간을 최소한으로 줄일 수 있는 방법을 요구하고 있다.

다. [3년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	농가실증실험에 의한 산자 생산 및 문제점 개선 과 산업화 시도	수정보조액 이용한 인공수정 시 암송아지 생산비율 향상 기술 확립 및 연관성 분석	100	자연발정우에 동결정액을 이용한 인공수정 시 수정보조액을 자궁경관에 주입 후 약 10-15분 후 일반적인 인공수정과 같이 동결정액을 자궁경관 2-4cm에 주입하는 과정으로 시술하였다. 자가인공수정과 전문가 인공수정에 의한 수태율을 비교분석하였고 생산된 송아지의 성비는 자가 인공수정에서 74.29%로 전문가 인공수정에서 65.0%보다 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 수정보조액의 주입 후 약 10-15분 이상의 노출시간이 암송아지의 생산에 결정적으로 영향을 미치는 것으로 판단된다. 수정보조액은 자궁경관에 주입하여 자궁경관의 조건을 변화시켜 상대적으로 암정자의 수정율을 높이는 방법이다. 실제 정액을 자궁경관에 주입하는 것이 자궁경관에 정자보존장소가 있음으로써 주입된 정액이 연동수축운동에 의해 일정한 숫자가 자궁 및 난관으로 수송됨으로써 수정율을 높일 수 있는 기능을 하는 것이다. 이러한 방법으로 수정보조액을 먼저 주입하고 동결정액을 이용한 인공수정 시 약 74% 정도가 암송아지를 생산하여 암송아지의 생산비율이 높은 결과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 수정보조액을 자궁경관에 주입함과 노출시간을 10-15분 이상 유지함으로써 암송아지의 생산비율을 높일 수 있었다.
		수정보조액 주입 후 노출시간의 최소화 조건 정립하여 현장적용이 가능한 최적의 방법 개발	100	수정보조액을 이용한 인공수정 시 현장적용에 가장 걸림돌이 노출시간이었다. 수정보조액이 자궁경관의 적정 조건으로 변화시키는 데는 약 10-15분 정도의 시간이 최적이었지만 실제 현장에서 수정사 및 수의사들이 노출시간의 단축 필요성을 가장 강력히 요구하여 이의 시간단축, 즉 10분 5분까지 단축이 수태율과 암송아지 생산비율에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연

			<p>구를 하였다. 5, 10, 15분의 노출시간에 따른 수정율은 54.4, 51.4, 55.8%로서 유의적인 차이가 없었으나 암송아지의 생산비율에서는 50.0, 70.9, 78.9%로서 10-15분의 노출시간이 5분간의 노출시간보다 유의적으로 높은 암송아지 생산비율을 얻었다. 그러나 10분과 15분간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 암송아지의 생산비율을 높이기 위해서는 최소한 10분 이상의 노출시간이 요구되는 것으로 판단된다. 노출시간을 5분 정도로 단축시켰을 때는 암송아지의 생산비율을 전혀 높이지 못하였다. 이러한 결과에서 최소한으로 10분까지 노출시간을 줄이는 것은 무방하나 그 이하로 줄이는 것은 본래 암송아지를 생산할 수 있는 적정 노출시간이 아님을 확인하였다.</p>
		<p>수정보조액의 체외수정란 생산 가능성 검토</p>	<p>100</p> <p>수정보조액을 이용한 체외수정란 생산 시 암수정란을 선별적으로 생산 가능성을 조사하고자 체외수정 시 수정보조액의 다양한 농도를 처리한 결과 정자의 운동성에 결정적인 영향을 미쳐 운동성이 급격히 낮아졌을 뿐만 아니라 수정율도 매우 낮아 실제 체외수정란의 생산에 활용 가능성은 낮은 것으로 판단된다. 생사염색의 결과 10% 10분 노출에서 51.9%, 25% 10분 노출에서 23.9% 생존율을 얻었다. 그리하여 10% AIB 농도에서 10분간 처리구와 대조구로 체외수정란생산을 시도한 결과 분할율에서는 71.6%와 83.3%로서 유의적인 차이가 없었으나 배반포발달율에서는 20.1%와 35.3%로서 유의적인 차이를 보였다. 이렇게 생산된 배반포 수정란을 이용하여 y-specific primer 를 이용한 PCR sexing 분석을 한 결과 암컷 수정란의 비율이 66.7%로서 유의적인 차이를 보였다. 그러나 체외수정 후 이식 가능한 발달단계인 배반포기배까지의 발달율이 저조하여 실제 수정란을 생산하여 이식하는 데는 방법적 개선이 요구되는 것으로 판단된다.</p>
		<p>수정보조액을 이</p>	<p>100</p> <p>동결정액을 이용한 인공수정 시 자궁경관</p>

