

보안과제(), 일반과제(O)

과제번호 108068-03-1-CG000

체내유래 난자를 이용한 수정란생산으로 한우 고급육
대량생산 체계구축

(System Establishment for Mass Production of High Quality
Hanwoo by Embryo Transfer Derived from In Vivo Ovum)

경 상 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “체내유래 난자를 이용한 수정란생산으로 한우 고급육 대량생산 체계구축에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 12월 일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 이 정 규

세부연구책임자 : 이 정 규

연 구 원 : 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 립

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 양 한 술

협동연구기관명 : 김해축협

협동연구책임자 : 문 유 상

요 약 문

I. 제 목

체내유래 난자를 이용한 수정란생산으로 한우 고급육 대량생산 체계구축에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 1) 우수한 형질의 공란우 선발 기준 확립
- 2) 공란우의 근친도 및 씨소의 육질등급을 고려해 정액 선발
- 3) 과배란 처리법과 비교하여 OPU 기법의 효율성 입증
- 4) 체내유래 수정란의 효과적인 생산
- 5) 수정란 생산 시 난자의 회수율 및 등급 향상
- 6) 수정란 동결기술의 개발로 이식 효율 향상
- 7) 태어난 산자의 유전자 검사
- 8) 공급된 수정란의 혈통보증서 발급
- 9) 분만된 송아지의 혈통 검증
- 10) 대리모의 발정동기화 및 자연발정우를 이용함으로써 수정란 이식효율 향상
- 11) 한우 및 젃소 대리모의 수태율, 분만을 향상에 적합한 사양관리 및 사육환경 선정
- 12) 공란우 및 종빈우의 후보축을 확보하고 우수한 산자생산을 위해 후보 밀소 활용
- 13) 신생축 암수의 생식능력 유전력 평가
- 14) 2차 공란우 및 종무우의 선발평가로 활용 가치의 평가
- 15) 고품질 한우 지역 생산기지 구축 및 경제성 향상
- 16) 생산된 암소는 후보축으로 선발 및 수소는 종보우 후보축으로 선발, 활용

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 지속적인 공란우 선발 이용
- 2) 생산된 1세대 암소로부터 공란우 조기선발 가능성 조사
- 3) 호르몬투여와 비호르몬투여가 난자생산 효율 비교분석
- 4) 체내유래 수정란 대량생산 체계 개발
- 5) 체내유래 수정란의 품질향상 연구
- 6) 체내유래 수정란의 동결방법 연구
- 7) OPU 방법을 통해 채취된 난자의 등급 향상 연구
- 8) 체내유래 수정란 대량생산 체계 정립 및 체계화
- 9) 체내유래 수정란 품질향상과 분자적 분석방법 개발
- 10) 체내유래 수정란의 산업화를 위한 동결방법 연구 및 액체질소로부터 오염방지를 위한

방안 기술 개발

- 11) 경제형질의 유전력 기준으로 공란우 선발기준 확립
- 12) 개체별 수정란인식 및 증명서 발급기준 확립
- 13) 1차세부과제에서 1차 선발된 공란우중에서 경제형질의 유전력 기준으로 최종 공란우 선정
- 14) Data Base구축으로 조기선발체계 구축
- 15) 개체별 인식기준 설정
- 16) 각 수정란별 증명서 발급
- 17) 생산된 암송아지에서 조기 공란우 후보축 선발
- 18) 초음파 및 직장 촉진법 등을 이용한 난소와 자궁 상태별 이식시기 규명
- 19) 발정동기화 및 자연발정우 등을 이용한 수정란이식 후 수태율 비교분석
- 20) 체내유래 수정란의 이식시기별 수태율 조사
- 21) 체내유래 수정란이식에 적합한 사육환경 개발과 수란우 상태별 수태율 조사
- 22) 유산예방 등 임신유지 위한 사육환경 연구
- 23) 농가별 수정란이식 수태율을 조사하여 차이점 비교
- 24) 1세대 산자의 능력검증

IV. 연구개발결과

- 1) 고등등록우 기록과 질병 및 번식기계 능력 검사와 예방접종 등에 의한 공란우 선정
- 2) 경제형질의 유전력을 기준으로 선정
- 3) 선발된 공란우를 기준으로 개량방향에 맞춰 종모우 선정
- 4) 호르몬 투여와 비투여방법의 효율성 연구
- 5) 체내유래 난자 채취기술 개발 및 채취환경 조성
- 6) 체내유래 난자의 체외성숙, 수정, 배양기술 개발
- 7) 체내유래 수정란의 생산과 체내 및 체외유래 수정란의 생산효율 연구
- 8) 비타민 E와 사료첨가제 투여에 따른 난포의 발육과 난자의 회수율 비교
- 9) 비타민 E 투여에 따라 회수된 난자의 등급 비교
- 10) 비타민 E 투여에 따른 수정란의 생산율과 등급 비교
- 11) 액체질소로부터 오염방지를 위한 보존방법 개발
- 12) 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대로 선발기준 확립
- 13) 사용된 종모축과 공란우의 대립유전자형 분석하여 증명서에 삽입, 발급
- 14) 공란우 후보개체 중 번식능력 등을 고려하여 공란우 선정
- 15) 염기서열 분석장치 활용해 대립유전자형 분석 분석된 대립유전자형의 디지털 데이터 D/B화
- 16) 발정동기화에 의한 시기별 발정 상태 검사 후 이식
- 17) 자연발정우 보다는 발정동기화에 의한 대리모의 활용도가 높음
- 18) 발정 후 7일째 이식함으로 수태율 조사는 이루어지지 않음
- 19) 사육농가별 사육체계의 차이와 대리모의 상태 차이를 확인
- 20) 감염성 유산에 대한 질병관리 방법을 조사
- 21) 사료보조제를 통한 수태율 향상과 임신유지에 관하여 조사

