819006
-
02

OPU-IVF 활용개체별 소 수정란 생산 상용화 기술개발 2021

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( )발간등록번호(O)
농식품연구성과후속지원사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003596-01

(견고딕31p)

OPU-IVF 활용 개체별 소 수정란 생산 상용화 기술 개발

2021년 3월 8일

농업회사법인 유한회사 보비텍

농 림 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원

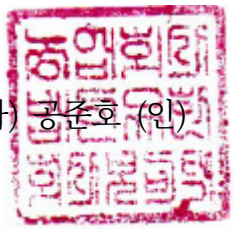
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "OPU-IVF 활용 개체별 소 수정란 생산 상용화 기술 개발"(개발기간 : 2019. 5. ~ 2021. 1.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021년 3월 8일

주관연구기관명 : 농업회사법인 유한회사 보비텍 (대표자) 공준호 (인)



주관연구책임자 : 공준호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요 약 문 >

<table>
<tr><td colspan="2">사업명</td><td colspan="3">농식품연구성과후속지원사업, 벤처</td><td colspan="2">총괄연구개발 식별번호
(해당 시 작성)</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="2">내역사업명
(해당 시 작성)</td><td colspan="3"></td><td colspan="2">연구개발과제번호</td><td colspan="2">819006 -2</td></tr>
<tr><td rowspan="2">기술분류</td><td>국가과학기술
표준분류</td><td>LB0699</td><td>50</td><td>LB0604</td><td>30</td><td>LB0603</td><td>20</td></tr>
<tr><td>농림식품
과학기술분류</td><td>AB0199</td><td>100</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제명</td><td colspan="6">OPU-IVF 활용 개체별 소 수정란 생산 상용화 기술개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 연구개발기간</td><td colspan="6">2019.5.10. - 2021.01.09</td></tr>
<tr><td colspan="2">총 연구개발비</td><td colspan="6">총 175,000천원
(정부지원연구개발비: 175,000천원, 기관부담연구개발비 : 천원,
지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발단계</td><td colspan="3">기초[ ] 응용[0] 개발[ ]
기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]</td><td>기술성숙도
(해당 시 기재)</td><td colspan="2">착수시점 기준( )
종료시점 목표( )</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 유형
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">산업화 → 기술이전</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 특성
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구개발
목표 및 내용</td><td>최종 목표</td><td colspan="6">생체내 난자 채취(OPU)-체외배양(IVMFC)으로 개체별 배양 최적환경 조성과 이를 바탕으로 소 수정란의 생산 및 대량 이식 기술의 상용화</td></tr>
<tr><td>전체 내용</td><td colspan="6">○ 우량 공란우(한우) 확보(20두)
○ 생체내 난자 채취 기반 구축 및 회수율 향상 연구
• 호르몬 종류 및 투여 시기 조절을 통한 난자 회수율 향상 연구
• 한우 OPU 체계및 기준 설정
○ 체내유래난자의 체외 성숙/수정/배양 체계 확립 연구
• 체외성숙연구 : 무혈청/혈청 성숙액비교 분석
• 체외수정 연구 : 우량 종모우정액 선정 및 배발달율비교
• 체외배양연구 : 무혈청배지 기반의 체외배양액선정 연구
○ 수정란이식연구
• 최적 수란우관리 기술 확립, 수정란 동결 프로그램 확립
• 개체별배양으로 생산된 수정란의 등록 및 증명서 발급 등 사업화 체계 확립
○ 상기 개발된 기술을 주관기관에 기술전수하여 안정적인 산업화 추진함</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발성과</td><td colspan="6">○ 국내 유일의 농업회사에서 OPU-IVF 기술 확립 및 우량수정란 산업화 성공
- 생체내 난자 회수 및 체외수정란 체계 확립
- 우량 수정란의 동결 기술 확보
- 수정란 이식을 통한 우량 한우 생산 및 산업화 기여
○ 산업화 기술을 바탕으로 년간 1.5억원 이상의 매출 달성</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td>연구개발성과
활용계획 및
기대 효과</td><td colspan="11">○ 고능력 소(한우, 저지)에서 유래한 OPU-IVF 수정란 생산체계를 확립하여 자체 농장 이식 및 외부 판매 등으로 고부가가치 창출이 가능한 산업화 기반을 구축하고, 첨단 BT 산업에 원천기술로 활용
○ 기술적 측면 :
- 한우 생체내 난자 활용 및 개체별 생산체계 정립
- 한우 체외수정란 배양 및 생산 기술 개발 후 관련 기술 전수
○ 경제·산업적 측면 :
- 한우 수정란의 자체 농장 이식 후 비육 판매를 통한 경영 안정화
- 지역 우량 한우 생산 기반 및 농가 수익 창출 기여</td></tr>
<tr><td>연구개발성과의
비공개여부 및
사유</td><td colspan="11">없음</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구개발성과의
등록·기탁 건수</td><td>논문</td><td>특허</td><td>보고서
원문</td><td>연구
시설
·장비</td><td>기술
요약
정보</td><td>소프트
웨어</td><td>표준</td><td colspan="2">생명자원</td><td>화합물</td><td colspan="2">신품종</td></tr>
<tr><td></td><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>생명
정보</td><td>생물
자원</td><td></td><td>정보</td><td>실물</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구시설·장비
종합정보시스템
등록 현황</td><td>구입
기관</td><td colspan="2">연구시설
·장비명</td><td>규격
(모델명)</td><td>수량</td><td>구입
연월일</td><td>구입가격
(천원)</td><td>구입처
(전화)</td><td colspan="2">비고
(설치장소)</td><td>ZEUS
등록번호</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="2"></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td colspan="2"></td><td></td></tr>
<tr><td>국문핵심어
(5개 이내)</td><td colspan="3">한우</td><td colspan="2">수정란</td><td colspan="2">생체내난자채취</td><td colspan="2">이식</td><td colspan="2">개량</td></tr>
<tr><td>영문핵심어
(5개 이내)</td><td colspan="3">Hanwoo</td><td colspan="2">Embryo</td><td colspan="2">Ovum pick up</td><td colspan="2">Transfer</td><td colspan="2">Development</td></tr>
</table>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 ·····1

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 ····· 7

가. 체내수정란 생산 및 이식 ····· 7

나. 우량 공란우 선발 ····· 10

다. 생체내 난자 회수(OPU) 체계 확립 ····· 13

라. OPU 난자를 이용한 수정란 배양 연구 ····· 16

마. 수정란이식 체계 연구 ····· 25

바. 수정란의 동결(유리화동결) 체계 개발 ····· 28

사. 사업화 체계 확립 ····· 30

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 ·····

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) ·····

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 ·····

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ·····

별첨자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구 필요성

우량종의 정액을 이용하는 인공수정기술은 생명공학 분야에서 최초로 산업화된 것으로 고생산성 동물의 빠른 증식이 가능하여, 젖소에서 우유 생산량 증대 및 비육우에서 육질개선에 공헌하였다. 인공수정법은 우수한 씨수소의 능력은 충분히 활용할 수 있으나, 씨암소의 유전적 가치는 효율적으로 활용하지 못하는 문제점이 있다. 국내에서는 씨암소의 유전적 가치를 활용하기 위하여 '80년대에는 과배란 유도에 의한 체내수정란 생산 및 이식 연구가 이루어 졌으나, 이 방법은 년간 4회정 도만 생산할 수 있어 한계를 가지고 있으며, 과배란 처리 호르몬의 비용, 개체차이 등이 커서 산업화에 한계를 가지고 있었다. 한편 수정란의 대량 생산을 위하여 체외수정란의 생산 및 이식 연구를 하였으나, 이 방법은 도축 난소를 이용함에 따라 유전 능력을 알 수 없어 개량 효과가 떨어지고 특히, 축산법에서 공란우 선정 법규에 맞지 않는 문제점을 가지고 있다. 이런 단점을 보완하고자 일부에서 도축 난소를 개체별로 수집하여 체외성숙 완료 이후 혈통이 확인 된 개체들로만 수정란 배양 및 이식하는 연구가 시도되었으나, 이 또한 활용에는 한계가 있다. 국외에서는 이런 단점을 보완하고 생체내 난자 회수후 체외배양법(Ovum Pick Up - in votro Production; OPU-IVP)을 이용하고 있으나, 국내에서는 일부 대학에서 활용은 하고 있으나 기술전수에 어려움이 있어 민간 회사 차원에서는 산업화에 어려움이 있는 상황이다.

OPU를 통한 난자 회수는 고능력 공란우로부터 3-7일 간격으로 지속적으로 난자를 채취하여 체외배양하므로 산술적으로 년간 수백개의 수정란의 생산과 이식이 가능하다. 또한 초기 장비 비용은 필요하지만 호르몬 처리비용 등을 절약하고, 장기간 공란우를 이용할 수 있으며, 우량 수정란을 대량 생산할 수 있는 장점을 가지고 있어 향후 수정란이식의 나아갈 방향인 것으로 판단된다. 수정란이식을 이용한 유전적 개량 방법에는 기존 MOET(Multiple Ovulation and Embryo Transfer) 방법에 비하여 OPU-IVP가 효율적인 것으로 판단되지만, 활용도를 높이기 위해서는 수정란의 장기보존, 동결 보존 등의 추가적인 연구도 필요한 실정이다.

최근 각 지자체별로 농가 소득 증대를 목적으로 본 기술을 이용한 다양한 사업을 추진중에 있어 당사는 장기간의 수정란이식 시술 경험(인공수정사)과 소 사육 기술을 바탕으로 "소 수정란 생산 및 이식"을 전문으로 하는 사업체를 설립하여 관련 기술 개발과 사업화를 진행하고 있어 본 과제를 통하여 OPU-IVF(Ovum Pick-Up - In Vitro Fertilization) 방법을 이용한 우량 소(한우)의 개체별 수정란 생산하여 이식을 사업화하고자 하며, 따라서 수정란이식 기술을 이용한다면 우수 종축 생산 기반 구축과 증식에 필요한 소요 기간을 단축시켜 본 사업에서 목적으로 하는 소(한우)의 생산과 증식이 조기에 달성 가능하고 판단된다. 하지만, 관련 기술의 확보와 관련 기관으로부터 기술 이전이 어려워 본 연구를 통하여 위탁기관(한농대)에서 기술 개발하고 주관기관(보비텍)에 기술전수하므로 산업화하도록 하는데 연구 목적이 있다.

나. 국내외 연구 현황

1) 국내 연구 현황

초음파유도 난포란 채취를 기본으로 소의 마취방법과 채란기구의 개발(1997년)이 시되괴었고, 한우에서 초음파 및 도축장 유래 난포란을 이용한 체외수정란 생산 연구(1998), 공란우 개체와 채란 기간이 OPU 수정란 생산 효율과 관련된 연구(2010년) 등이 있었으나, 기술개발 수준으로 산업화에 대한 다양한 결과들은 제시가 되지 않고 있음
전국적으로 우량 한우 생산에 대한 의식이 증가하고 있으며, 지자체를 중심으로 한우 브랜드화를 위하여 수정란이식을 사업으로 추진 중에 있다. 국내 수정란생산 연구소는 주로 지자체와 공공 연구소를 위주로 지자체 연구소, 대학, 민간사업자 일부가 산업화 하고 있는 실정이나, 본 회사가 위치한 현재 전북 및 전남권역의 수정란 생산 회사는 없는 실정이다. 따라서 자체 이식과 전북권역을 중심으로 하는 당사의 한우 수정란이식 사업은 사업성이 충분이 있다고 판단됨

2) 국외연구 현황

OPU기법은 오랜 역사를 가진 연구로 Raoul Palmer가 1961년 시도하여 사람 난소에서 난자를 회수에 성공하였다(Edward RG, 1965; Litynski GS 1997; Steptoe와 Edwards, 1970). 초기에는 복강경을 이용하여 난소를 직접 관찰하고 난소 내 난포의 발육에 관한 정보와 함께 난자를 회수 하였는데, 이러한 방법은 시술이 복잡하고, 복막염 등 문제가 있었다. 그러나 초음파 장치의 발명과 해상도가 우수한 장비의 발달로 질을 통한 난소의 영상 촬영이 가능하게 되어 난자-난구세포괴(COCs, cumulus oocyte complex)를 연속적으로 흡입이 가능하게 되었다(Lenz와 Lauritsen, 1982). Callessen 등(1987)은 직장검사를 통하여 난소를 배치하고 초음파 검사로 난포를 관찰하면서 소의 난자를 처음 회수하였다. Pieterrse등(1988)은 주당 1회, 10마리의 암소에서 약 36번의 시술로 약 54개의 난소를 회수할 수 있었다고 보고하였다. 이러한 결과를 바탕으로 최근에 이르러서 초음파 장비의 발달로 난소 회수방법이 안정화되고, 소 난자의 체외생산 기법이 확립됨에 따라 산업화가 가능하게 되었다(Bousquet 등, 1999). 특히, 난소에서 OPU시술 주기에 관한 연구로서 주 2회의 OPU시술 방법이 효율적임이 밝혀짐에 따라 체외수정란의 지속적인 생산에 적합한 수의 난자를 회수할 수 있게 되었다(van der Schans 등, 1991; Pieterse 등, 1991; Boni 등, 1992; Simon 등, 1993; Kruip 등, 1994).

3) 소 체외수정란 배양 연구

일반적으로 소의 미성숙 난포란은 혈청과 성선자극호르몬이 첨가된 TCM-199 배지에서 체외성숙이 유도되고 제공된 난자의 약 90%가 성숙이 되지만 70-75%만이 수정이 된다(Watson 등, 2000). 그 후 5-7일간의 체외 배양과정을 통해 20 30%가 배반포까지 발달하지만(Park등, 2005), 체내에서 성숙된 난자는 50-80%가 배반포 단계로 발달한다(Rizos 등, 2002). 따라서 체외성숙된 난포란의 배 발생이 체내에서 성숙된 것에 비하여 저조한 것은 배란전 발달 기간이 없고(Hendriksen 등, 2000) 체외성숙에 이용하는 각종 배지와 첨가물의 조합이 체내의 환경과 차이가 있기 때문일 것이다(Rose 등, 1998; Watson 등, 2000; Ward 등, 2002). 수정란의 배양용 배지에는 혈청이 첨가되어 단백질원, 고정 질소원, 호르몬, 성장인자 및 비타민을 비롯한 un-known factor를 제공한다(Gardner와 Lane, 2000). 그러나 혈청

은 에너지 대사의 이상, 미토콘드리아의 구조적 손상 및 지질의 비정상 침착과 같은 유해작용이 있고(Dorland 등, 1994). 특히 체내 환경에서 포유동물의 수정란은 혈청에 노출될 기회가 없다(Gardner와 Lane, 2004). 따라서 혈청을 대체하기 위한 고분자물질들의 이용에 관한 연구가 체외배양 연구 초기부터 시도되었고(Bavister, 1981),
생쥐와 소 수정란의 배양에서 polyvinylalcohol (PVA)나 polyvinylpyrrolidone(PVP)의 효과가 보고되었으나, 그효과는 의문시 되고 있다(Eckert 등, 1998; Biggers 등, 2000; Ali와 Sirard, 2002).