		<p>용한 인공수정의 산업화 가능성 검토를 위해 현장에서 간편하게 인공수정 가능한 적합한 주입부위의 결정(자궁경관 vs. 자궁 내 비교분석)</p>	<p>을 통과한 자궁 내, 즉 자궁체에 주입하는 것이 일반적인 방법으로 교육되고 있고 실제 시술자(수정사 및 의사)들은 이러한 방법으로 시술을 하고 있다. 그러나 수정조액의 주입은 자궁경관의 2-축벽에 주입하여 자궁경관의 조건을 변화시켜서 암정자의 운동성이 높고 상대적으로 수정자의 운동성을 저하시킴으로서 암수정란의 생산 및 암송아지의 생산비율을 증가시키는 기술로서 주입부위가 결정적인 영향을 미친다. 그러나 기존의 인공수정 시 주입부위와 달리 자궁경관에 주입하는 방법으로 시술하는 것에 시술자들이 상당한 부담을 느껴서 이러한 주입부위의 비교시험을 수행하였다. 수정조액을 자궁경관과 자궁 내에 주입하여 인공수정보 같은 부위에 시켰을 때 수태율은 54.5 vs. 51.3%로서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 암송아지의 생산비율에서는 자궁경관과 자궁 내에 따라 70.6% vs. 53.8%로서 유의적인 차이를 보였다. 이러한 결과에서 5 ml 수정조액의 주입은 자궁경관에 주입하여 자궁경관의 조건의 변화를 유도하는 것이 가장 적합한 방법으로 판단된다. 자궁 내의 주입은 암송아지의 생산비율의 향상에는 전혀 영향을 미치지 못하는 결과를 얻었다. 실제 인공수정 시 자궁경관에 주입하는 것은 다양한 유리한 점이 있다. 즉 자궁경관에는 정자의 저장소가 있음으로써 정자의 수명을 연장시킬 수 있을 뿐만 아니라 장궁점액에서 오염물질의 제거 및 죽은정자와 기형정자 등의 filtering 등의 효과를 동시에 볼 수 있다. 이러한 이로운 점을 최대한 살리고 수정조액에 의한 자궁경관의 조건을 변화시켜 상대적으로 암정자의 수정율을 높일 수 있는 방법이다. 그래서 수정조액의 주입은 반드시 자궁경관 2-축벽에 주입하는 것이 암송아지의 생산을 향상에 결정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.</p>
--	--	--	--

	수 정보조액을 이용에 의한 현 장 문제점 확보 및 개선책 마련	농가 현장 적용 시 노출되는 문제 점 개선책 마련 특히 주입부위에 서 자궁경관과 자 궁 내에서 수정 조액과 인공수정 에서 편리성, 수정 율 등에 대한 비 교분석으로 현장 적용에 가장 적합 한 조건 확립	100 농가 현장적용 시 가장 문제가 되는 것이 수정보조액의 주입 후 10-15분 정도의 노 출시간을 지키는 것이다. 모든 농가에서 자 가 인공수정을 한다면 이러한 문제점은 줄 어들겠지만 전문가 인공수정사 및 수의사 에 의한 인공수정을 실시할 때 시술자들이 수정보조액을 주입하고 10-15분 간 노출시 간을 지키는 것이 현장에서 느끼는 가장 큰 문제점이었다. 또한 주입부위의 변화를 기하는 것, 즉 자궁 내가 아니라 자궁경관 내에 주입하는 것이 기존의 인공수정 시 주입하는 부위와 달라 수태율에 어떠한 영 향을 미치지 않을까 하는 의구심이 높아 이것을 인식시키는 데 많은 어려움이 있었 다. 또한 수정보조액을 주입하기 위해서는 주입기구를 이용한 수정보조액을 주입해야 하는데 이러한 기구들의 사용방법 및 관리 와 소독 등에 대한 교육과 철저한 관리의 중요성을 인식하는데 많은 어려움이 있었 다. 이러한 다양한 조건들을 고려하여 현장 에서 수태율 저하를 가져오지 않으면서 암 송아지의 생산비율을 높일 수 있는 방법은 최소 10-10분간 노출시간을 지키는 것과 주입부위를 자궁경관 2-4cm에 반드시 주 입을 해야만 기존에 얻고자 하는 수태율과 암송아지의 생산비율을 향상시킬 수 있는 것으로 최종결과를 얻었다. 또한 이러한 주 입과정에서 수정보조액의 주입기구를 활용 함으로써 안전하게 시술을 할 수 있을 뿐 만 아니라 인공수정 Sheath와 함께 사용함 으로써 Sheath를 1회 사용 후 교체하는 것 으로 오염 등의 문제점을 극복할 수 있었 다. 이러한 결과에서 한우농가에 접목은 자 가 인공수정이 실시되지 않는 관계로 전문 시술자(수정사, 수의사)에 의해 수행되면서 노출시간의 극복에 한계점을 크게 노출시 켰다. 즉 최소 10분간의 노출시간을 기다리 는데 인색하여 그 시간을 지키지 못함으로 써 최종적으로 수태율과 암송아지의 생산
--	---	---	--