22) 1차년도에 생산된 산자 능력 검증, 2012년 2월 이후 예정

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 1) 고능력 암소 선정 및 개량형질 선정
- 2) 육종개량 소요시간 단축
- 3) 한우 개량의 가속화
- 4) 경제형질별 계통구축과 고등 유전형질 개발
- 5) 고품질 한우 대량 공급체계 구축
- 6) 고효율/저비용으로 한우사육농가에 수정란 보급
- 7) 고품질 한우의 대량생산체계 구축
- 8) 수정란의 동결로 고능력 한우의 유전자원 보존 및 확대
- 9) 수정란의 인식체계를 확립하여 생산되는 모든 송아지의 등록의 수월성 재고
- 10) 새로운 개체인식체계의 구축으로 전 밀소의 인식체계 확립
- 11) 생산된 송아지의 등록과 분쟁의 소지를 원천적으로 차단함
- 12) 고품질 송아지의 안정적 생산기반 구축
- 13) 수태율, 분만율 향상으로 체내유래 수정란 생산효과 극대화
- 14) 고품질 한우 송아지 생산기지 구축
- 15) 브랜드화에 근간이 되는 고급육의 안정적 공급가능
- 16) FTA 대비 고부가가치의 축산경영으로 축산농가의 경쟁력 확보 가능

SUMMARY

I. Subject

System Establishment for Mass Production of High Quality Hanwoo by Embryo Transfer Derived from In Vivo Ovum

II. The purpose and need for research and development

- 1) Establishment of selection criteria of elite donor
- 2) Semen selection by inbreeding of donor female and meat quality rating of bull
- 3) Proof of efficiency of OPU method compared with MOET embryo production
- 4) Effective production of OPU derived embryo
- 5) Improvement of oocyte collection rate and grade for embryo production
- 6) Improvement of embryo transfer efficiency by development of cryopreservation
- 7) Genetic testing of newborn progeny
- 8) Issuance of the warranty documents for supplied embryos
- 9) Progeny test of newborn calf
- 10) Improvement of embryo transfer efficiency by using of synchronized and natural estrus cow
- 11) Selection of specifications management and management environment for recipient's pregnancy and parturition rate
- 12) Use the OPU derived offspring to produce elite offspring
- 13) Evaluation of fertility and heritability of new offspring
- 14) Evaluation of leverage value by selection evaluation of donor and bull
- 15) Building on production base of elite hanwoo and economic improvement
- 16) Selection and use the female as donor and male as bull candidate

III. Content and range of research and development

- 1) Continuous donor selection use
- 2) Investigate the possibility of donor's early selection from 1st generation female
- 3) Comparison of oocyte production efficiency between hormone treatment and non-hormone one
- 4) Development of mass production system of OPU derived embryo
- 5) Research on quality improvement of OPU derived embryo
- 6) Research on cryopreservation method of OPU derived embryo
- 7) Research on grade improvement of oocyte collected by OPU system

- 8) Establishment of mass production system of OPU derived embryo
- 9) Quality improvement of OPU derived embryo and development of molecular analysis method
- 10) Research on cryopreservation for industry of OPU derived embryo and technology development for contamination protection from LN2
- 11) Establishment of selection criteria of donor cow based on heritability of economically important traits
- 12) Individual embryo transfer and establishment of criteria for issuing certificates
- 13) Selection of the final donor cows based on heritabilities of economically important traits among primarily selected donor cows from the 1st sub-project
- 14) Establishment of early selection system through construction of database
- 15) Setting of criteria for individual-specific recognition
- 16) Issuing certificates for each embryo
- 17) Selection of early donor cow from produced heifer
- 18) Identification of embryo transfer time depend on ovary and uterus status by ultrasonograph and rectal palpation methods
- 20) Comparison of pregnancy rate of synchronized with natural estrus recipient
- 21) Analysis of pregnant rate depend on OPU derived embryo transfer stage
- 22) Development of management condition of OPU derived embryo transfer and analysis of pregnant rate by recipient condition
- 23) Research on specifications environment for heritage prevention and maintenance of pregnancy
- 24) Evaluation of pregnant difference among individual farm
- 25) Verification of ability of 1st generation offspring