4) 수정란이식 수란우 연구

수정란 이식에서 임신율 향상을 위하여 수정란의 발육 단계와 품질(Linder와 Wright, 1983), 수란우 요인(Hasler, 1992; 김 등, 2005a), 시술자의 기술적 요인(김 등, 2005b), 사양관리 및 환경 요인(Hasler 등, 1987) 등이 연구되었다. 한편 수정란 측의 요인에 관해서는 배반포의 등급(Linder와 Wright,1983; Hasler, 2001), 발생 단계(Wright, 1981; 황
등, 2004), 이식 수량(Numabe 등, 2000), 발생 일령(Hasler, 2001)이 임신율에 미치는 효과는 검토되었으나, 임신 후 유산에 관한 조사는 거의 없었다. 한편 수정란을 이식하는 시술자의 기술적 요인에 관한 연구로는 이식 방법(Baker 등, 1983), 숙련도(Schneider 등, 1980), 이식 난이도(Boland 등, 1976; Bowem 등, 1978; Wright, 1981) 임신진단시기(Jonker, 2004) 등이 보고되었으며, 국내에서 임상적 접근과 관련된 보고는 거의 없다.

체외 수정란의 문제점 중에서 하나인 송아지의 기형(Agca 등, 1998)은 인공수정과 체내 수정란이 2% 이하인 것에 비하여 체외 수정란은 3.2~5.2%로서 높은 수준이다(Kruip 등, 1997; Leeuw 등, 1998). 한편 체외 수정란에서 유래한 송아지에서 사지 기형과 마비, 척추 이상, 소뇌 형성 부전 및 다발성 근괴사증과 같은 기형이 복도되었다(Kruip 등, 1997; Leeuw 등, 1998; Schmidt 등, 1996). 또한 Neospora caninum 및 Bovine viral diarrhea virus의 감염에 의해서도 기형이 발생하였다(Bjorkman 등, 1996, 2000; Kovacs 등, 2003). 체외 수정란 유래 송아지의 폐사율이 16~50%(Behboodi 등, 1995; Hasler 등, 1995)로서, 체내 수정란 유래 송아지의 9%(King 등, 1985)보다 높은수준이고, 국내에서도 체외 수정란에서 유래한 송아지의 폐사율이 체내 수정란의 것에 비하여 높았다(박, 2004). 한편 폐사의 유형별로는 사산(Schmidt 등, 1996) 및 분만 사고(Numabe 등, 2000)에 관한
보고가 있으나, 질병에 의한 폐사율은 보고가 거의 없었다.

다. 수정란이식 개요

1) 수정란이식이란?

공란우의 체내에서 수정-발생 또는 채취된 난자를 이용하여 체외배양하여 생산된 수정란을 수란우(대리모)의 자궁에 이식하는 방법

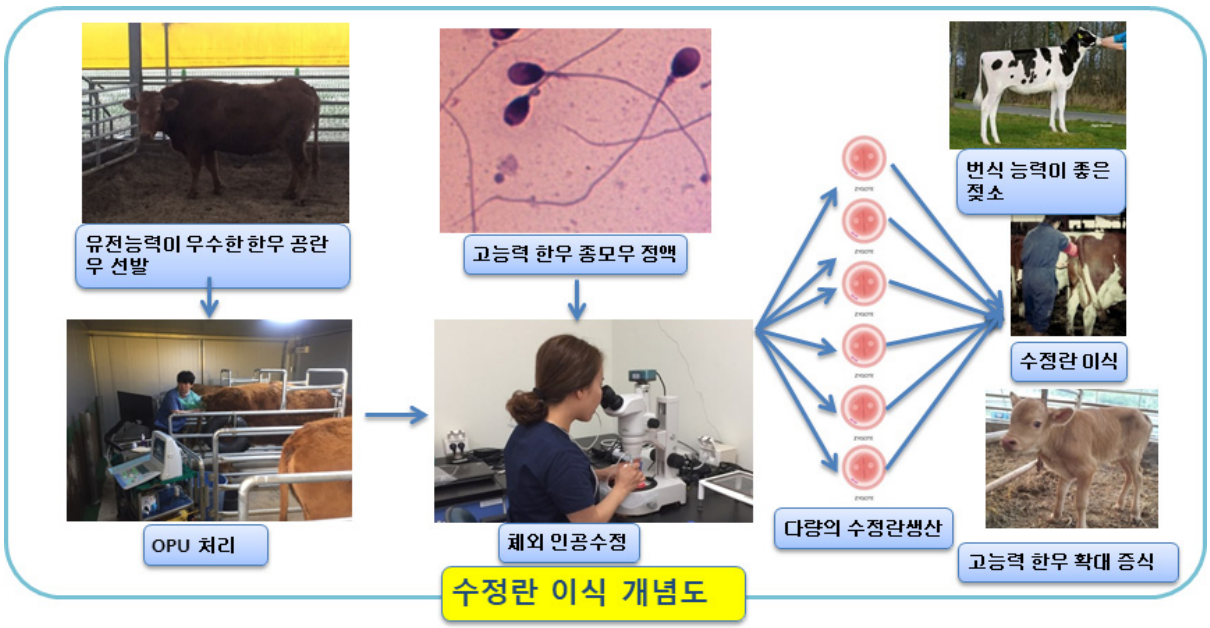


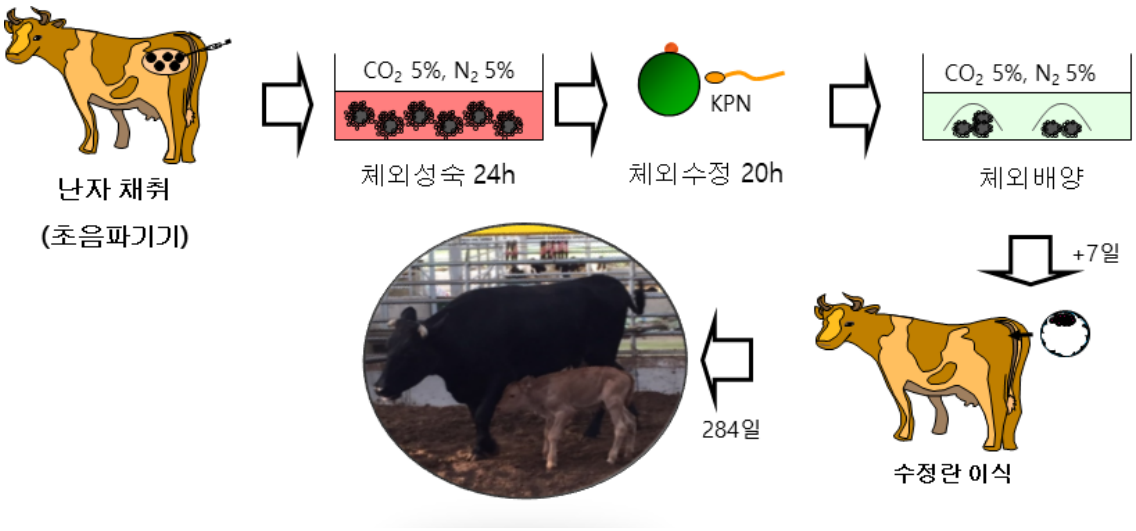
Figure 1. 수정란 생산 및 이식 개념도

2) MOET 육종

다배란-수정란이식(multiple ovulation-embryo transfer)을 이용한 육종계획을 MOET육종이라고 하며, Nicholas와 Smith(1983)에 의해 젖소 육종방법의 하나로 제시되면서부터 많은 연구가 이뤄져 왔다. MOET 육종계획은 우수한 핵군육종집단(nucleus breeding herd)을 조성하고 우수 암컷으로부터 많은 전형매 또는 반형매의 자축을 생산한 다음, 이들 가계구성원들의 유전정보를 근거로 조기에 종축을 선발할 수 있으며, 차세대 암소어미소와 수소어미소의 선발경로에서 선발강도의 상승과 세대간격의 단축에 따른 개량효과를 기대하는 방법이다. 후대검정보다 적은 축군으로 경비, 기술과 노력의 집약화 및 조사, 기록과 사육들의 집중적인 축군 관리의 이점과 새로운 육종학적 생명공학기법의 적용이 보다 용이한 장점이 있다. 핵군조성시 아주 우수한 종축으로 출발할 경우 유전적 상승(genetic lift) 효과도 있다.

3) 생체내 난자 채취(OPU) - 체외수정/배양(in vitro fertilization/cultrue)

OPU(Ovum Pick Up)은 공란우 생체내에서 지속적으로 형성되고 있는 미성숙 난포란을 바늘을 이용하여 생체외로 회수하는 기술로서 초음파 기기의 개발과 관련 기술을 발달로 체계적으로 산업화되기 시작하였다. 체외배양체계의 발달로 미성숙난포란의 생산효율이 증가하였다. 최근 능력이 우수한 자축의 생산 필요성이 증가하면서 기존의 인공수정만으로는 한계가 있고, 국내 소비 및 수입에 대한 고능력우량 한우의 생산과 유제품 생산에 특화된 품종의 필요성이 증가하면서 기존의 인공수정(A.I)으로는 한계가 있다. 수정란이식 기술을 이용한다면 우수 종축 생산 기반 구축과 증식에 필요한 소요 기간을 단축시켜 소(한우, 젖소) 개량과 번식효율 증가에 매우 적절한 방법으로 인식된다.



4) 인공수정과 수정란이식 비교

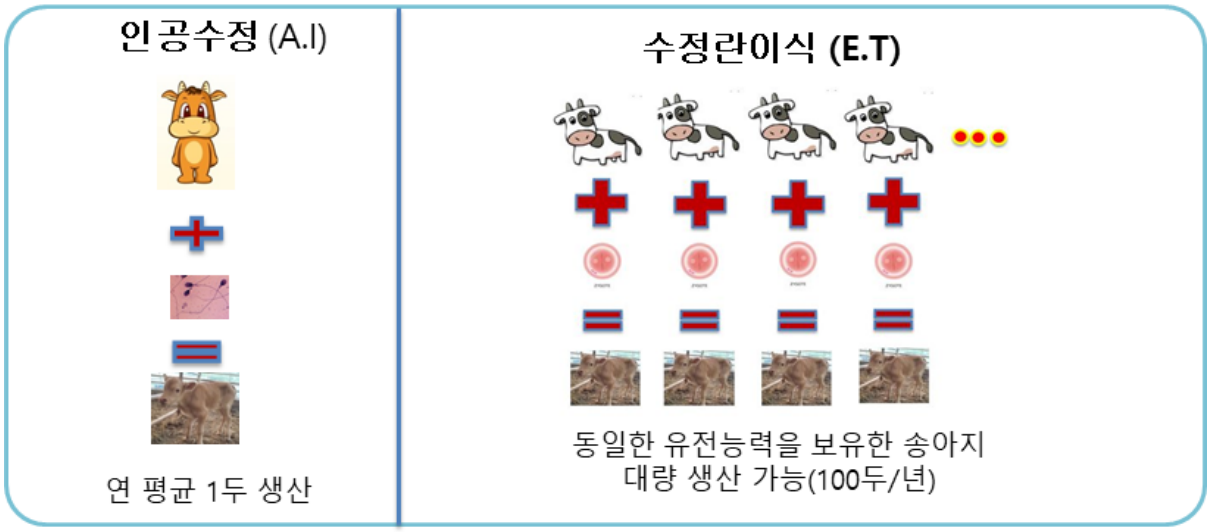


Figure 2. 인공수정과 수정란이식 비교

라. 연구개발 및 사업화를 위한 회사 현황

- 회사명 : 농협회사법인 유한회사 보비텍(BoviTech)(대표 : 000)
- 본사 : 전북 전주 완산구 콩쥐팥쥐로 1515 한국농수산대학창업보육센터 102호
  농장 : 전북 익산 용안면 중신리 470-5
- Tel) 063-861-3500, 010-3644-0031
- 자본금 : 1억원
- 인력 : 대표, 연구원, 인공수정사(3명)
- 자문단 : 한국농수산대학(000 교수), 종축개량협회(000 부장(전))
- 회사 농장 및 실험실 전경

- 시설(축사) : 3,011.6㎡ ⇒ 10,306.4㎡(17년 9월 준공, 사용승인 완료)
- 사육 규모 : 200두 사육 ⇒ 1,000두 사육 가능
- 목초지 : 42,125㎡
- 사료 배합기 : 2기 ⇒ 4기(예정)
- 차량 : 폐기물 운반 차량 3대
  가축 운반 차량 1대
- 조사료 생산 장비 : 트랙터 3대
  원형베일 결속기, 집초기, 랩핑기
- 기타 : 송아지 로봇 자동 포유기 1기 (ICT기반)
  밀크모빌 1기

신축사전경 | T.M.R배합기 | 폐기물운반차량 | 송아지 자동포유 | 대규모 모빌포유

Figure 3. 주관기관(보비텍) 현황

마. 연구개발 목표

생체내 난자 채취(OPU)-체외배양(IVMFC)으로 개체별 배양 최적환경 조성과 이를 바탕으로 소(한우, 젖소) 수정란의 생산 및 대량 이식기술의상용화를 통한 안정적인 수익 창출 기반 확보

<세부 목표>

○ 우량 공란우(한우) 확보(20두) : 체계적인 질병 검사 등 공란우 기준 정립
○ 생체내 난자 채취 기반 구축 및 회수율 향상 연구
  • 호르몬 종류 및 투여 시기 조절을 통한 난자 회수율 향상 연구
  • 한우 OPU 체계및 기준 설정
○ 체내유래난자의 체외 성숙/수정/배양 체계 확립 연구
  • 체외성숙연구 : 무혈청/혈청 성숙액비교 분석
  • 체외수정 연구 : 우량 종모우정액 선정 및 배발달율비교
  • 체외배양연구 : 무혈청배지 기반의 체외배양액선정 연구
○ 수정란이식연구
  • 최적 수란우관리 기술 확립, 수정란 동결 프로그램 확립
  • 개체별배양으로 생산된 수정란의 등록 및 증명서 발급 등 사업화 체계 확립
○ 상기 개발된 기술을 주관기관에 기술전수하여 안정적인 산업화 추진함

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

가. 체내수정란 생산 및 이식

<서론>

체내수정란을 이용한 수정란이식의 육종연계방법은 다배란-수정란이식(multiple ovulation-embryo transfer)이라고 하며, 이러한 육종계획을 MOET육종이라고 하며, Nicholas와 Smith(1983)에 의해 젖소 육종방법의 하나로 제시되면서부터 많은 연구가 이뤄져 왔다. MOET 육종계획은 우수한 핵군육종집단(nucleus breeding herd)을 조성하고 우수 암컷으로부터 많은 전형매 또는 반형매의 자축을 생산한 다음, 이들 가계구성원들의 유전정보를 근거로 조기에 종축을 선발할 수 있으며, 차세대 암소어미소와 수소어미소의 선발경로에서 선발강도의 상승과 세대간격의 단축에 따른 개량효과를 기대하는 방법이다. 후대검정보다 적은 축군으로 경비, 기술과 노력의 집약화 및 조사, 기록과 사육들의 집중적인 축군 관리의 이점과 새로운 육종학적 생명공학기법의 적용이 보다 용이한 장점이 있다. 핵군조성시 아주 우수한 종축으로 출발할 경우 유전적 상승(genetic lift) 효과도 있다.