			<p>비율을 높은 비율로 얻지 못하는 결과로 나타났다. 그러나 젓소농가에서는 상대적으로 많은 비율이 자가 인공수정을 실시하고 있음으로써 자기 목장의 소에 직접 본인이 시술하는 경우로서 노출시간을 충분히 가져갈 수 있어서 암송아지의 생산비율을 본래의 계획대로 얻을 수 있었다. 이러한 다양한 조건들을 고려해 볼때 한우보다는 젓소농가에서 보다 더 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 즉 최소한의 노출시간은 암송아지의 생산에 결정적인 요인으로 판단된다.</p>
--	--	--	---

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 고급육 한우, 고능력 젖소의 암송아지를 안정적으로 생산함으로써 개량의 효과를 극대화 시킬 수 있음
- 고능력 젖소 및 고급육 한우 밀소의 안정적인 생산기반 확충
 - 고능력 젖소 암송아지 후보축의 안정적 확보를 위한 암송아지 생산비율 확대
 - 핵군 및 고급육 한우 밀소의 안정적 공급을 위한 암송아지 생산비율 확대
- 소고기시장의 완전개방에 따른 특화된 고급육 생산 기지화 구축
 - 소고기 완전개방에 따른 특단의 한우 경쟁력 확보 위해 고급육 한우 생산기반 확보
- 암소비육 등의 특화된 브랜드 구축 가능
- 고등등록우 이상의 소들에게만 수정보조액을 이용하여 암송아지 생산을 시도함으로써 완전한 암송아지만을 생산하였을 때 성비 불균형 등을 방지할 수 있음
- 착유우의 경우 세대교체용 암소를 차질없이 생산할 수 있고 특히 고능력 암소의 세대교체를 용이하게 해주어 우수 후보축을 안정적으로 확보할 수 있어 경영 효율화 가능
- 낙농 농가에서 시장 환경에 따라 선택적 임신이 가능하여 원유 공급과잉 등 일련의 사태에 즉각적으로 대처가 가능하여 농가 소득보전 및 경제적 이익의 극대화
- 기존의 인공수정기술을 활용함으로써 현재의 인공수정사 및 수의사들을 활용한 보급이 단기간에 가능함
- 축협, 제약회사 등 안정된 판로확보가 가능하여 단기간 내에 전국 판매망 구축이 가능하여 산업화 용이함
- 다른 성감별 방법과 비교하여 가격 경쟁력을 갖추
- 해외 축산 선진국뿐만 아니라 개도국 등 암소에 대한 요구가 있는 곳은 어디나 수출이 가능하여 세계시장에 수출 할 수 있음

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. SEX PRESELECTION: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA(1999)
 - Flow-cytometric sperm sorting machine을 이용하여 X 염색체를 가진 정자를 분리
2. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer(1999)
 - DNA 양 차이로 sperm을 나누어진 정자를 이용한 수정란을 생산하여 대리돈에 이식, 34마리의 산자를 생산하였는데 1마리를 제외한 33마리의 암컷을 생산(암컷비율 97%)
3. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI.
 - 성감별된 정자를 통하여 인공수정, 산자를 생산함. X염색체를 가진 정자를 통하여 11마리의 대리돈에서 2마리를 56마리의 암컷 산자를 생산(1999)
4. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art(2000)
 - 95-90%정도의 순도로 X-sperm 정자를 분리 가능. 분리 후 30%의 생존을 보였으며 90%의 암컷 또는 수컷 산자를 생산 가능하게 함