IV. Research and development results

- 1) Donor selection by record, disease, reproductive ability and vaccination
- 2) Selection by criteria of economic traits's heritability
- 3) Bull semen selection depend on criteria of selected donor cow
- 4) Research on efficiency of hormone treatment and non-hormone treatment
- 5) Development of OPU derived oocyte collection technology and composition of collection environment
- 6) Development of OPU derived IVM, IVF and IVC system
- 7) Research on production efficiency of OPU derived in vivo and in vitro embryo
- 8) Comparison of follicle development and oocyte collection rate by given vitamin E and feed additives
- 9) Grade comparison of collected oocytes by given vitamin E
- 10) Production efficiency of embryo and grade comparison by given vitamin E
- 11) Development of cryopreservation method for contamination protection from LN2
- 12) Establishemnt of selection criteria based on body stature, breeding value, ultrasound

measurement, and data from progeny test

- 13) Allele type analysis of used bulls and cows, and inclusion of the results into a certificate. Then, issuing the certificates
- 14) Selection of donor cows with consideration of reproductive performance among candidate cow
- 15) Construct digital database to store results of allele type analysis using DNA sequence analyzer
- 16) Embryo transfer after evaluation of estrus stage by synchronization
- 17) Recipient utilization was more higher in synchronized one than natural estrus one
- 18) Confirmation of individual farm's difference between management and recipient condition
- 19) Analysis of disease control for infectious abortion
- 20) Analysis of pregnant improvement and maintainment by feed supplements
- 21) Investigation for diarrhea prevention of calf
- 22) Verification of 1st generation offspring's ability that will be started from 2012. February, 17 months old

V. Research achievement and its application plan

- 1) Selection of elite cow and improved traits
 - 2) Shortage of needed period for breeding improvement
 - 3) Acceleration of Hanwoo improvement
 - 4) Building systems of economic traits and development of higher genetics traits
 - 5) Building of mass supply of elite hanwoo embryo
 - 6) Embryo supply to hanwoo farmers by high efficiency and low cost
 - 7) Building of mass production of high elite hanwoo
 - 8) Conservation and propagation of elite hanwoo genetic resource by embryo cry-opreservation
 - 9) Increasing the excellence of registering all produced calves by establishing recognition of the embryo production system
 - 10) Establishment of system for recognition of all cows by construction of new system for individual recognition
 - 11) Registration of produced calves and blocking a source of disputes
 - 12) Building of stable production base of elite cow's offspring
 - 13) Maximize the OPU derived embryo production by improvement of pregnancy and parturition
 - 14) Possibility of stable supply of higher quality meat for underlying of brand
 - 15) Possibility of competitiveness of high value hanwoo management to protect FTA
- Selection of elite cow and economic traits
- Donor was selected by verification posterity that have a experience of A1++ calf

production and by comparison of complaints for OPU session, total number of collected oocytes, number of grade I, II oocytes for using embryo production, efficiency of in vitro embryo production.

- Semen was selected by donor inbreeding and bull's meat grading and so 3 kinds of bull semen were selected from 6 bull semen by carcass weight and marbling score.
- Production system establishment for OPU derived hanwoo embryo
 - OPU method was proofed the superior than that of superovulation method and slaughter house derived embryo production method, and non-hormone treatment was more higher productive efficiency compared with hormone treatment group.
 - OPU derived embryo was produced by IVMFC system and so collected 2 times session per week for effective embryo production. Feed additives was given in feeding and gene expression of embryo was analysis to improve the effective embryo production, and also applied a new dish.
 - Feed additives and vitamin E were given to donor cow to improve an oocyte collection rate, increase the embryo production and embryo grade.
 - New vitrification method was developed by straw tube for embryo cryopreservation, viability, protection of microorganism and virus from LN2.
- We used a multiplex PCR primer set composed of 11 microsatellite (MS) markers and two sexing markers for gender detection. Genomic DNA extracted from hair roots of Hanwoo were genotyped. Based on the 11MS markers, no animals had identical genotypes(BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA23, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, and TGLA53). We established a multiplex PCR set composed of 11 MS marker as well as the 2 primers which could be used for sex discrimination. The expected probability of identity among genotypes of random individuals (PI) and the probability of identity among genotypes from random half-sibs (PIhalf-sibs) were estimated as 1.78×10^{-19} and 1.04×10^{-12} . We believe that the 11 MS marker set in conjunction with management record/information for the Hanwoo production kept in a farm should be useful in the Hanwoo traceability.
- Improvement of pregnancy rate after OPU derived embryo transfer
 - Recipient was checked up the ovulation at and day, corpus luteum at 6th day of estrus and then selected to improve the pregnancy rate. Synchronization of recipient was used GnRH +PGF2a + GnRH method and then embryo transfer at 7th days after estrus
 - Vaccination, upgrade of hygiene level and rapid treatment when disease outbreak were confirmed helpful to prevention of abortion
 - Prevention of offspring's disease by colostrum feeding and heating on the parturition room
 - Even pregnancy rate of individual farm could be affected on feed supplements, it will be delayed to coming February, because of FMD disease
 - Even 1st generation offspring's ability of body condition, heritability and

ultrasonographic evaluation was analysis, all of them could not be analysis until 17th months. And so all of them will be analysis coming Feb. 2012

In conclusion, this OPU derived embryo production system was very well established in this work and so produced over 50 transferable blastocyst per a donor for 4 months that will be applied in mass production of elite cow and propagated in private farm as well as local government and/or local hanwoo brand's community, and also in industry for new breeding technology to get the competitiveness from Korea–USA FTA and Korea–EU FTA.