기본형(original) MOET는 폐쇄형(closed)으로서 종축선발과 선발에 기초가 되는 유전정보를 핵군내 가계구성원만의 기록에 의존하며, 핵군이 작을 때 근친도의 상승과 유전정보의 한계성을 갖는 단점이 있다. MOET 실시의 나이에 따라 분만 경험이 있는 종축을 이용한 성축(adult)과 12~15개월령 이하의 정상 분만 이전의 종축을 이용한 약령(juvenile) MOET가 있으며, 수정란을 90일령 태아 난자의 체외수정(IVF)을 통해서 생산할 때는 그만큼 세대간격의 단축효과가 있다.

개방형(open) MOET 형태는 혼합형(hybrid)이라고도 하는데, 핵군 이외의 공란축 또는 수정란도 이용하며, 생산된 수소는 더 많은 유전정보를 얻고 동시에 능력평가를 위하여 현행 후대검정계획에 편입시키는 경우이다. 또한 혼합형에는 일반 농가의 공란축을 이용하는 산재형(dispersed)과 핵군을 2~3개의 분소로 운영하는 집중형(centralized) MOET 방식이 있다.

본 연구에서는 OPU-IVF 산업화 이전에 공란우 선발 및 관리, 수란우 선정 등 수정란이식 기본 체계 확립을 위하여 수행하였다.

<재료 및 방법>

1) 체내 수정란 생산 체계

수정란 생산 개요는 그림 2와 같다. 공란우의 질병 검사는 년 2회 실시하여 검사에 합격한 개체만을 선발하였다. 과배란 처리를 위하여 자궁세척, 영양제 주사 등 개체의 면역력을 강화 한다. 과배란 처리를 시작하고, 인공수정 후 7일째에 채란을 하였다.

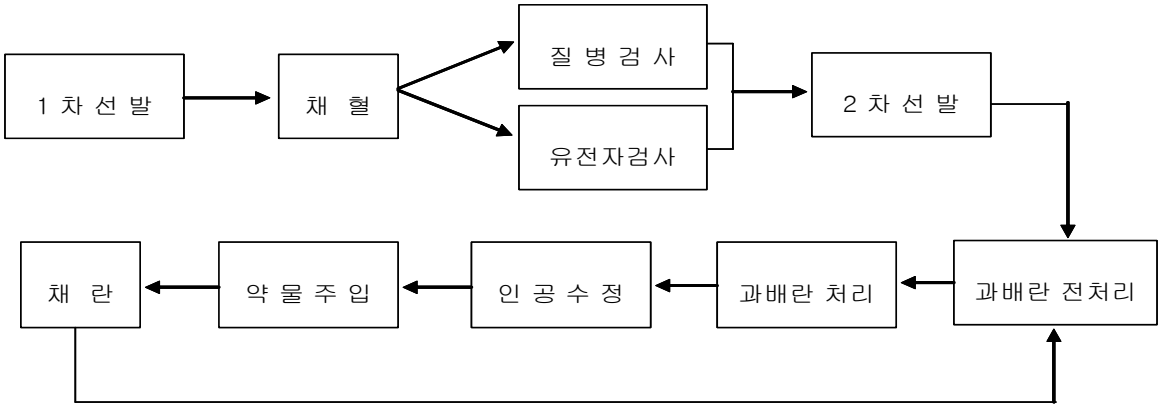


Figure 4. 공란우 선발 및 체내수정란생산 개요

2) 공란우 선발

수정란 생산을 위한 공란우는 질병에 이상이 없는 개체 중에서 생식기 검사 결과 자궁 및 난소 발달이 양호하고, 번식주기가 정상적으로 반복되고 생식기 질병이 없는 개체를 과배란 전처리 전에 선발한다. 공란우 선발 기준에 따라 부모 3계대 등록 이상으로 사용이 허가되어 있어, 유전능력이 검증되어야 한다.

3) 과배란 전처리

과배란 전처리는 2차 선발에 의해 선발된 공란우의 자궁에 항생제를 주입하고 질내에 CIDR(Controlled Internal Drug Releasing device; InterAg, New-Zealand)를 질에 삽입한다.

4) 과배란 유기

체내 수정란 생산을 위한 공란우의 과배란 유기는 CIDR 처리법을 적용하며, 공란우의 과배란 처리는 Fig 1과 같이 발정주기를 고려하지 않고 CIDR를 질에 삽입하고 삽입 후 4-7일부터 과배란을 유기하기 시작하며, 과배란 유기에 사용된 성선자극호르몬은 FOLLTROPIN-V(Vetrepharm, Canada)를 이용하여 12시간 간격으로 4일간 1일 2회, 50㎎/회의 동일한 양을 둔부에 근육주사 한다. 과배란 유기 3일째에 dinoprost(Lutalyse TM, Upjohn, Belgium) 45㎎을 2회 분할하여 근육주사 함으로써 황체퇴행을 유도하며 과배란 유기 4일째에 CIDR를 제거하여 발정을 유기한다.

5) 공란우 인공수정

과배란 유기된 공란우의 인공수정은 과배란 처리 후 발정이 발현된 공란우에 12시간 간격으로 2 straw/회의 정액을 3회 인공수정하고 배란촉진을 위해 첫 번째 인공수정 할 때 GnRH(gonadon, Dongbang Co., Korea) 10㎖를 근육주사 한다.

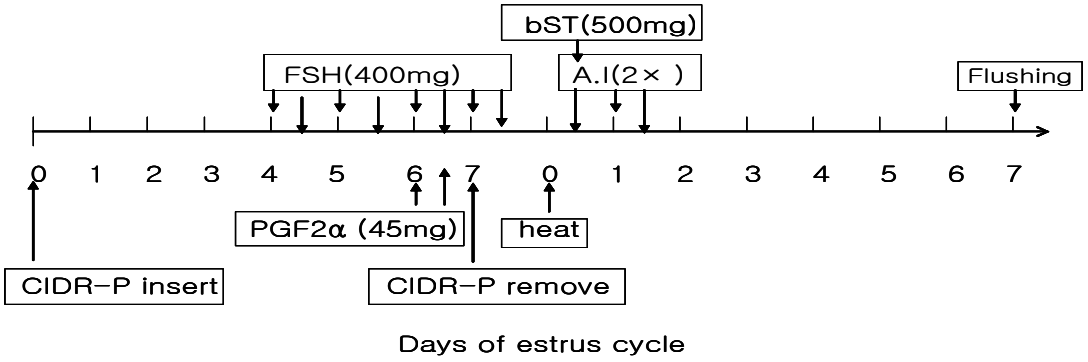


Figure 5. 사이드플러스를 이용한 과배란 처리 과정

6) 수정란 회수

과배란 유기된 공란우로부터 수정란의 회수는 발정발현 7일째에 lidocain hydrochloride(2% Lidocain inj, Jeil Pharm. Co., Korea) 50-70㎎을 천추와 제1미추 또는 제1미추와 제2미추 사이에 주입하여 경막외 마취를 실시한다. 채란배지는 Dulbecco's phosphate Buffered Saline(D-PBS, Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A)에 우혈청(Fetal Bovine Serum; FBS, Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A) 2%와 항생제(Antibiotic-Antimycotic, Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A) 1%를 첨가하여 사용한다.

멸균된 자궁경관 점액제거기(Fujihira Industry Co., Japan)를 이용하여 경관내의 점액을 제거하고 foley catheter(Fujihira Industry Co., Japan)를 자궁각 선단부에 고정한다. tubing을 이용하여 채란 kit와 catheter를 연결하고 채란 kit에 부착된 50㎖의 무독성 주사기를 이용하여 채란배지를 30-50㎖씩 주입하여 회수한다. 회수된 배지는 수정란 회수컵(Embryo collector, Fujihira Industry Co., Japan)으로 여과한다. 수정란 회수컵에서 수정란의 회수는 실체현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 실시한다.

7) 수정란 검사

수정란의 발육단계와 질의 평가는 회수된 수정란을 5%의 FBS가 첨가된 D-PBS 배지가 담겨있는 35×10㎜의 tissue culture dish(Corning Laboratory Science Co., U.S.A.)로 옮겨 세정한 후 수정란의 발육단계와 질을 형태학적으로 평가한다. 수정란의 발육단계는 상실배기(morula), 치밀상실배기(compact morula), 배반포기(blastocyst) 및 확장배반포기(expanded blastocyst)와 탈출배반포(haching blastocyst)로 구분하며, 수정란의 질은 International Embryo Transfer Society(Stringfellow와 Seidel, 1990)의 기준에 준하여 1등급(excellent), 2등급(good), 3등급(fair), 4등급(변성란 및 사멸란)과 미수정란(Non-fertilization)으로 구분한다.

< 결과 및 고찰 >

체내수정란의 생산은 수정란 생산의 시작 과정으로 향후 체외수정란의 생산 및 이식의 가능성을 타진하기 위하여 수행하였다. 5두의 공란우(OPU 이용 공란우 동일)에서 각 2회씩

체내수정란을 생산하여 이식한 결과, 수정란회수는 평균 3.6(36개/10회)개였고, 이식한 임신율은 평균 52.8%(19두 임신/ 이식 36회)를 기록하여 자체적인 수정란의 생산 및 이식 체계를 확립할 수 있었다. 채란 및 검사 과정은 Fig. 과 같다.

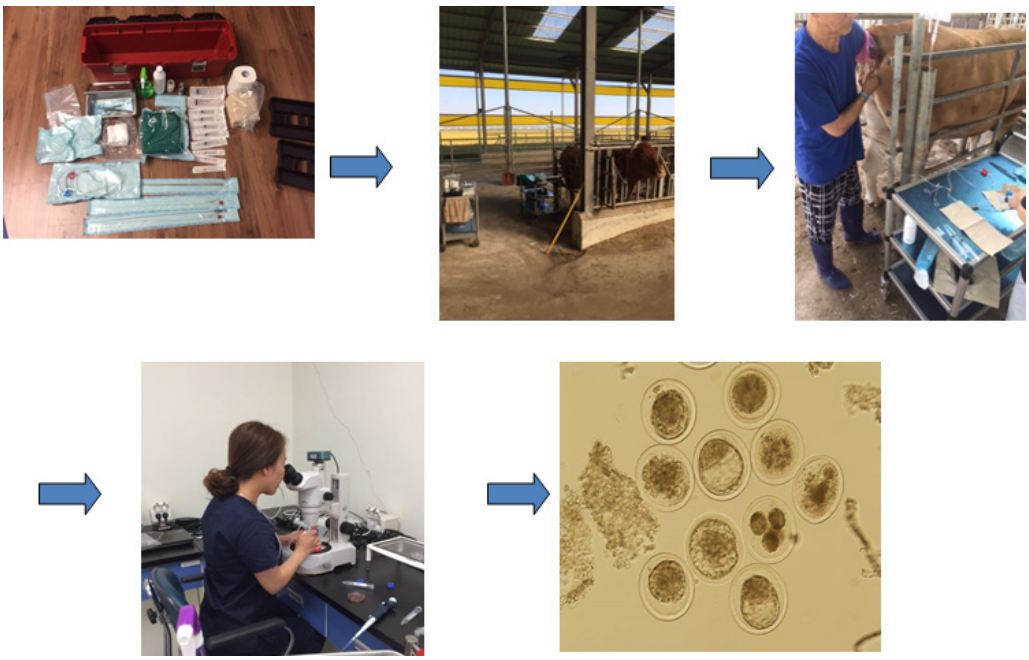


Figure 6. 체내 수정란의 생산 및 검사 과정

나. 우량 공란우 선발

<서론>

수정란이식에서 가장 중요한 것은 양질의 수정란을 일정하게 다량 생산하는 것이다. 그러기 위해서는 농가의 선정에서부터 공란우의 관리, 적절한 과배란처리 프로그램, 우수한 정액으로 인공수정, 풍부한 수정란 채란 경험 등이 요구된다. 과배란의 성공률을 현저히 높이기 위한 중요한 요소들은 ① 공란축 관리시의 경험과 전문적 기술 ② 공란축의 유전자 ③ 공란축의 영양섭취 ④공란축의 연령 ⑤ 공란축의 수유상태 ⑥ 정액의 질 ⑦ 수정시간 이다. 공란축 관리의 경험이 다른 요소들을 포함하므로 다양하게 나타나는 과배란 결과에 영향을 줄 수 있는 가장 중요한 요소이며, 성공적인 공란축의 관리자들은 일상적으로 위의 요소들을 잘 이해하고 모두 충족시킨다고 했다. 하지만 숙련되지 못한 관리자들은 이 요소들을 완전히 이해하지 못해 그 요소들의 활용에 어려움을 겪는다. 과배란처리를 위해서는 공란우의 발정후 9~14일에 성선자극호르몬을 투여해야하는데 반복적인 과배란처리 및 간격 단축을 위해서는 자연적인 발정발현 상태를 관찰하여 처리하는데 어려움이 있었으나 황체호르몬방출 질내삽입장치(Intravaginal progesterone release devices)를 이용하여 공란우의 발정발현과 상관없이 과배란처리 시기를 조절하여 처리하고 있다.