제 7 장 참고문헌

1. A.C. Lindsey, J.E. Bruemmer, E.L. Squires. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Animal Reproduction Science*. 2001; 68; 279-289
2. B. Avery, A. Bak and M. Schmidt. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology*. 1989; 32; 139-147.
3. D. Rath, C. R. Long, J. R. Dobrinsky, G. R. Welch, L. L. Schreier and L. A. Johnson. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J ANIM SCI* 1999; 77; 3346-3352
4. Duane L. Garner. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 2006; 65; 943-957
5. G.E. Seidel Jr, J.L. Schenk, L.A. Herickhoff, S.P. Doyle, Z. Brink, R.D. Green, D.G. Cran. Insemination of heifers with sexedsperm. *Theriogenology*. 1999; 52; 1407-1420
6. G.R. Welch, L.A. Johnson. Sex preselection: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology*. 1999; 52; 1343-1352
7. G.R. Welch, L.A. Johnsona. SEX PRESELECTION: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology*. 1999; 52; 1343-1352
8. I. Cerchiaroa, M. Cassandroa, R. Dal Zottoa, P. Carniera and L. Gallo. A field study on fertility and purity of sexsorted cattle sperm. *J. Dairy Sci*. 2007; 90; 2538-2542.
9. I.J. Yu, Y.J. Kim and K.K. Lee. Sex determination of bovine embryos with hamster H-Y antibody and by polymerase chain reaction. *Korean J. Vet. Res*. 1999; 39; 189-203.
10. J.L. Schenk, T.K. Suh, G.E. Seidel Jr. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexedsperm. *Theriogenology*. 2006; 65; 299-307
11. K. Utsumi, M. Hayashi, R. Takakura, K. Utaka and A. Iritani. 1993.

- Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 34; 25-32.
12. K.A. Weigel. Exploring the Role of Sexed Semen in Dairy Production Systems. *Journal of Dairy Science.* 2004; E120-E130
 13. L.A. Johnson. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Theriogenology.* 1999; 60-61; 93-107
 14. L.A. Johnson, G.R. Welch. Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology.* 1999;52;1323-1341
 15. L.A. Johnson. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reproduction, Fertility and Development.* 1995; 7; 893 - 903
 16. L.A. Johnson. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 1991; 26; 309-314.
 17. L.M. Tubman, Z. Brink, T.K. Suh and G.E. Jr Seidel. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J. Anim. Sci.* 2004; 82; 1029-1036.
 18. L.R. Abeydeera, L.A. Johnson, G.R. Welch, W.H. Wang, A.C. Boquest, T.C. Cantley, A. Rieke and B.N. Day. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology.* 1998;50;981-988.
 19. Lawrence A. Johnson, Glenn R. Welch and Wim Rens. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *J ANIM. SCI.* 1999; 77; 213-220.
 20. M. Andersson, J. Taponen, M. Kommeri, M. Dahlbom. Pregnancy Rates in Lactating Holstein-Friesian Cows after Artificial Insemination with Sexed Sperm. *Reproduction in Domestic Animal.* 2006; 41; 95-97

21. M. Bodmer, F. Janett, M. Hässig, N. den Daas, P. Reicherta, R. Thunb. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*. 2005; 64; 1647-1655
22. M.B. Wheeler, J.J. Rutledge, A. Fischer-Brown, T. VanEtten, S. Malusky and D.J. Beebe. Application of sexed semen technology to invitroembryoproductionincattle. *Theriogenology*. 2006;65;219-227.
23. Matthew B. Wheelera, Jack J. Rutledgec, Amy Fischer-Brown, Tara VanEtten, Samantha Malusky, David J. Beebe. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*. 2006; 65; 219-227
24. P. Bredbacka, A. Kankaanpääää and J. Peippo. PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. *Theriogenology*. 1995; 44; 167-176.
25. P.L. Agrawala, V.A. Wagner and H. Geldermann. Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. *Theriogenology*. 1992; 38; 969-978
26. S. Iwaskai and T. Nakahara. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized invitrofollowedbycultureinvitroorinvivo in rabbitoviducts. *Theriogenology*. 1990 ;33;669-675.
27. S.H. Sohn, C.S. Park and S.H Song. Sexing by the chromosome analysis of invitrofertilizedembryosincattle. *KoreanJ.Anim.Reprod*. 1996;20;179-190.
28. S.Y. Lee, B.K. Yang and C.I. Kim. Study on the sex-ratio of fast- and slow-developing mouse embryo. *Korean J. Anim. Reprod*. 1987; 11; 218-222.
29. T. Kudo, S. Sato and S. Sutou. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Cloning and characterization of bovine male specific repetitive DNA. *Reprod. Dev*. 1993; 39; 55-63.
30. T.J. Williams. A technique for sexing mouse embryos by a visual

- colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology*. 1986; 25; 733-739
31. W. Rens, G.R. Welch, L.A. Johnson. Improved flow cytometric sorting of X- and Y-chromosome bearing sperm: substantial increase in yield of sexed semen. *Molecular reproduction and development*. 1999; 52; 50-56.
 32. W.A King. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*. 1984; 21; 7-17.
 33. W.D. Hohenboken. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology*. 1999; 52; 1421-1433
 34. Y. Itagaki, N. Kimura, M. Yamanaka and S. Sutou. Developmental rate differences and sex of bovine preimplantation embryos generated invitro. *J.Mamm.Ova.Res.*1995;12;73-78.
 35. Y. Itagaki, N. Kimura, M. Yamanaka, Y. Muneta and S. Sutou. PCR sexing and survival following embryo biopsybisection of invitroproducedbovineembryos. *J.Mamm.Ova.Res.*1996;13;48-51.
 36. Y.J. Kim, C.M. Lee, G.N. Chong, H.L. Lee, S.W. Cho, Y.S. Kim, D.S. Shin, Y.M. Hong and I.J. Yu. Embryo transfer with sex-determined Hanwoo embryos produced by in-vitrofertilization. *KoreanJ.Emb.Trans.*2003;18;97-108.
 37. Y.J. Kim, G.N. Chong, H.L. Lee, S.W. Cho, Y.S. Kim and I.J. Yu. Sex determination of biopsied Hanwoo embryos by polymerase chain reaction and embryo transfer with sexed blastocysts. *Korean J. Emb. Tras.* 2000; 15; 219-230.
 38. 김용준, 이창민, 정구남, 이해리, 조성우, 김용수, 신동수, 홍유미, 유일정. Embryo Transfer with Sex-Determined Hanwoo Embryos Produced by In-vitro Fertilization. *Korean J. Emb. Trans.* 2003;18;97-108
 39. 김용준. Sex determination of bovine embryos using H-Y antibodies and by PCR method and embryo transfer with sexed embryos. KOSEF. 연구 보고서. 961-0606-051-2
 40. 민찬식, 송상현, 손귀동, 정우재, 노치원, 강양수, 박충생, 공일근. Production of Calves Following Transfer of Sexed Hanwoo Embryos and Hanwoo Embryos Cultured In Vitro. *Korean J. Emb. Trans.* 2008;23;43-49

41. 박수봉, 김형선, 연성흙, 정진관. Percoll 밀도 균배법에 의한 젿소 정자 성감별 연구. 농촌진흥청. 동향자료. 1995
42. 박창식. Studies on Production and Supply of Fresh and Frozen Boar Semen Separated X- and Y-Sperm; Studies on Technological Development of Processing Treatments Preservation Period and Temperature on Fresh Boar Semen. 농림수산부. 연구보고서. 1995
43. 이해이, 조성우, 박기승, 김용수, 정구남, 노수일, 김용준. PCR기법에 의한 소 수정란의 성감별. Korean J. Emb. Trans. 1999;14:33-37
44. 최화식, 임경순, 조병대, 정진관, 오성중, 양보석. Studies on Sexing of Mouse Embryos with Rat H-Y Antisera. 1994. Korea J. Reprod Dev Biol. 1999;17:305-310

주 의

1. 이 보고서는 수정보조액을 이용한 한우 및 젓소의 암송아지 생산비율 향상 기술 기발에 관한 연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 수정보조액을 이용한 한우 및 젓소의 암송아지 생산비율 향상기술 기발에 관한 연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.