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 한우산업에서 개량의 중요성을 강조하는 것은 무엇보다 중요할 것이다. 국내의 한우는 10년전에 비해 엄청난 개량성과를 이루었다. 가축개량을 위한 방법으로 현재까지 널리 보급되어 있는 인공수정 방법이 일반적인 기술이었으나, 이 방법은 우수한 씨수소의 능력은 충분히 활용할 수 있지만 우수한 씨암소의 유전적 가치는 효율적으로 활용하지 못하는 단점이 있다. 국내에서는 우수한 씨암소의 유전적 가치도 효율적으로 활용하기 위해서 1980년대 과배란 유기에 의한 수정란이식 연구가 이루어지기 시작하여 현재까지 활발하게 이루어지고 있다. 하지만 과배란처리에 의한 체내수정란의 생산은 연간 4회 채란을 기준으로 약 20여개 정도의 이식 가능한 수정란을 생산할 수 있어 효율적인 측면에서 한계점을 가지고 있다. 또한 과배란처리를 위한 호르몬의 가격, 채란과정의 어려움, 개체차이 등의 원인으로 생산비의 상승으로 산업화에 한계점이 있다. 이에 비해 OPU system을 도입하여 육량과 육질이 우수한 고능력 공란우로부터 4개월 동안 64개, 산술적으로 연간 200여개 이상의 이식 가능한 수정란을 생산, 이식함으로써 씨수소와 씨암소의 유전능력을 공히 활용함으로써 개량효율의 극대화를 이룰 수 있을 것이다. 또한, 호르몬 처리를 하지 않는 방법으로 수정란 생산비가 과배란처리와 비교하여 급격히 줄어들어 수정란의 생산 단가를 낮출 수 있으므로 산업화에 적합하다고 할 수 있다. 본 연구에서는 위와 같이 경제적이며 산업화에 적합한 OPU system을 도입하여 수정란을 생산하고 이식함으로써 우수한 형질의 송아지를 생산하는 방법을 개발하여 목장 내 전 우군을 최단시간 내에 고능력 군으로 전환할 수 있어 최고의 수익과 경영효율화를 이룰 수 있고, 또한 각 농장에서 우수한 고능력 후보축 만을 생산하고 나머지는 도태함으로써 경제적 이익을 극대화 할 수 있을 것이다.
- 소에서 수정란이식은 유전적인 능력개량의 수단으로 폭 넓게 활용되었다. 최근에는 능력이 우수한 공란우를 OPU 방법으로 수정란을 회수하여 능력이 낮은 집단에 이식, 우수한 능력을 보유하고 있는 송아지를 일시에 다량 생산하여 집단의 능력을 조기에 개량하는 OPU(Ovum Pick-Up)방법이 기존의 다배란 수정란이식(MOET: Multiple Ovulation and Embryo Transfer)방법 보다 높은 효율을 나타냄으로써 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 수정란의 생산효율에서는 높은 효율을 나타내고 있으나 생산된 수정란의 동결 보존, 용해 기술은 미흡한 실정이다.
- 현재까지의 동결 방법은 연구실 수준을 벗어나지 못하고 있으며, 용해 후 이식까지의 과정에서 생존율이 떨어지는 경향이 있다. 이를 극복하기 위해서는 지금까지와는 다른 새로운 방법이 필요하다. 이는 고품질의 수정란이 생산 되더라도 이식까지의 시간적, 그리고 수태율에 좋지 않은 영향을 끼치게 된다. 또한 이식된 수정란의 수태율 까지에도 영향을 끼치므로 새로운 동결 방법을 통하여 양질의 수정란을 대량으로 농가에 보급하는데 걸림돌이 된

다. 그러므로 동결기술의 방법 개량이 필요 할 것이다.

2. 경제·산업적 측면

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 현재 국내의 체외 수정란이식은 2007년부터 도축장유래 난자를 이용한 체외수정란 이식을 금지하고 있으나 소량으로 이루어지고 있다.
- 고등등록된 고능력 한우 공란우를 FSH 호르몬을 이용하여 과배란 처리 후 생산된 체내 수정란을 이식하여 고급육 한우를 생산하고자 하는 수정란이식은 몇몇 연구실과 기관에서 이루어지고 있다.
- 그러나 과배란처리 후 생산된 체내수정란의 회수와 이를 대리모에 이식하는 체계는 고등 등록 공란우 1두로부터 1회 약 5개 전후의 생산량과 연간 4회 정도의 과배란 처리가 가능하기에 연간 총 20개 전후의 이식 가능한 수정란을 생산함으로써 산업화를 하기 위해서 한계점을 가지고 있다.
- 체계적이고 효과적인 고능력 한우 수정란을 생산하고 공급하여 진정한 고능력 한우 개량을 위한 방법으로 정립되고 산업화를 위해서는 OPU유래 난자를 이용한 수정란을 생산 후 이식하는 체계 구축이 필요한 실정이다.
- 수정란을 이식받을 공란우의 선발 또한 수정란 이식 시 수태율 향상에 크게 도움이 되는 건 많이 알려져 있는 사실이다. 또한 선발 과정을 거친 공란우라 할지라도 이식 단계에서 복잡한 문제들로 인하여 이식을 하지 못하는 경우가 많이 발생한다. 이러한 문제들로 인하여 현재까지 높은 비용과 많은 노력을 통하여 생산한 수정란을 활용하지 못하는 경우가 많이 발생하게 된다. 따라서 OPU 유래 수정란의 동결기술 개발함으로써 양질의 수정란을 손쉽게 보관하여 차후 활용한다면 수정란의 활용이 극대화 될 것으로 판단된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내기술개발현황