<재료 및 방법>

1) 우량 공란우(한우) 확보 : 체계적인 질병 검사 등 공란우 기준 정립

축산법 제 18조에 따르면 수정란 생산용 공란우 기준은 '부모대 이상이 혈통등록된 씨암소'를 이용해야 한다. 즉, 부모 모두 3대 이상의 혈통이 확인된 개체라야만 공란우로 활용이 가능하다. 한편 질병검사는 종축 기준에 준하여 부루셀라, 요네, 결핵 및 구제역을 검사하여 모두 음성이 확인된 개체에 한하여 활용이 가능하다.
공란우 질병 검사

<결과>

- 공란우 선발 내역

본 연구의 안정적인 수행을 위하여 1차년도에는 7두, 2차년도에는 15두의 공란우를 선발하여 실험에 이용하였고, 공란우 개체별 내역은 아래와 같다. 채란용 공란우는 자체 보유 한우 암소 중에서 혈통 및 계대가 공란우 선발기준에 적합한 것 중에서 체형 등이 우수한 것을 선발하였다. 선발된 공란우는 주기적으로 결핵, 부루셀라, 구제역 및 요네병을 검사하였다. 각각 선발된 공란우는 1회 채란시 3두씩 분류하여 실험에 제공하였다.

Table 1. 공란우 선발 내역

등록번호	등록구분	생년월일	계대	개체식별번호	성별	등록일
227227102	고등	2014-03-29	4	0023 0774 9059	암	2014-07-08
228962046	혈통	2017-03-19	3	0021 1632 6014	암	2017-04-06
227497169	고등	2014-09-20	4	0020 9432 6423	암	2014-12-10
228075223	혈통	2015-04-21	4	0023 1123 1870	암	2015-11-02
227012291	혈통	2014-03-24	7	0023 0757 8892	암	2014-03-31
228703785	고등	2015-07-02	7	0021 0176 7068	암	2016-10-14
224355508	고등	2009-03-14	1	0020 0187 4183	암	2009-07-07
230617611	혈통	2017.05.10	3	002117804981	암	2019.06.21
228954228	혈통	2017.02.11	8	002112109924	암	2017.04.04
228962046	혈통	2017.03.19	3	002116326014	암	2017.04.06
227497169	고등	2014.09.20	4	002094326423	암	2014.12.10
229186048	혈통	2017.06.09	2	002119331454	암	2017.06.29
228075223	혈통	2015.04.21	4	002311231870	암	2015.11.02
227227102	고등	2014.03.29	4	002307749059	암	2014.07.08
228801326	혈통	2016.06.14	4	002110153893	암	2016.12.07
225789684	혈통	2012.02.10	2	002073556813	암	2012.03.21
230733828	혈통	2018.05.04	2	002127357479	암	2019.08.05
228703785	고등	2015.07.02	7	002101767068	암	2016.10.14
224355508	고등	2009.03.14	1	002001874183	암	2009.07.07
227012291	혈통	2014.03.31	7	002307578892	암	2014.03.31
228817168	혈통	2016.11.04	8	002112988734	암	2016.12.15
226504030	혈통	2013.02.07	7	002301894614	암	2013.05.03

선발 공란우의 유전능력을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 공란우의 유전적 형질은 냉도체중(kg), 배최장근단면적(kg), 등지방두께(mm), 및 근내지방도(점)로 구분하여 조사하였다. 각각의 유전형질은 A - D 그룹으로 분리하여 분석 하였다.

Table 2. 공란우의 유전형질 분석

구분	냉도체중(kg)	배최장근단면적(kg)	지방두께(mm)	근내지방도(점)
002307749059	11.903	1.761	0.074	0.939
	B	C	D	A
002116326014	13.724	2.839	0.215	0.287
	A	B	D	C
002094326423	12.921	4.047	-0.342	0.518
	B	A	B	A
002311231870	11.725	2.0	-0.294	-0.031
	B	C	B	D
002101767068	8.516	2.362	-0.755	0.368
	C	B	A	B
002101767068	24.435	3.718	-0.254	0.237
	A	A	C	C
002001874183	7.683	1.779	-0.679	-0.323
	C	C	A	D
002117804981	18.201	4.295	-0.805	0.237
	A	A	A	C
002112109924	12.715	3.859	-1.277	0.252
	B	A	A	C
002116326014	13.851	3.109	0.136	0.313
	B	B	D	C
002094326423	12.654	3.676	-0.409	0.505
	B	A	B	B
002119331454	8.858	1.808	0.611	0.402
	C	C	D	B
002311231870	12.458	2.043	-0.175	-0.064
	B	C	C	D
002307749059	10.957	1.905	0.135	0.927
	C	C	D	A
002110153893	27.006	3.264	0.057	0.098
	A	B	D	D
002073556813	9.86	2.151	0.382	0.189
	C	C	D	D
002127357479	24.3	5.771	-0.215	1.132
	A	A	C	A
002101767068	26.432	3.6	-0.136	0.174
	A	B	C	D
002001874183	8.419	1.93	-0.67	-0.341
	C	C	A	D
002307578892	9.029	2.914	-0.743	0.39
	C	B	A	B
002112988734	2.29	0.902	-0.355	0.276
	D	D	B	C
002301894614	6.324	4.208	-0.217	0.658
	D	A	C	A

다. 생체내 난자 회수(OPU) 체계 확립

<재료 및 방법>

1) 공란우 준비

공란우는 체내수정란용 공란우와 같이 질병검사 및 혈통이 확립된 것을 이용하였다. 1차년 5두, 2차년 15두의 공란우를 선발하여 연구에 활용하였다.

2) 실험실 및 채란장 준비

난자의 회수를 위하여 본 회사의 목장에 전용 채란장을 신축하였다(그림). 채란장은 공란우의 보정과 채란을 용이하게 하기위하여 충분한 공간과 전용 보정틀을 제작하여 사용하였다.

3) 난자회수 전처리

난자회수 전처리는 선발된 공란우에 난자회수 72시간전에 Gonadorelin 500ug을 주사하여 난자의 발육을 촉진시킨다. 시험 계획에 따라 미처군과 처리군에 대한 난자회수율 검토 결과에 따라 이후 실험에서는 GnRH를 투여하였다.

4) 난자 회수

공란우로부터 미성숙 난자의 회수는 10일 간격 또는 실험 조건에 따란 실시하였다. lidocain hydrochloride(2% Lidocain inj, Jeil Pharm. Co., Korea) 50-70㎎을 천추와 제1미추 또는 제1미추와 제2미추 사이에 주입하여 경막외 마취를 실시한다. 난자 회수 배지는 D-PBS(Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A)에 우혈청(Fetal Bovine Serum; FBS, Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A) 5%를 첨가하여 사용하였다.

5) 난자 회수

준비된 공란우는 경막외마취 이후 회음부를 베타딘 및 세척수로 세척한후 완전히 건조하였다. 난자 채취용 프루브가 부착된 초음파기기(HS-2000, Honda, Japan)에 난자채취용 주사침을 부착하여 질내로 삽입하였다. 직장검사로 난소를 확인하고, 푸르부의 선단에 난소를 위치하여 니들을 이용하여 난자를 회수 하였다. 난포를 포함한 난자회수용 배양액이 들어있는 conical tube는 35℃를 유지하며 진행한다. 침전물을 제거하고 난자를 찾기 위해 대형 배양 접시에 담는다. 난포액 또는 D-PBS로 침전물을 적절한 수준으로 희석하여 난자를 쉽게 찾을 수 있게 한다. 피펫으로 난자들을 가져와 접시에서 잘 보이도록 하고 깨끗한 난포액이 들어있는 작은 배양 접시로 옮겨준다. 난자를 찾는 동안 35-38℃의 따뜻한 plate에서 모든 dish들을 유지한다.

Figure 7. 채란장 및 채란 시술

Figrue 8. 실험실 및 배양기

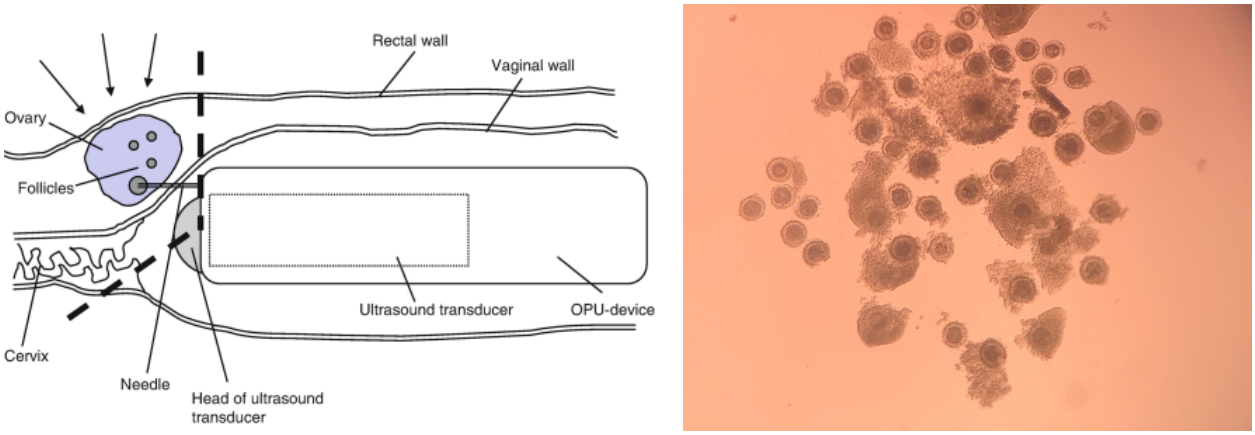


Figure 9. 난자회수 모식도(참조, Animal Biotechnology), 회수된 난자

회수된 난자는 5% FBS 함유 TCM-199 배양액에서 세척한 후 난구세포가 치밀한 난자만을 선발하여 체외성숙에 이용하였다(그림).

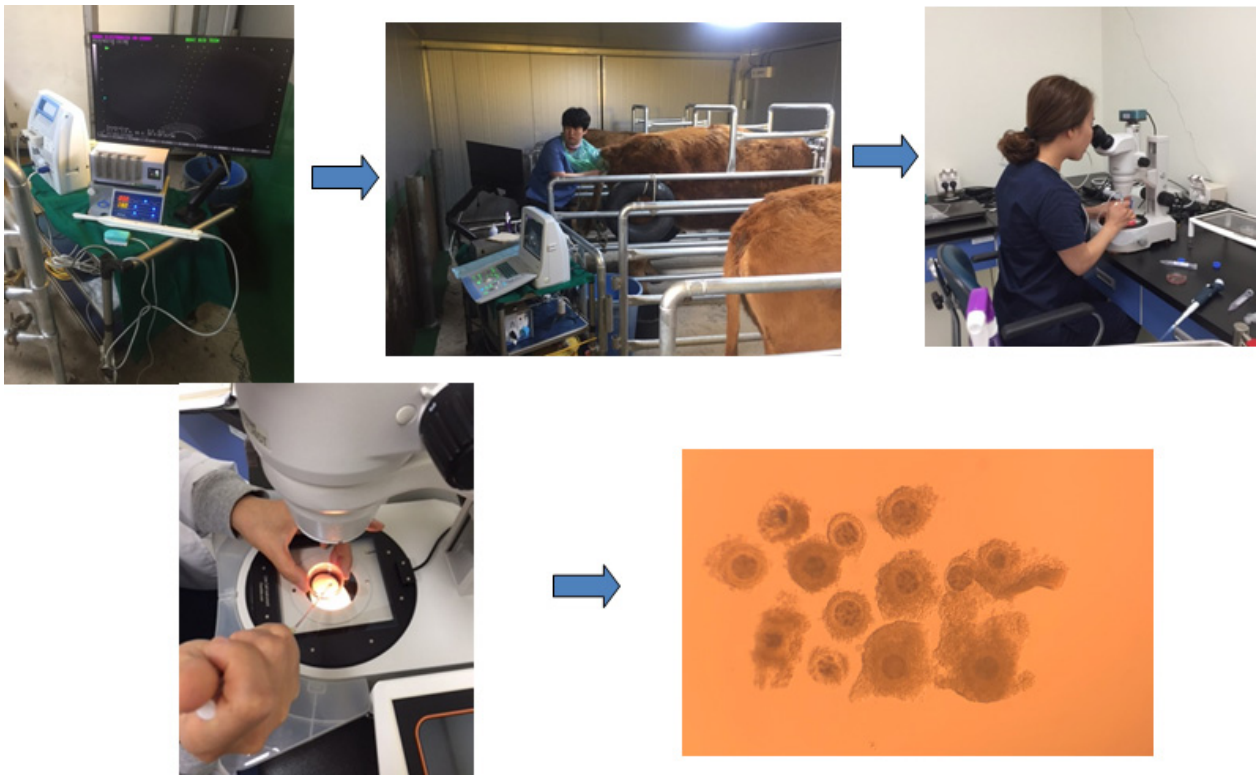


Figure 10. 미수정난자의 회수

<결과>

1) 호르몬 종류 및 투여 시기 조절을 통한 난자 회수율 향상 연구

선발된 공란우에 GnRH 투여가 생체내 난자 회수 성적에 미치는 효과를 분석한 결과는 Table 4와 같다. GnRH 제재는 Gonadorelin 500ug을 채란 72시간전에 근육 주사하였다. 시험에 제공된 공란우는 각각 3두로써 동일한 개체를 이용하였다. GnRH 미투여군인 대조군의 평균 회수 난자수가 3.4개였고, 수정율 42.6%, 배란포 발달율 25.9%였고, 이식가능한 수정란은 0.9개였다. 한편 투여 시험군에서는 회수 난자수가 6.4개로 약 2배 증가하였고, 수정률과 배반포 발달율은 각각 65.3% 및 20.4%로 배반포 발달율은 오히려 미투여군에 비하여 낮았으나, 이식가능한 수정란수는 평균 1.3개로 증가하였다.