- 가. 초음파유도 난포란 채취를 우이한 기본 기술개발; 소의 마취방법과 채란기구의 개발 (1997년)
- 나. 초기 임신우의 공란우 활용이 초음파 유도 난자 채취 및 수정란 생산에 미치는 영향에 관한 연구 (2011년)
- 다. 공란우 개체와 채란기간이 Ovum Pick-Up 유래 수정란 생산 효율에 미치는 영향에 관한 연구 (2010년)
- 라. OPU(Ovum Pick-Up) 채란기간이 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향에 관한 연구 (2010년)
- 마. 초음파 유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 2. 임신우 유래 난포란으로 부터 산자 생산에 관한 연구 (1998년)
- 바. 한우에서 초음파 유래와 도축장 유래 난포란을 이용한 체외 수정란 생산에 관한 연구 (1998년)
- 사. 젖소에서 초음파기기를 이용한 난자 채취에 있어서 손가락 촉지를 이용한 난포란의 채란 방법에 관한 연구 (2000년)
- 아. 유전자 분석을 통하여 선발된 한우로부터 초음파 유래 체외수정란 이식에 의한 고품질 한우 생산기술의 실용화 II. DNA 검정우로부터 초음파 유래 체외수정란의 생산에 관한 연구 (2001년)
- 자. 한우에 있어서 초음파기기를 이용한 생체내 개체별 난자 채취 빈도 및 수정란 생산효율에 관한 연구 (2000년)
- 차. 젖소 생체로부터 초음파기기와 간이 난자채취기를 이용한 미성숙 난포란의 채란에 관한 연구 (2001년)
- 카. 핵이식 기법을 이용한 한우 쌍태생산에 관한 연구 : II.Ovum pick-up(OPU) 유래 공여핵 및 활성화 유도 수핵난자의 핵이식 (1998년)
- 타. 핵이식 기법을 이용한 한우 쌍태생산에 관한 연구 : I.Ovum pick-up(OPU),전기적 세포융합 및 체외배양 기법을 이용한 복제수정란 생산 (1998년)
- 파. 임상학 : 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 : 1. 발정주기 , 계절 및 bST 처치 영향에 관하여 조사 (1997년)
- 하. 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 (1997년)

거. 우리나라의 경우 한우의 유전적 다형성 및 개체 동정을 위해 임 등(2005)은 Applied Biosystem사의 Stockmarkers™,과 Roslin 연구소(<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>)에서 제안한 소의 다형성 분석용 MS marker들을 기초로 20개의 MS marker를 선정해 DNA marker를 기반으로 하는 국내 한우 이력추적체에 적용 가능한 MS marker를 선별하여 이를 기초로 한우 및 쇠고기 이력추적체를 농림수산식품부 고시 제2009-157호로 제정하여 시행하고 있다.

2절. 국외기술개발현황

- 가. 비수술적 OPU기술을 이용하여 최초 송아지 생산 성공 (1981년).
- 나. 대리모 연령에 따른 난포의 상태 및 체외수정란 생산에 미치는 영향에 대한 보고 (1997년)
- 다. 소 난자로부터 난포와 체외 수정란 생산을 위한 Gonadotrophin을 이용한 식이요법 (1994년)
- 라. 일회용 주사바늘을 이용한 초음파유도 체내 소 난포란 채취 방법 개발 (1995년)
- 마. 소의 난구세포-난자 복합체의 형태학적/발달능력에 대한 주사바늘 끝의 비스듬한 각도와 흡입과정의 영향에 관한 연구 (1997년)
- 바. 이탈리아 mediterranean buffalo cow에서 반복적인 OPU에 관한 연구 (1996년)
- 사. FSH 처리/ FSH 비처리에 따른 말의 반복적인 transvaginal oocyte aspiration에 관한 연구
- 아. GnRH 처리 유/무에 따른 난자의 회복에 관한 연구 (1998년)
- 자. 반복적인 체내유래난자의 채란이 소 난자의회복과 난포발달에 미치는 영향에 관한 연구 (1998년)
- 차. 임신한 어린 암소에서 과배란처리가 반복적인 체내유래 난자 회수와 체외수정란 생산에 미치는 영향에 관한 연구 (1997년)
- 카. 소 난포 발육과 난자 회복에 있어 반복적인 gonadotropin stimulation과 난포채취의 상관관계에 관한 연구 (1993년)
- 타. 최초 마우스의 수정란 동결 보존 성공 (whittingham et al., 1972).
- 파. 이 후 Human (Quinn et al., 1986), Bovine (Schel-lander et al., 1994) 수정란 동결 보존 성공.
- 하. 최초로 소에서 미성숙 난자 동결 시도 (Hotamisligil et al., 1991).
- 거. 다양한 종에서 미성숙 난자 동결: Hamster (Todorow et al., 1989), Human (Trounson, 1986) mouse(Sathanathan et al., 1988), mare (Hochi et al., 1995), monkey (DeMayo et al., 1985), pig (Rubinsky et al., (Rubinsky et al., 1992) rabbit (Vincent et al., 1989) rat (kasai et al., 1979).
- 너. 유리화 동결 (Vitrification) 기술 개발 (Rall and Fahy, 1985).
- 더. elcetro microscopic grid (EMG)법 기술 개발 (Martino et al., 1996).