Table 3. 공란우 GnRH 투여가 OPU 난자의 개수에 미치는 효과

	No. Donors	No. of OPU	No. of oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	Average Transferable BL
Control	3	16	3.4	42.6%	25.9%	0.9
Treatment	3	27	6.4	65.3%	20.4%	1.3

축번 : 002311231870, 002101767068, 002094326423
반복 : 3두를 미투여 16회, 투어 27회 분석

2) 채란용 펌프 압력 효과

난자 회수에서 필수적인 진공 펌프의 압력이 배발달에 미치는 효과를 분석한 결과는 Table 5와 같다. 대조군은 통상적인 18G 주사기를 이용한 흡입법이고, 실험군은 각각 진공펌프의 압력이 0.6, 0.7 및 0.8 kPa로 설정하였다. 각각 압력에서 수정율이 74.6, 58.4, 71.8 및 85.5%로서 kPa 0.8이 가장높았다. 배반포 발달율은 각각 19.4, 19.5, 28.2 및 27.6%로서 PSI 0.7과 0.8에서 높게 나타났다. 이식가능한 배반포수에서도 PSI 0.7과 0.8은 각각 5.5개 및 5.3개 였고, 대조군과 kPa 0.6 시험군은 3.3개 및 3.8개로 낮은 경향이었다.

Table 4. 채란용 vaccum pump의 압력이 수정란 발달에 미치는 효과

kPa/mmHg	No. of Oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	Average Transferable BL
Control	67	74.6%	19.4%	3.3
0.6	77	58.4%	19.5%	3.8
0.7	78	71.8%	28.2%	5.5
0.8	76	85.5%	27.6%	5.3

* Control : 18G 10ml syringe 이용
* Oocytes from slaughter house

라. OPU 난자를 이용한 수정란 배양 연구

생체 내에서 일어나는 수정 과정을 체외에서 인위적으로 재현시키는 일을 체외수정이라 한다. 체외수정란 생산과정은 생체 내에서 난자 회수(도축장 난자), 미성숙 난자의 성숙, 성숙 난자의 체외수정과 체외배양 과정을 거치게 된다. 현재 사람에서는 불임 극복 수단으로 사용되고, 가축에서는 난관 폐쇄우, 자궁내막 질병우 및 고능력소의 난자를 이용한 후대 생산 등에 이용되고 있다. 하지만 체외 생산과정은 특별한 실험실과 숙련된 기술이 필요하여 일반 종축장에서는 널리 시행되지 않고 있다.

체내수정란은 공란우로부터 수정란을 채취하기 위해서는 많은 시간과 비용이 소요되지만 얻을 수 있는 수정란은 제한되어 있다. 하지만 생체 내에서 회수된 난자를 이용한 체외수정란은 저렴한 비용으로 많은 수의 난자를 생산하므로 많은 수정란을 얻을 수 있다. 또한 체내수정란 생산 효율이 낮은 공란우로부터도 수정란의 생산이 가능하다.

< 재료 및 방법 >

OPU로 회수된 난자의 체외수정란 생산을 위해서 배양시스템(IVMD vs. SOF), 혈청 효과 등을 검토하였다. 체외배양 시스템은 기능성펩타이드연구소(일본)의 배양 체계인 IVMD101, IVF100 및 IVD100를 이요하여 혈청의 첨가 유무를 비교 실험하였고, SOF 기본으로 만들어진 ART Lab(호주) 배양액의 활용성을 검토하였다.

(체외배양체계 1; IVMD - IVF - IVD)

1) 체외성숙

회수된 난자는 IVMD101(Japna) 배양액 100ml이 담겨져있는 6-well plate에 15개 미만씩 각 개체별로 회수된 난자의 개수를 넣어서 체외성숙을 유도하였다.

2) 체외수정

정자 준비과정은 그림 과 같다. 체외성숙이 완료된 난자는 IVF100(Japan) 수정액을 2회 세척하여 50ml IVF 미세소적에 넣고, 정자 5ul를 넣어 체외수정을 유도하였다.

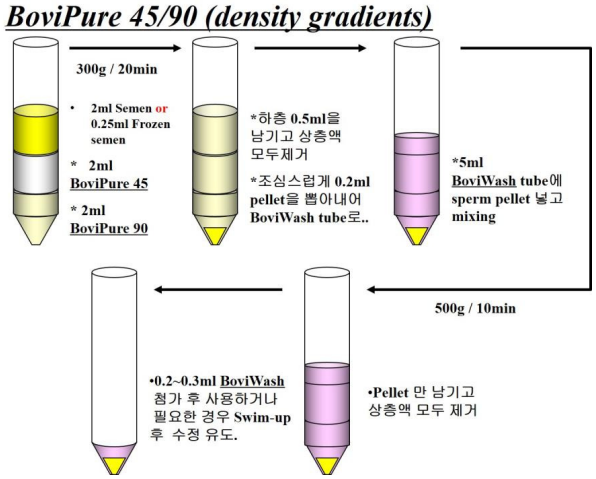


Figure 11. 정자처리

3) 체외배양

체외성숙 6시간째에 접합자를 회수하여 체외배양외 배지인 IVD100(Japan)에 3회 세척하여 난구세포를 제거하였다. 세척된 접합자는 100ml IVD100을 넣고 미네랄오일로 피복한 6-well plate에 넣고 체외배양을 유도하였다. 체외배양 3일차에 1/2의 배지를 신선배지로 교환하였다.

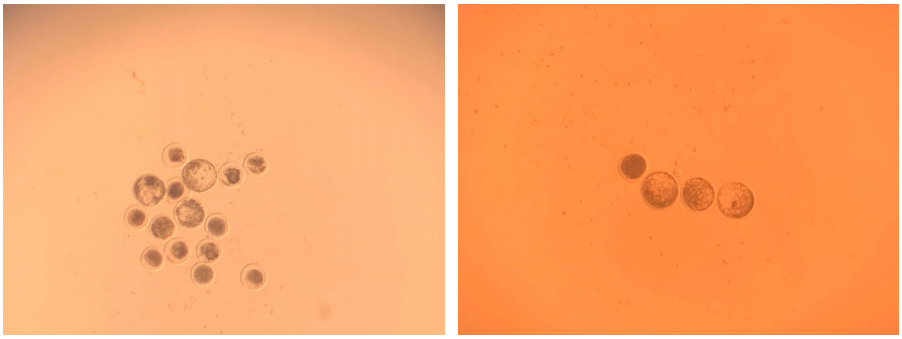


Figure 12. - OPU - IVF 배반포

4) 수정란 발달 및 이식

체외배양 6일째부터 수정란을 검사하여 배반포 단계로 발달된 수정란을 선발하여 수정란 이식에 이용하였다.

(체외배양 체계 2; SOF 기반)

1) 체외성숙

체외성숙용 배양액인 VitroMat(Australia) 배양액은 6-well dish(OOPW-SW03, Oosafe)의 각 well에 200㎕씩 넣은 후 Paraffin oil(Nid Oil; NIDACON)로 덮고 사용 전 적어도 4시간 이상 38.5℃, 6% CO2로 평형을 유지하였다.

OPU 난자의 회수는 무혈청배양액과 같다. 난포액에서 난자 찾기가 끝나면, 1mL의 VitroWash가 들어있는 2개의 Center well (2-well) dish에서 차례대로 세척한 후, 1mL의 VitroMat Protect가 들어있는 Center well (2-well) dish에서 마지막으로 깨끗하게 세척하고 미리 제작되어 있는 6-well dish에서 난자 1개당 10㎕ 이상의 volume으로 incubator에서 배양한다. 미성숙 난모세포는 38.5℃, 6% CO2조건에 22-24 시간 동안 배양하여 세포질 및 핵 성숙을 유도한다.

2) 체외수정

체외수정은 체외성석 22-24시간에 시행한다.(Day 0) 약 22 시간의 성숙 후, 피펫으로 성숙 접시에서 난자를 수집하고 3mL wash medium이 들어있는 작은 petri 접시에 넣는다. 세척된 난자는 3mL의 수정 배지가 들어있는 두 번째 작은 petri 접시에서 수집 및 세척 한 다음 적절한 배지 (수정 배지 아래의 설명 참조)에서 수정 접시에 옮긴다.

3) 정자 준비

Sperm Gradient (BoviPure) - BoviWash는 사용 전 미리 15ml conical tube에 5ml씩 분주하여 냉장 보관해둔다. 정액처리 약 1 시간 전에 냉장보관 중인 BoviPure 90, BoviPure 45와 BoviWash를 꺼낸 후 BoviPure 90% 2ml를 15ml conical tube에 넣고 BoviPure 45% 2ml을 그 위에 조심스럽게 layering한다. 준비된 BoviPure(45/90)와 BoviWash는 실온에서 최소 30분 후부터 사용한다. 동결정액(0.5ml)을 융해하여 곧바로 BoviPure가 준비된 conical tube에 넣고 원심분리하여 깨끗한 정자를 수집한다. 정자처리의 모든 과정은 실온에서 진행한다.

4) 체외 수정

체외배양용 배양액의 최종 부피 (정자 용액 포함)는 10uL / COC로 준비한다. 배양액은 일반적으로 Oil로 덮인 VitroFert 180uL를 넣고 6-well dish에 준비한다. 세척된 COCs (10개)는 20uL의 VitroFert (최종 세척 단계에서)에 담아 well에 옮겨준다. 50uL의 정자 (5x106/ml)를 첨가하여 최종 부피를 250uL로 만든다.

5) 접합자 확인 및 cleavage medium으로 이동

수정 후 18-24 시간에 cumulus을 제거하고 수정된 배아들은 배양액 소적 또는 6-well dish로 이동시킨다. IVF를 시행한 날을 Day 0으로 간주하며, 다음 날인 Day 1에는 지정된 cleavage medium(VitroCleave Plus)으로 옮겨진다. 배양 5일째에는 배아들을 blastocyst medium(VitroBlast Plus)로 옮기고, 분열된 배아의 수를 기록한다.

6) Zygote(접합자)를 VitroCleave Plus 배양액 이동

VitroCleave Plus medium은 사용 3시간 전에 38.5℃ , 6% CO2,7%O2조건으로 미리 평형을 맞춰야 한다. 배양액의 최종 부피는 10uL / embryo가 되는 것이 좋다. 6-well dish의 각 well에 100uL 이내로 VitroCleave Plus 배양액을 넣고 Nid Oil로 덮어서 준비한다. (각 well 마다 5 - 10개의 배아를 배양하는 것이 좋다) Center well dish (#353653)의 중앙에 VitroWash 배양액을 넣어 준비해 두는데, VitroWash는 ungassing 상태로 사용하는 배양액이며, gassing이 되지 않는 배양기 밖에서 pH 변화없이 warm plate 위에서 오랜 시간 작업할 때 유용하게 사용할 수 있다.

① 수정 18-24 시간 후에, 소의 배아보다 약간 큰 피펫을 사용하여 IVF dish에서 배아를 loading하고, VitroWash 배양액이 들어있는 center well dish에 배아를 옮긴다. 잔여 난구세포는 피펫을 사용하여 피펫팅에 의한 기계적 방법 (mechanical shearing)으로 제거한다.

② 나화된 zygotes를 VitroCleave Plus 배양액이 들어 있는 6 well dish 로 옮겨 여러 번 세척한 후 배아 배양 전용 well로 옮겨 배양을 시작하되 적절한 비율 (5-10개 / well 당)로 배양한다.

③ 38.5℃, 6% CO2,7%O2및 질소로 평형을 유지시키는 조건에서 배아가 들어 있는 VitroCleave Plus medium dish를 incubator에서 96시간 (5일) 동안 배양한다.

7) blastocyst medium으로 배아 이동

배양 Day5 - 배아를 VitroBlast Plus 배양액에 옮기기는 과정은, VitroBlast Plus medium은 사용 3 시간 전에 38.5℃, 6 % CO2,7%O2로 미리 평형을 한다. 6-well dish의 각 well에 100uL 이내로 VitroBlast Plus 배양액을 넣고 Nid Oil로 덮어서 준비한다. (각 well 마다 5 - 10개의 배아를 배양하는 것이 좋다)

① Cleavage culture 용 6 well dish에서 96시간 동안 배양 후, 배아를 blastocyst culture 용 6 well dish로 옮겨 VitroBlast Plus 배양액이 들어 있는 well에서 여러 번 세척한 후 배아 배양 전용 well로 옮겨 배양을 시작하되 적절한 비율 (5-10개 / well 당)로 배양한다.

② 38.5℃, 6% CO2,7%O2및 질소로 평형을 유지시키는 조건에서 배아가 들어 있는 VitroBlast Plus 6 well dish를 incubator에서 48-72 시간 동안 (7-8 일) 배양한다.

< 결과 >

1) 체외수정란 생산체계 확립 연구

체외수정란의 생산을 위한 실험실 조건 확립을 위하여 도축난소를 이용하여 수정란 생산 실험을 한 결과는 아래와 같다. 도축난소를 이용하여 1차년도에는 개체별 정보 확인 없이 일괄로 배양 실험을 하여 기본적인 실험기술을 획득하였고, 2차년도에는 개체별 배양 기술을 확립하여 수정란으로 이식이 가능한 혈통 3개대 이상의 난소를 확보하고, 등급 판정하여 등급이 우수한 난자를 선택적으로 활용하여 수정란을 생산하는 체계를 완성하였다.

도축난소와 생체내 난소에서 회수한 난자가 배발달율에 미치는 효과를 분석한 결과는 Table 7과 같다. 도축 난소에서 유해한 난자의 수정률, 배발달율 및 이식가능한 배반포 생

산이 각각 76.3%, 31.8% 및 11.9개 였고, 생체내 난자에서는 각각 66.5%, 32.9% 및 15.6개로서 수정율은 생체내 난자가 낮았으나, 배반포 발달율과 이식가능한 수정란수에서는 높은 경향이었다.