- 러. Open pulled straw (OPS)법 기술 개발 (Vajta et al., 1997).
- 며. nylon loop system (NLS)법 기술 개발(Lane et al., 1999).
- 버. DNA를 이용한 기술 중 대표적인 방법은 microsatellite (MS) marker를 이용한 방법으로 MS marker는 실험상의 용이성이 좋고, 다형성이 높아 가축 집단의 유전적 다양성 분석 등에 사용되고 있으며 (Barker 등, 1997; Blott 등, 1999; Bjornstad 등, 2003),
- 며. DNA marker의 효율적인 분석에 적합한 Multiplex PCR은 여러 가지 primer를 혼합해 동일한 조건에서 DNA 단편을 증폭시키는 방법으로 1998년에 처음으로 시작되었다 (Chamberlain 등, 1998).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 1차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
고등등록우 기록과 질병 및 번식기계 능력 검사와 예방접종 등에 의한 1차 공란우 10두 선정	고등등록우로서 후대검증에 의한 A1++ 성적을 얻은 공란우를 우선적으로 선정하여 체형심사, 초음파검사, Body Score, 번식기 질병 감염 여부 및 예방접종 등에 문제가 없는 개체 10두를 최종적으로 공란우로 선정	김해축협 소속의 농가에서 사육중인 고등등록우 중에서 후대검정을 통해 자손의 비육 출하 성적이 A1++ 등급을 획득한 경험이 있는 암소를 최우선적으로 선발하였다. 또한 직장검사에 의한 난소, 자궁 등의 번식기계의 상태와 비만도를 체크할 수 있는 body score, 질병감염 등의 기록을 검토하여 최종선발 이용하였다. 이때 암소의 임신여부 등을 판단하여 10두를 선발하여 우선적으로 활용할 소를 선정 이용하는 체계로 하고 있음
개체선발을 위한 경제형질의 유전력을 기준으로 최종 공란우 10두 선정하여 당장 활용 가능한 5두를 우선적으로 선정 이용	세부연구책임기관인 김해축협의 문유상조합장의 목장에서 고등등록우 중에서 후대검정에 의한 우수한 암소를 10두 선정하고 이들의 임신여부 등을 체크하여 OPU 체란을 위한 도나로 최종 선정 활용함	원활한 연구수행을 위해서는 총 10두의 공란우를 선정하고 항시 활용 가능한 5두를 경상대학교 부속목장 (채란실 및 사육실 확보)에서 관리하면서 본 연구에 활용하고 있음. 개체 차이에 의한 회수난자의 수, 난자의 질 및 이식 가능한 수정란의 생산능력 등을 고려하면서 필요시에 교체하여 활용함. 우수한 암소일지라도 회수되는 난자의 질, 숫자 및 체외수정란의 발달능력 등에 따라 본 연구에 활용될 수 있는가를 최종적으로 판단되어야 함. 즉 개체 차이에 의한 난자의 회수 수, 질, 수정란의 생산능력 등이 현저하게 나타나고 있음으로써 이러한 요인들을 고려한 공란우의 선발은 매우 중요한 기준으로 판단됨
선발된 공란우를 기준으로 개량방향에 맞춰 종모우 선정	경제형질 개선을 위해 우수한 종모우의 정액을 이용하여 체내유래 난자의 체외수정란 생산 및 배양조건 정립을 위해 7종류의 한우 동결정액을 선택하여 체외수정란 생산효율을 검정하여 최종적으로 우수한 3종류의 정액을 선발하여 이용함	OPU 체내유래 난자의 체외수정란을 효율적으로 생산하기 위하여 우선적으로 도축장유래 난자를 이용한 각 정액별(KPN 493, 494, 507, 538, 641, 642) 체외수정란의 생산효율을 비교하였음. 이렇게 선발된 3종류(KPN642, 641, 507)의 정액을 최종적으로 OPU 체내유래 난자의 체외수정란 생산에 활용함. 즉 체외수정, 체외배양 등에 의한 이식 가능한 배반포기 배까지의 발달율을 조사하고 최종적으로 OPU유래 체외수정란을 생산하기 위해서는 도나 암소와