Table 5. 도축 공란우 난자의 체외 배발달율 조사

Donors	No. of Oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	Others
Slaughterhouse	337	76.3%	31.8%	

2) 배양액 및 혈청 첨가 효과

기본 배양체계로 선발된 각 배양체계에 대한 체외 배반포 발달율을 조사한 결과는 Table. 와 같다. IVMD 배양체계는 수정률 70.2%, 배반포 발달율이 27.8% 였으나, SOF 배양체계는 수정율은 75.4%, 배반포 발달율 20.5%로서 수정율은 SOF 배양체계가 높았으나, 배반포 발달율은 IVMD 체계가 높아 이후 실험은 IVMD 배양체계를 기준으로 시행하였다.

Table 6. 무혈청배지 기반의 체외배양액선정 연구

Media	No. of Oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	Others
IVMD	453	70.2%	27.8%	
SOF(ART)	122	75.4%	20.5%	

체외성숙 및 배양액에 혈청의 첨가가 배반포 발달율에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 10과 같다. 체외성숙 및 배양액에 혈청 미첨가는 수정율 74.1%, 배반포 발달율 19.1% 및 이식가능한 수정란 3.4개 였고, 체외 성숙 및 배양액에 각각 3% FBS 모두 첨가시에는 71.5%, 24.7% 및 4.3개로서 배반포 발달율과 이식가능한 배반포 수가 증가하였다. 체외성숙 혈청 미첨가에서는 배양과정에 3% FBS 첨가가 배반포 발달율 20.4% 및 3.9개로 높은 경향이었다. 체외성숙 배양액 혈청 첨가군에서는 배양액 혈청 첨가가 배반포 발달율과 이식 가능 수정란 개수가 상승하였다.

Table 7. 체외 성숙 및 배양액에 혈청 첨가가 배발달율에 미치는 효과

IVM	IVC	No. of Oocytes	2cell <(%)	No. Blastocyst	No. Transferable Blastocyst
Without	Without	167	74.1%	19.1%	3.4
Without	3%	503	69.4%	20.4%	3.9
3%	Without	121	58.2%	13.6%	2.5
3%	3%	183	71.5%	24.7%	4.3

3) 도축 난자를 이용한 체외수정란 생산 체계 연구

체외수정란 실험효율성 향상 및 실험 체계 확립을 위하여 OUP 난자를 이용한 수정란체계 확립 이전에 도축 난소를 활용하여 실험실 및 실험과정을 세팅하였으며 그 결과는 Table 와

같다. 개체별 공란우 난자의 배양 효율 향상을 위하여 도축장 유래 난소 제공 암소의 등록 현황은 혈통등록이 31두, 고등등록 4두 및 기초 등록 5두를 이용하였다.

Table 8. 본 연구에 이용한 도축 한우의 등록과 등급 출현 현황

	1++	1+	1	2	3	others
기초		2		3		
혈통	4	15	8	4		31
고등	2	1		1		

도축 난자 제공 암소의 육질 등급에 따른 수정란 발달율을 조사한 결과는 Table 과 같다. 수정률은 1++, 1+, 1, 2 및 3등급에서 각각 90.4%, 74.2%, 66.3%, 64.4% 및 75.0%였고, 배반포 발달율은 26.9%, 27.9%, 11.6%, 40.4% 및 25.0%였다. 배반포 발달율이 2등급이 가장높았고, 1등급이 낮은 경향이었다.

Table 9. 육질등급이 체외수정란의 발달에 미치는 효과

Donors	No. of Oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	No of Transferable Blastocyst/Experiment
1++	52	90.4%	26.9%	2.3
1+	190	74.2%	27.9%	2.9
1	86	66.3%	11.6%	1.1
2	146	64.4%	40.4%	6.6
3	16	75.0%	25.0%	3.2

수정란의 배양에서 미세소적당 배양하는 수정란의 개수가 발달율이 영향을 미친하고 하였고, 이에 따른 배발달율을 조사한 결과는 Table 과 같다. 난자수 5개 미만은 수정률과 배반포 발달율이 25.0% 및 4.2%로서 다른 군에 비하여 낮은 경향이었고, 배반포 발달율은 11-15개가 30.1%로서 가장 높았다.

Table 10. 도축 난자의 배양 개수에 따른 수정란 발달율 비교

Donors	No. of Oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	No of Transferable Blastocyst/Experiment
-5	48	25.0%	4.2%	0.4
6-10	166	83.1%	28.3%	2.1
11-15	146	71.9%	30.1%	4.0
15-	165	61.8%	28.5%	5.9

4) OPU - IVF 수정란 생산 체계 확립

시험에 제공된 공란우의 개체별 배발달율을 조사한 결과는 Table 8과 같다. 수정율은 49059번 개체가 52.3%로 가장 낮았고, 나머지 공란우는 66.7 - 78.0%였다. 배반포 발달율은 26423번 공란우가 10.3%로 가장 낮았고, 26014번 50.0%, 78892번 48.5% 및 31870번 43.9%로 높은 발달율을 나타냈다. 한편 이식가능한 수정란 수에서는 74183번, 78892번, 49059번 및 31870번이 각각 2.4, 2.7, 12.3 및 2.3개로 높은 수준이었다.

Table 11. 공란우 개체별 배발달율 조사 결과(1차년도)

Donors	No. of Oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	No of Transferable Blastocyst
002001774183	64	73.4%	26.6%	2.4
002094326423	29	75.9%	10.3%	1.0
002101767068	33	66.7%	18.2%	0.8
002116326014	24	79.2%	50.0%	1.5
002307578892	33	66.7%	48.5%	2.7
002307749059	107	52.3%	34.6%	12.3
002311231870	41	78.0%	43.9%	2.3

2차년도 활용한 공란우 개체별 난자 개수와 배발달율을 조사한 결과는 Table 와 같다. 공란우는 각각 1회에서 9회까지 활용 하였다. 1회 활용 개체는 외부 수정란 생산 의뢰 또는 보정이 어려운 경우였고, 평균 채란회수는 4.8회 회당 난자개수는 9.1개였다. 평균 난자 10개 이상 회수된 개체가 7두였고, 이들의 배반포 생산 비율이 높았다. 수정률은 평균 69.8%, 배반포 발달율은 25.1%였다. 개체번호 31870번이 수정률 85.7%로 가장높았고, 67068번이 43.5%로 낮았다. 배반포 발달율은 78892번이 62.2%였고, 74183번이 3회 이상 채란한 경우 가장 낮은 2.3%를 나타냈다.

Table 12. 공란우 개체별 배발달율 조사 결과(2차년도)

Donors	No. of Experiments	No. of Oocytes	Oocytes /experiments	% of 2cell <	% of Blastocyst	No of Transferable Blastocyst
002117804981	2	17	8.5	64.7%	41.2%	3.5
002112109924	3	16	5.3	56.3%	6.3%	0.3
002116326014	8	34	4.3	55.9%	20.6%	0.9
002094326423	7	86	12.3	82.6%	44.2%	5.4
002119331454	1	24	24.0	83.3%	50.0%	12.0
002311231870	7	49	7.0	85.7%	30.6%	2.1
002307749059	9	115	12.8	67.8%	30.4%	3.9
002110153893	7	25	3.6	72.0%	36.0%	1.3
002073556813	4	47	11.8	63.8%	27.7%	3.3
002127357479	1	13	13.0	69.2%	0.0%	0.0
002101767068	6	23	6.0	43.5%	26.1%	1.0
002001874183	4	43	3.8	76.7%	2.3%	0.3
002307578892	4	45	10.8	82.2%	62.2%	7.0
002112988734	9	39	11.3	59.0%	15.4%	0.7
002301894614	4	31	4.3	71.0%	25.8%	2.0

생체에서 회수된 난자는 개체별로 체외성숙-수정-배양 과정을 거치게된다. 체외생산 과정에서 공동 배양하는 난자의 개수가 배발달에 미치는 효과를 분석한 겨로가는 Table 9와 같다. 난자 개수의 구분은 각각 < 5, 6-10, 11-19 및 20 < 구분하였다. 수정율은 6-10군 및 11-19군이 각각 79.1% 및 72.6%로서 높은 경향이었고, 배반포 발달율은 28.6% - 36%로서 6-10군이 가장높았다. 이식가능한 배반포 수량은 난자의 배양 개수가 증가할수록 1.1개 - 12.3개로 증가하였다. 통상적으로 체외수정란의 배양은 난자 개수 15개 또는 20개를 기준으로 배양하고 있으나 본 연구에서는 6-10군이 배반포 발달율이 가장 높았다.

Table 13. 체외배양시 난자의 개수가 배발달에 미치는 효과

No. of Oocytes	No. of Oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	No of Transferable Blastocyst
< 5	49	65.3%	34.7%	1.1
6-10	86	79.1%	36.0%	2.6
11-19	84	72.6%	28.6%	3.4
20 <	107	52.3%	34.6%	12.3

5) 체외수정 연구 : 우량 종모우정액 선정 및 배발달율비교

도축 난소를 이용한 체외수정과정에 사용한 정액의 종류가 배발달율에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 11과 같다. 종모우 870번의 수정율 81.1%, 배반포 발달율 35.8%로서 종모우 1194번의 75.4% 및 28.7%에 비하여 높은 경향이었으나, 이식가능한 수정란 개수는 5.7개 - 5.8개로 차이가 없었다.

Table 14. 체외수정란 생산에 있어서 종모우 효과

Bulls	No. of Oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	No of Transferable Blastocyst
870	95	81.1%	35.8%	5.7
1194	122	75.4%	28.7%	5.8

생체내 난자에 수정에 활용한 종모우에 따른 배발달율을 조사한 결과는 Table 12와 같다. 8종의 종모우 정액을 이용하였고, 종모우 1124번의 수정율과 배발달율이 82.9% 및 58.5%로서 가장 높았고, 종모우 1212번이 63.2% 및 15.8%로 가장낮은 경향이었다. 이식가능한 수정란 개수는 종모우 950번 및 1402번이 각각 5.7개 및 5.8개로서 높은 경향이었다.

Table 15. OPU-IVF 수정란 생산에 있어서 종모우 효과

Bulls	No. of Oocytes	% of 2cell <	% of Blastocyst	No of Transferable Blastocyst
950	58	63.8%	29.3%	5.7
1069	29	75.9%	31.0%	1.5
1124	41	82.9%	58.5%	3.0
1212	19	63.2%	15.8%	1.0
1360	37	62.2%	32.4%	2.0
1370	45	71.1%	20.0%	1.5
1402	102	58.8%	34.3%	5.8

6) 각 개체별 생산된 수정란

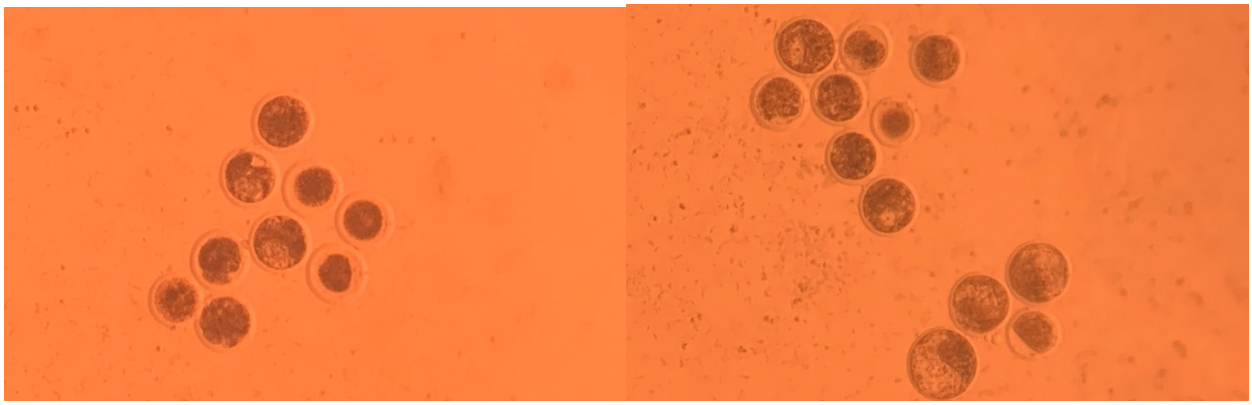


Figure 13.배양 7일째 수정란

마. 수정란이식 체계 연구

<서론>

수란우는 수정란을 생산한 공란우로부터 채란된 수정란을 이식시킬 대상이 되는 소를 말한다. 우량한 수란우의 선발은 수정란이식에 의한 가축개량의 성패를 좌우할 수 있는데, 그 이유는 공란우로부터 아무리 질이 좋은 수정란을 생산하여 이식하더라도 수란우의 상태가 좋지 않으면 이식된 수정란이 착상되지 못하여 수태가 되지 않으므로 수정란 이식에 의한 송아지 생산이 불가능하게 된다.

수정란이식을 성공하기 위해서는 생존성이 높은 수정란을 수태능력이 있는 수란우에 적절한 기술에 의해 이식하여야 한다. 이들 요인 중 한 가지라도 부족한 경우 수태율은 저하된다. 수정란생산과 이식을 위하여 우량한 수란우를 선발할 때는 일반적으로 다음과 같은 사항을 고려하여야 할 것이다.

수란우는 이식된 수정란을 태아까지 발육시키고 정상적으로 분만시키기 위해 이용되는 암소이다. 또 수란우는 이식된 수정란에 대해 유전적인 영향을 미치지 않기 때문에 특별히 능력이나 자질을 고려할 필요는 없다. 따라서 일반적으로 번식월령에 도달하였고 건강상 번식기능에 문제가 없으면 수란우로서 선정될 수 있다. 이식하는 수정란의 품종이나 개수에 따라서는 분만사고가 우려되기 때문에 수란우의 품종과 체격을 고려할 필요가 있다. 즉 이식하는 수정란의 품종과 동종의 수란우보다 조금 터 큰 수란우를 이용하여 난산을 예방할 수 있을 것이다. 또 쌍자 생산을 목적으로 2개의 수정란을 이식할 수란우는 임신의 유지, 분만시의 사고 및 포유능력을 고려하여 신중한 선정을 하여야 한다.

이와 같이 선발기준을 엄격히 적용하여야만 이식후 수태율이 향상될 것이지만 그렇지 못할 경우에는 아무리 우수한 수정란을 이식하여도 수태율이 저조하여 사육자가 경제적인 손실을 볼 수밖에 없다. 엄격한 선발기준으로 선발된 수란우는 자연발정 및 발정동기화를 실시하여 이식을 위한 준비를 실시한다. 이와 같이 수정란이식에 가장 위험한 부분이 수란우의 선정으로 매우 조심스럽게 다루어야 하며 다른 우군과 분리하여 사육하여야 한다.

<재료 및 방법>

1) 수란우 사양관리

수정란이식의 성공에는 수란우의 사양관리가 중요하고, 특히 영양 및 사료 관리가 중요하므로 임신율 향상을 위해서 사양관리 컨설팅을 하였다.

청초기 : 생초를 자유채식 시키되, 초생상태 또는 개체영양 상태가 불량할 때는 조단백질(CP) 10%내외, 가소화영양분총량(TDN) 72% 내외 수준의 배합사료를 적정량 보충 급여한다.

월동기 : 싸이레지, 건초 위주로 사양하되, 조사료 상태 및 개체별 영양상태가 불량할 때는 조단백질(CP) 10%내외, 가소화영양분총량(TDN) 72% 내외 수준의 배합사료를 적정량 보충 급여한다

2) 수란우 질병검사

수란우에 대한 질병관리 역시 중요한 관리사항 중 하나이다. 특히 유산을 일으키는 전염병의 발생은 수란우에 한정되는 것은 아니지만 송아지 생산에 치명적이다. 이전까지 발생했던 질병, 최근 인근지역에서 발생하고 있거나 발생이 우려되는 질병에 대해서는 백신접종,

주기적인 소독 등 발생을 원천적으로 차단할 수 있는 관리가 필요하다. 수정란 이식을 위한 수란우는 일제 채혈 및 질병검사를 통해서 이상이 없는 것으로 확인 한 후 선발 하여 사용하였다.

3) 수정란 이식을 위한 발정동기화

수정란이식을 위한 수란우의 발정동기화는 Fig 4와 같이 CIDR 처리 또는 GnRH 처리군으로 나누어 처리하며, CIDR 처리군은 발정주기에 관계없이 CIDR를 질에 삽입하는 날을 0일로 설정하고 7일후 dinoprost(Lutalyse TM, Upjohn, U.S.A) 30㎎을 근육주사한 후 8일에 CIDR를 제거하여 발정을 유도한다. GnRH 처리군은 발정주기에 관계없이 GnRH 200㎎을 근육주사하고 이후 7일에 dinoprost(Lutalyse TM, Upjohn, U.S.A) 30㎎을 근육주사 하여 발정을 유도한다. CIDR 처리군과 GnRH 처리군 모두 발정이 발현된 개체는 발정발현 후 12시간 후에 GnRH 200㎎을 근육주사 하여 배란촉진을 유도한다.

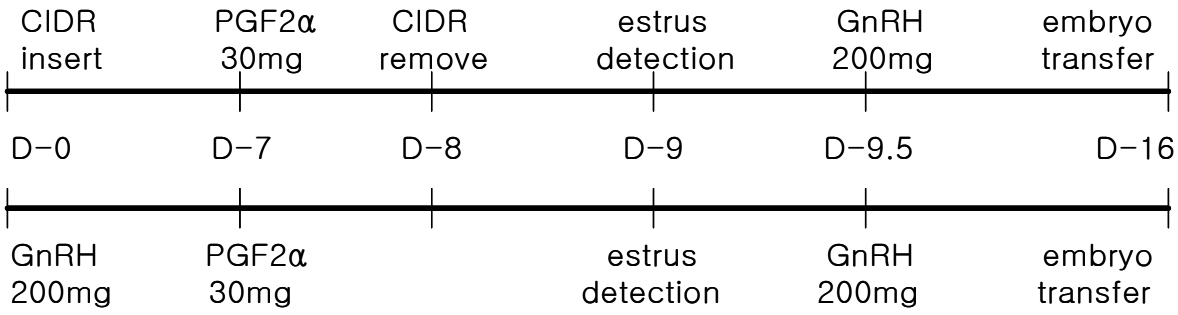


Figure 14. 발정동기화 프로그램

4) 수정란이식

수정란 이식은 발정이 발현된 수란우 중 발정발현 후 6-7일령에 직장검사를 이용하여 황체의 크기를 측정하여 황체발육이 양호한 개체만을 선발하여 수정란 이식에 이용한다. 체내 또는 체외에서 생산된 배반포기 단계의 수정란을 5% FBS가 첨가된 D-PBS배양액과 함께 0.25㎖ french straw에 흡입하여 수정란 이식기(IMV, France)에 삽입하고, sheath(IMV, France)와 cover sleeve(IMV, France)을 장착하여 수란우의 질 내로 삽입하였다. 이식기 끝이 자궁경관 입구에 도달하면 cover sleeve을 당겨서 파열시킨 후 이식기의 선단부가 질 점막에 접촉되지 않은 상태로 자궁경관에 삽입, 통과하여 황체가 존재하는 자궁각 선단부에 수정란을 주입한다.

<연구 결과>

1) 수정란이식 임신율

체외수정란 생산에 있어서 난자의 기원 도축장 난소와 생체내 난자에 따른 수정란의 임신율은 Table 와 같다. 도축난자 수정란의 임신율은 60.8%였고, OPU 수정란의 임신율은 47.8%로 낮았다. 하지만 도축난자의 경우는 7-10월 특정 시기의 결과이고 OPU 난자의 결과는 년간 및 다양 농장의 임신율 결과로서 비교 대상의 차이가 있어 특정 난자 기원의 임신율이 높다고 할 수는 없을 것으로 판단된다.

Table 16. 난자 기원에 따른 수정란의 임신율 비교(OPU vs. Slaughterhouse)

	Transfer	Pregnancy	%
OPU-IVF	176	83	47.2%
Slaughter cow	59	38	64.4%

2) 공란우에 따른 임신률

OPU 난자를 제공하는 공란우에 따른 임신율은 Table 와 같다. 임신율에 다양한 요인이 영향을 미치기는 하지만, 난자 제공하는 공란우의 체점수 등에 따른 차이가 있을 것을 판단되며, 임신율은 33.3 - 46.4%였다.

Table 17. 공란우에 따른 OPU-IVF 수정란의 임신율

	Transfer	Pregnancy	%
002307749059	28	13	46.4%
002116326014	18	6	33.3%
002094326423	28	12	42.9%
002311231870	17	6	35.3%
002101767068	9	4	44.4%
002001874183	7	3	42.9%
002307578892	30	13	43.3%
002301894614	10	4	40.0%
002073556813	16	7	43.8%
total	163	68	41.8%

3) 계절별 임신율

OPU-IVF 실시한 계절별 임신율을 조사한 결과는 Table 와 같다. 1-3월에는 45.8%, 4-6월은 38.5%, 7-8월은 54.5% 로서 계절별로 약간의 차이는 있었으나, 유의적인 수준은 아니었다.

Table 18. OPU-IVF 계절별 임신율

	Transfer	Pregnancy	%
1-3	24	11	45.8%
4-6	65	25	38.5%
7-8	55	30	54.5%
9-10	15	10	66.7%

4) 배양액 종류

배양액 종류에 따른 임신율을 조사한 결과는 Table. 와 같다. 배양액의 효과를 검토하기 위하여 도축장 유래 난자를 이용하여 서로 다른 배양액에서 생산된 수정란의 임신율을 조사하였다. 무혈청배양액인 IVMD 배양액은 56.8%였고, Au 배양액은 46.7%였다.

Table 19. 배양액의 차이가 임신율에 미치는 효과

	Transfer	Pregnancy	%
IVMD	44	25	56.8%
Au	15	7	46.7%

수정란이식을 위하여 실험실에서 목장까지 배반포의 운반에 이용되는 배지의 종류에 따른 임신율을 조사한 결과는 Table. 와 같다. 일반적으로 이용되는 5% FBS 함유 TCM199는 임신율이 50%였고, ART Transfer medium은 46.2%였다.

Table 20. 배반포의 이식을 위하여 운반에 이용되는 배양액의 종류

	Transfer	Pregnancy	%
TCM	14	7	50.0%
ART	13	6	46.2%

5) 수정란 발달 일자별 임신율

수정란의 발달 일자별 임신율을 조사한 결과는 Table 와 같다. 배양 6일, 7일 및 8일째에 각각 68.2%, 54.5% 및 56.3% 였다.

Table 21. 배반포 발생 일자별 임신율

	Transfer	Pregnancy	%
day 6	22	15	68.2%
day 7	88	48	54.5%
day 8	16	9	56.3%

바. 수정란의 동결(유리화 동결) 체계 개발

수정란의 동결 보존이란 수정란을 초저온에서 동결 상태로 보존하는 방법을 말한다. 동결 보존법에는 동결 속도에 따라 완만동결법(slowing or conventional freezing method)과 초급속동결법(vitrification method)으로 크게 구분한다. 이러한 동결 보존 방법은 가축의 수정란의 장기 보존에 유용하게 이용되는 기술이다. 하지만 동결 과정에서 급격한 온도 변화에 의한 수정란의 손상으로 수정란의 생존율과 임신율이 낮은 경향이 있어 사용이 많지는 않다.

동결수정란을 이용을 위해서는 융해 과정을 거쳐야 하며, 융해 과정은 실제 수정란이식에 적용하기 전에 거쳐야 하는 것으로서 대단히 중요한 단계이다. 동결 과정에 반드시 필요한 완충액이 융해 후에는 수정란의 생존에 유해하게 작용하므로 융해 직후에 반드시 동결 완충액을 완전히 제거하는 과정이 필수적이다.

<재료 및 방법>

1) 시약 및 기구

유리화 동결에 필요한 시약 및 동결액은 Handling Media (HM), Vitrification Solution 1 (VS1), Vitrification Solution 2 (VS2), Vitrification Device ('REPROCARRIER') (Ref: MD-RC-VOS, MODUSCIENCE COMPANY, Korea), 6 well Dish (Oosafe #OOPW-SW03) 및 동결 및 해동용 basket 등이다.

모든 시약 및 과정은 무균적으로 시행하며 사용하기 전에 모든 유리화 관련 용액을 실온에서 평형한다.

2) 유리화 동결

Center well dish(#353653) 중앙에 1ml HM을 넣어 준비하고, Vitri dish 제작 (6 well dish) 는 well 당 적정 용량은 200 ~ 300uL를 준비한다. 동결과정은 다음과 같다.

① 냉동 보관할 배아를 HM dish에 놓는다.(2-3분)

② 냉동을 진행할 배아를 Vitri dish의 VS1 well로 옮긴다.

- 3분 동안 평형을 유지
- 냉동 보관할 Vitrification Device ('REPROCARRIER')를 준비
- 동결용 basket을 준비하여 LN2를 준비

③ 배아를 Vitri dish의 VS2 well로 이동시킨 후 40-45 초 동안 유리화 진행

④ 이 후 즉시 미세 피펫을 사용하여 배아가 담긴 VS2 배양액을 5 μL 이내의 양으로 유리화 기구에 적재한다.

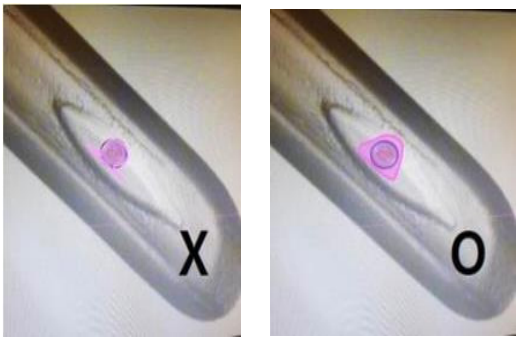


Figure 15. 잘못된 배아적재, 올바른 배아적재(예)

⑤ 배아가 적재된 유리화 장치를 LN2가 담긴 동결용 basket 침지하여 동결한다.

⑥ 배아가 적재된 유리화 장치를 보관할 액체질소 탱크로 이동 침지한다.

6) 동결배아의 해동방법

시약 및 재료 : Handling Media (HM), Sucrose Medium 1 (SM1), Sucrose Medium 2 (SM2), 6 well Dish (Oosafe #OOPW-SW03), 동결 및 해동용 basket을 무균적으로 사용하고, 사용하기 전에 모든 유리화 동결 관련 용액을 실온에서 평형시킨다.

① 다음 Solutions을 포함하는 6 well dish를 준비한다.

② 동결 straw가 살짝 녹으면 신속하게 뚜껑을 제거하고 6 well dish의 1번 well에 배아가 적재된 straw 끝부분을 신속하게 담근다. (단, Micropipet handling의 경우에는 천천히 pipetting하면서 옮겨도 무관함)

③ 배아가 straw에서 떨어져 가라앉으면 배아를 신속히 꺼내고 2번 well로 옮겨 5분 동안 유지시킨다다.

④ 3번 Well로 배아를 옮겨 5분 동안 유지시킨다.

⑤ 4번과 5번 well로 순차적으로 옮겨 5분 정도 정치한 다음 배아를 적절한 배양액 하에서 배양하거나 배아이식 배양액에서 세척한 후 이식 straw에 장착한다.

<연구 결과>

수정란의 동결에 따른 임신율 효과를 검토한 결과는 Table 와 같다. 수정란은 도축난소로부터 유해한 체외수정란을 이용하여 유리화동결을 이용하였다. 신선 수정란이 54.2%이었고, 동결 수정란은 46.9%였다. 한편 OPU 수정란은 동결수정란의 임신율이 57.1%로서 대조군인 신선 수정란에 비하여 높은 경향이었고, 특히 도축난소 유래 체외수정란에 비해서도 높은 경향이었다.

Table 22. 체외 수정란의 동결에 따른 임신율 비교

	Transfer	Pregnancy	%
신선	59	32	54.2%
동결	32	15	46.9%

Table 23. OPU 수정란의 동결이 임신율에 미치는 효과

	Transfer	Pregnancy	%
신선	61	30	49.2%
동결	14	8	57.1%

사. 사업화 체계 확립

<수정란 이식 및 등록>

수정란의 이식 및 등록을 위해서는 반듯이 수정란이식 증명서를 발급 받아야 하고, 공란우 및 정액 정보를 한국종축개량협회 한우 수정란이식증명서 발급관리 프로그램 (http://www.aiak.or.kr/hanwooet/index.jsp?)dp 에 등록함

<연구 결과>

수정란이식 발급 신청을 위해서는 수정구분(체내, 체외, 체외(OPU)), 용도 구분, 수정란종류, 정액번호, 공란우개체식별번호 및 일자를 입력하여 등록한다. 본 연구에서는 수정 방법이 체외(OPU)로 하면됨.