<p>호르몬 투여법과 비 호르몬투여방법의 효율성 비교연구</p>	<p>OPU 유래 체내난자는 생체우를 이용하기 때문에 대량으로 난자를 채취하는데 한계를 가지고 있다. 따라서 이러한 한계점을 극복하기 위해서는 호르몬치리에 의한 많은 난자의 성숙을 유기하는 방법과 호르몬치리를 전혀 하지 않고 1주에 2회씩 난자를 채취하는 방법을 활용할 수 있다. 이러한 방법들을 비교분석함으로써 가장 효율적인 난자채취뿐만 아니라 수정란의 생산을 할 수 있는 방법을 정리하고자 함</p>	<p>의 근친도를 확인하여 선정 이용하였음 호르몬치리에 의한 난자의 회수와 비호르몬치리에 의한 난자의 채취효율을 비교분석한 결과 호르몬 처리에 의한 난자의 발육은 많이 시킬 수 있었지만 채취과정에서 실제 채취되는 난자의 숫자와 최종적으로 수정란의 생산효율적인 측면에서는 비효율적이었음. 그리하여 본 연구에서는 호르몬 처리방법을 포기하고 비호르몬 처리에 의한 주 2회 난자를 채취하는 방법을 활용하고 있음. 비호르몬치리에 의한 난자의 채취는 회당 약 4.8개 정도의 난자를 회수하고 그중 1,2등급의 난자는 약 2.2개 정도이며 이들을 체외성숙, 수정 및 배발달을 유도하면 약 0.8개의 배반포기 배를 생산할 수 있으며, 우수한 개체의 것은 1회 채취 당 평균 약 1.5개의 이식 가능한 수정란을 생산할 수 있음. 이러한 성적은 연간 약 100-120개의 배반포기 배를 생산할 수 있을 것으로 판단됨</p>
<p>체내유래 난자 채취기술 개발 및 채취환경 조성</p>	<p>OPU유래 체내난자 채취를 위해서는 초음파를 이용한 난자를 채취함으로써 관련된 기자재의 활용이 매우 중요하다. 또한 안전하고 효율적인 채취를 위해서는 OPU채란을 위한 채취실 및 사육장 등의 주위환경이 매우 효율적으로 갖추어져 있어야 함. 실제 참여하는 연구원들의 안전성도 최우선 시 고려되어야 할 것임</p>	<p>초음파를 이용한 OPU유래 체내난자의 채취과정은 기존의 연구에서 이미 정립되어있는 방법을 준용하였음. 그러나 실제 채취하는 연구원들의 숙련도는 매우 중요하고 채취과정에 발생할 수 있는 난관을 극복하기 위한 노하우가 필요함. 이러한 어려움을 해결하기 위하여 2008년 10월에 Dr. Giorgio A. Presicce를 초청하여 기술적인 난관을 극복하였음. 또한 외국의 관련시설(Univ. Connecticut, Colorado State Univ.)을 참고하여 매우 효율적인 시스템을 갖추어 본 연구를 수행하는데 큰 어려움 없이 수행하고 있음</p>
<p>체내유래 난자의 체외성숙, 수정, 배양 기술 개발</p>	<p>OPU유래 체내난자는 개체별로 채취할 수 있는 난자의 수가 극히 제한적이기 때문에 기존의 배양방법을 그대로 준용하는 데는 한계점이 있음. 이러한 난제를 해결하기 위하여 group 배양체계를 개발하였음. 또한 배양액의 비교분석을 실시하여 가장 효율적인 방법을 채택하고자</p>	<p>OPU유래 체내난자는 1회에 개체별 약 5개정도의 난자를 채취하고 1,2등급의 난자는 그중 약 2.2개 정도로서 매우 적은 수의 난자를 체외 배양하여 수정란을 생산해야하는 어려움이 있다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 group 배양방법을 개발하여 효율적인 배반포를 생산체계를 구축하였음. 이를 위하여 Agar embedding을 하여 도축장 난자와 OPU유래 체내난자와의 구별을 하는 방법을 도입하여 수정란을 생산하였음</p>

	하였음	
체내유래 수정란의 생산과 체내 및 체외유래 수정란의 생산 효율 연구	OPU유래 체내난자와 도축장 유래 체외수정란의 질적 평가를 위하여 관련된 유전자의 발현비율을 비교분석하고자 함	OPU유래 체내난자와 도축장 유래 난자의 질적 평가를 4종류 (Midkin, Gremlin 1, PTX-3, COX-2)의 유전자의 발현량을 real-time PCR 기법으로 분석하고자 함. OPU유래 체내난자의 경우 1,2등급의 난자 중에서 배반포기 배까지 발달율은 평균 34.6%이고, 우수한 개체의 것은 60.0%로서 도축장 유래 난자의 체외발달율과는 큰 차이를 보이고 있음. 이러한 차이의 원인을 분석하기 위해서 관련된 유전자의 Up-or down-stream 발현량을 비교 분석하고자 함
경제형질의 유전력 기준으로 공란우 선발기준 확립	경상남도 김해축협산하 고등등록우 중 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대로 선발기준 확립	체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대로 선발기준 확립 선발기준에 적합한 공란우 개체 후보 선발
개체별 수정란 인식 및 증명서 발급기준 확립	생산이력제에 활용되는 초위성체(Microsatellite, MS) 마커를 이용해 DNA 분석을 통해 얻은 대립유전자형을 기준으로 증명서 발급	수정란을 만들기 위해 사용된 종모축과 공란우의 대립유전자형 분석 수정란 생산을 위해 사용된 종모축과 공란우의 대립유전자형을 증명서에 삽입하여 증명서 발급
제1세부과제에서 1차 선발된 공란우 중에서 경제형질 유전력 기준으로 최종 공란우 선정	경제형질의 유전력 등을 기준으로 최종 5두의 공란우를 선정	경제형질의 유전력 등을 기준으로 선발된 공란우 후보개체 중 번식능력 등을 고려하여 최종 5두 선발
Data Base구축으로 조기선발체계 구축	종모축 및 공란우에 대해 초위성체(Microsatellite, MS) 마커를 이용해 대립유전자형을 분석하여 D/B 구축	수정란을 만들기 위해 사용된 종모축과 공란우의 DNA를 각각 추출 추출된 DNA를 이용하여 대립유전자형을 분석하기 위해 Multiplex PCR 방법으로 유전자형 증폭 염기서열 분석장치 활용해 대립유전자형 분석 분석된 대립유전자형의 디지털 데이터 D/B화
초음파 및 직장촉진법 등을 이용한 난소와 자궁상태별 이식시기 규명	이식된 수정란의 정상적인 착상을 위해서는 대리모의 발정동기화 및 난소의 배란과 자궁상태 등이 매우 중요한 기준이 된다. 기준을 엄격히 적용하여 이식함으로써	대리모의 선발과 발정동기화는 최상의 조건을 맞추기 위해 엄격한 기준으로 실시하였음. 발정동기화를 실시하여 발정확인 후 2일째에 배란확인, 이식 전날인 6일째에 배란된 난소의 황체확인 및 자궁의 상태 확인 후 정상적인 황체의 발육상태와 자궁의 건강성 등을 직장촉진