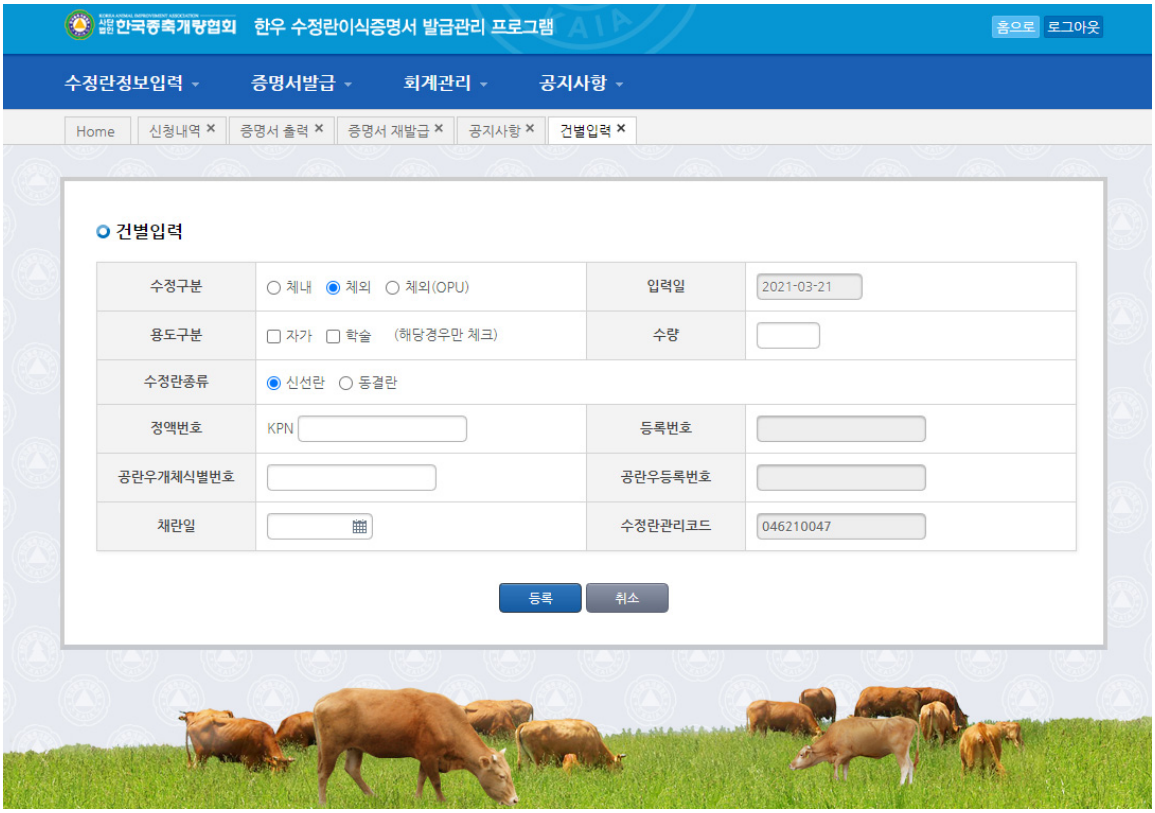


Figure 16.

상기화 같이 수정란이식증명서를 신청하면 처리결과가 아래와 같이 제시되며, 이후 증명서 출력을 통하여 증명할 수 있다.

신청내역

공란우이표번호		KPN	
증명서 신청일자	~	채란일자	2019-04-01 ~ 2020-04-30 검색하기

연번	종모우	공란우	수량	입력일	진행상황
61	KPN1080	002307749059 (고등) 227227102	1	2020-06-11	승인
60	KPN1402	002311231870 (혈통) 228075223	4	2020-05-09	승인
59	KPN1080	002307749059 (고등) 227227102	3	2020-05-09	승인
58	KPN1402	002112988734 (혈통) 228817168	2	2020-04-24	승인
57	KPN1402	002094326423 (고등) 227497169	8	2020-04-24	승인
56	KPN1402	002311231870 (혈통) 228075223	2	2020-04-24	승인
55	KPN1080	002116326014 (혈통) 228962046	1	2020-04-01	승인

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">(국문) OPU-IVF 활용 개체별 소 수정란 생산 상용화 기술개발</td></tr>
<tr><td colspan="5">(영문) Development of bovine embryo production and transfer technique using ovum pick-up and in vitro fertilization</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">농업회사법인 보비텍</td><td rowspan="2">주 관 연 구
책 임 자</td><td colspan="2">(소속) 농업회사법인 보비텍</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">(위탁) 국립한국농수산대학</td><td colspan="2">(성명) 공준호</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비

(218,750천원)</td><td>계</td><td>218,750</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2019. 5.~ 2021. 1.(1년 8월)</td></tr>
<tr><td>정부출연
연구개발비</td><td>175,000</td><td rowspan="3">총 참 여
연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>6</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>43,750</td><td>내부인원</td><td>1</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td></td><td>외부인원</td><td>5</td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 성과

■ 한우 농가 경쟁력 확보를 위한 우량 한우 대량 생산 및 이를 활용한 수익 창출에 필요한 우량 수정란 공급 체계 확립 필요

■ **생체내 난자 채취(OPU)-체외배양(IVMFC)으로 개체별 배발달 최적 환경 조성과 이를 바탕으로 소 수정란의 생산 및 대량 이식기술의 상용화를 통한 안정적인 수익 창출 기반 확보**

○ 연구내용 및 결과

■ 한우 개체별 수정란 생산 기술 개발 및 주관기관으로 기술이전 완료

■ 국내 유일의 농업회사 단위에서 OPU-IVF 기술 보유하게 되었고 이를 이용한 우량수정란 생산, 이식 및 판매를 통한 산업화 성공에 의이가 있음

■ 우량 한우를 이용한 OPU-IVF 수정란 생산 기술 개발

- 우량 공란우 확보(22두, 특히, 전북도 평가 최고엘리트 한우 3위 획득)
- 생체내 난자 채취를 위한 조건 확립(GnRH 호르몬 투여 기준 정립으로 미투여시 3.4개/두 → 6.4개, 한우 적합 채란 압력 기준 0.7-0.8 kPa/mmHg 확립)
- 무혈청 배지를 활용한 수정란 발달율 27.2% 달성(난자 회수 기준)
- 공란우 개체별 배발달율 조사(2.3% - 62.2%) 결과 공란우 개체별 차이 확인
- 회수 난자의 개수에 따른 차이는 없었음(28.6% - 36.0%)
- 종모우에 따른 배반포 발달율 차이 확인(15.8% - 58.5%)
- 체외수정란 유리화동결 체계 확립 및 이식 후 임신율 46.9% 달성하여 산업화 체계 확립 함

■ 상기 기술을 이전 받아 주관기관에서는 '19년 150두, '20년 410두에 이식하여 수정란 판매와 이식 및 우량 송아지 생산 판매로 3억원 이상의 매출 발생

○ 연구성과 활용실적 및 계획

■ 고능력 한우에서 유래한 OPU-IVF 수정란 생산체계를 확립하여 자체 농장 이식 및 외부 판매 등으로 고부가가치 창출이 가능한 산업화 기반을 구축

■ 본 연구 개발 결과는 한우 및 젖소 분야에서 우량 수정란의 생산 및 판매가 즉시 가능하므로 연구 종료 시점에 산업화를 완료 하였음

■ 유전능력 상위 5% 수준의 한우는 고가로 거래되며, 일반 농가에서 확보가 어려움 → 본 기술을 이용한다면 일반 농가에서도 저가로 우수한 한우 생산이 가능함

■ 우량 한우 생산은 농가의 소득과 직결되므로 농가 소득 증대에 크게 기여할 것으로 예상됨

자체평가의견서

1. 과제현황

				과제번호	819006-2
사업구분	농식품연구성과후속지원사업, 벤처				
연구분야				과제구분	단위
사 업 명	농식품연구성과후속지원사업, 벤처				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	OPU-IVF 활용 개체별 소 수정란 생산 상용화 기술개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	농업회사법인 보비텍			연구책임자	공준호
연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2019.5.10.-2020.1.9	75,000		75,000
	2차년도	2020.1.10.-2021.1.9	100,000		100,000
	계		175,000		175,000
참여기업	농업회사법인 보비텍				
상 대 국		상대국연구개발기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.3.24

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
농업회사법인 보비텍	대표	공준호

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	공준호

Ⅰ. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : **우수**

- 본 연구는 기술 개발이 어려운 농업회사(보비텍)의 사업화를 위하여 대학(한농대)에서 연구개발 및 인력 양성하여 취업하게 하므로, 신규 산업을 발굴하고 매출과 연계하여 사업화 성공 지원
- 한우 OPU-IVF 수정란 생산 기술은 일부 대학과 연구소만이 보유하고 있는 기술로서, 관련 자료 공개 및 기술지원은 전혀 없는 실정임
- 이에 대학에서 기술개발 및 전수하고 농업회사에서 산업화하는 산학 연계의 모범사료로 판단됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

- 본 연구 개발 결과는 한우 및 젖소 분야에서 우량 수정란의 생산 및 판매가 즉시 가능하므로 연구 종료 시점에 산업화가 완료 됨
- 우량 한우 생산은 농가의 소득과 직결되므로 농가 소득 증대에 크게 기여함
- 향후, 젖소 분야에도 활용 된다면 우유 생산량 증대와 더불어 육우 생산을 겸할 수 있어 농가 생산성에 크게 기여 할 것으로 생각됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

- 고능력 소(한우, 저지)에서 유래한 OPU-IVF 수정란 생산체계를 확립하여 자체 농장 이식 및 외부 판매 등으로 고부가가치 창출이 가능한 산업화 기반을 구축하고, 첨단 BT 산업에 원천기술로 활용 가능

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

- 관련 분야 연구 및 기술 전수를 위하여 연구원을 훈련하여 농업회사에 취업하였으며, 관련 기술의 자립화를 위하여 회사 관계자가 적극적으로 연구과정에 참여하여 연구를 무사히 종료할 수 있었음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

- 학술발표 2건
- 지적소유권(특허 출원 1건)
- 인력양성(연구원 2명, 1명 취업)

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
수정란 생산 체계 확립	20	100	농업회사 자체적으로 체내수정란 생산 및 이식 가능
공란우 선발 조건 확립	10	100	우량 공란우를 20여두 확보하여 향후 사업에 활용
생체내 난자 채취 및 회수율 향상	20	100	OPU 조건 설정 및 채란장 설립
체외수정란 생산체계 확립	40	100	다양한 조건에서 체외수정란의 생산 기술을 확보하여 산업화 성공
수정란 동결기술 및 산업화	10	100	체외수정란의 동결/융해/이식 프로그램을 성공적으로 기술 이전
합계	100점		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

▪ 본 연구를 통하여 우량한우 대량 생산기술을 확보하였고, 주관기관을 통한 산업화 기반을 확보하여 기술 자립화에 성공

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

▪ 고능

Ⅳ. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

▪ 없음

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

▪ 없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	■자유응모과제 □지정공모과제	분 야	축산
연구과제명	OPU-IVF 활용 개체별 소 수정란 생산 상용화 기술개발		
주관연구개발기관	농업회사법인 유한회사 보비텍	주관연구책임자	공준호
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구개발기관부담금	총연구개발비
	175,000	43,750		218,750
연구개발기간	2019.05.10 - 2021.01.09 (21개월)		
주요활용유형	■산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)		

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
▪ 수정란 생산 체계 확립	▪ 한우수정란 생산을 위한 기술 확립, 채란장 및 관련 시설 확보
▪ 공란우 선발 조건 확립	▪ 한우공란우 유전능력 및 질병 검사 등을 통한 선정기준 및 선정(22두)
▪ 생체내 난자 채취 및 회수율 향상	▪ 국내 농업회사로는 최초 생체내 난자 회수 기반 및 기술 확보 - 난자 채취 간격, 펌프 압력, 호르몬 투여법 등 확립
▪ 체외수정란 생산체계 확립	▪ 무혈청 배양액을 이용한 수정란 생산 체계 확립 - IVMD 및 SOF 배양액 이용체계확립
▪ 수정란 동결기술 및 산업화	▪ 유리화동결법을 이용한 수정란 동결 및 이식체계 확립 ▪ 연구기간동안 560개 한우 수정란 생산 및 이식하여 180,000천원의 매출액 달성 - 관련 한우송아지 생산 및 등록

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표												연구기반지표									
	지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
													논문									
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART평균등급	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건		건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	25							30		15						15		15			
최종목표	1							130		1						3		2			
당해년도 목표	1							100		1						2		1			
당해년도 실적	1							160		1						2		1			
달성률(%)	100							100		100						100		100			

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	한우 공란우에서 OPU-IVF 수정란 생산 기술
②	수정란의 유리화 동결법
③	한우 수정란 이식 임신율 향상 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계최초	국내최초	외국기술복제	외국기술소화·흡수	외국기술개선·개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장애로해결	정책자료	기타
①의 기술					v		v			
②의 기술					v		v			
③의 기술					v	v	v			
、 、										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	주관기관에서 한우 수정란을 이용한 산업화 지역 한우협회 중심으로 주문 위탁 생산으로 한우 개량 촉진
②의 기술	우량 한우 유전자원 보존 활용
③의 기술	우량 한우 수정란 이식으로 한우 개량 기반 확보 우량 한우 생산 및 비육 판매를 통한 소득 증대 기여

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표												연구기반지표									
	지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
													논문								
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	평균등급	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치		25						30		15						15		15			
최종목표		1						1000		2				2		3		2			
연구기간내 달성실적	1							200		1						2		2			
연구종료후 성과창출 계획		1						800		1				2		1					

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명[1]	한우 수정란 생산 기술		
이전형태	■무상 □유상	기술료 예정액	천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타(자체 기술 활용)		
이전소요기간		실용화예상시기[3]	상용화 완료
기술이전시 선행조건[4]	없음		

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.