	궁극적으로 임신율과 분만율을 극대화시킬 수 있음	법으로 확인 후 이식을 실시하였음
발정동기화 및 자연발정우를 이용한 수정란이식 후 수태율 비교분석	매주 수, 토요일 이식을 실시하는 일정으로 자연발정우 보다는 발정동기화를 유도하여 대리모를 선발하여 이식에 활용하였음	자연발정우 보다는 정해진 일자에 수정란이식을 위해 매주 수, 토요일에 이식일정으로 발정동기화를 유도하여 대리모를 활용하였음. 즉 정해진 숫자를 원활하게 준비하고 활용하기 위해서는 자연발정우 보다는 발정동기화에 의한 대리모를 활용하였음
체내유래 수정란의 이식시기별 수태율 조사	OPU 유래 체내난자의 이식시기 별 수태율을 비교 조사하고자 하였음	OPU유래 체내수정란의 이식은 OPU채란이 정해진 일정에 따라 실시되기 때문에 이식의 일정도 매주 수, 토요일에 실시하게 됨. 이러한 일정으로 수정란이식은 7일째 실시함으로써 계획에서와 같이 이식 시기별 수태율 조사 등은 이루어지지 않았음
체내유래 수정란이식에 적합한 사육환경 개발과 수란우상 태별 수태율 조사	사육환경, 사육농가별, 수란우의 상태별 수태율을 비교 조사 하고자 함.	제2세부과제 기관인 김해축협에서 한우 체외수정란 이식을 실시한 경험이 있으며 이러한 결과에서 사육농가별 수태율을 근거로 저조한 성적의 농가는 제외하고 대리모를 선발하여 활용함으로써 궁극적으로 수태율을 높이고자 하였음. 사육농가별로 사육체계에서 차이가 있고 그리하여 대리모의 건강상태와 body score 등의 차이점을 확인할 수 있었음. 이러한 기초데이터는 차후 수태율을 높이기 위한 대리모의 선발기준에 매우 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 판단됨

2. 1차년도 세부연구수행 결과

[제1세부과제] 체내유래 수정란 생산 기술 개발

○고등 등록우 기록과 질병 및 번식기계 능력 검사와 예방접종 등에 의한 1차 공란우 10두 선정

현재 활용되고 있는 공란우는 5두 중에서 채취 불가능한 1두를 제외한 4두 (관리번호: 5535, 7682, 8322, 8490)를 활용하고 있다 (그림1). 이들의 선발을 위해서 공란우는 고등등록우로서 정상적인 번식능력을 가지고 있으면서 특히 감염성 질병이 없으며 번식기관의 능력에 문제가 없는 개체를 선발 활용하고자 10두를 선정하고 항시 5두를 OPU 작업에 활용하고 있다. 이들의 선정은 실제 이식 후 산자의 생산하였을 때 고능력, 고급육을 생산할 수 있는 후보축이어야 하는 관계로 매우 엄격한 기준에 의해 협동연구기관인 김해축협에서 확보하고 있는 자료, 즉 후대검증 자료로서 비육 출하성적이 A1++ 성적을 얻은 경험이 있는 고등등록우를 최종 선발하였다. 그러나 아무리 좋은 개체일지라도 OPU 채취과정에서의 문제점, 난자의 회수 숫자, 수정란 생산에 활용할 수 있는 1,2등급의 난자 수, 체외수정란의 생산효율 등을 점검하여 그 효율을 비교분석하여 최종적으로 5두를 확보하여 활용하고 있으며 비교분석하고 있다.

본 연구에서 특히 7682번의 경우는 고등등록우가 아니지만 육량이 아주 우수한 특성을 가지고 있는 개체로서 협동연구기관에서 적극적으로 추천하여 공란우로 활용하고 있다 (체중 : 730kg, 체고 : 148, 체장 : 170, 흉위 : 213). 또한 본 연구과제의 초기에 채란기술의 습득과 숙련을 위해서 젖소 미경산우 4두 (7245, 7246, 7247, 7253)를 활용한 훈련을 실시하였다. 또한 이들 젖소 미경산우들은 한우와 공히 질병감염 등을 조사하여 선발하였으나, 능력을 전혀 고려하지 않고 선발하였다.



그림 1. 한우 고등등록우 OPU 유래 체내 난자 공란우 정보.

○ 개체선발을 위한 경제형질의 유전력을 기준으로 최종 공란우 10두 선정하여 당장 활용 가능한 5두를 우선적으로 선정 이용

협동연구기관에 생산된 수정란을 이식해야하기 때문에 협동연구기관 내에서 공란우의 선발을 실시하였으며, 실제 협동연구기관 내의 최우수 한우로부터 선정하였다. 후대검정에 의해 A1++ 송아지를 생산한 경험이 있는 공란우를 최우선으로 선발하였다. 즉 생산된 숫 송아지를 비육출하 후 A1++ 등급을 받은 어미소를 선발하여 공란우로 이용하고자 하였다. 이때 총 10두를 선발하고 당장 이용 가능한 5두를 우선적으로 공란우로 활용하면서, OPU 채취과정에서의 애로사항, 회수되는 난자의 총 수, 수정란 생산을 위해 활용 가능한 1,2등급의 난자 회수 수, 체외수정란의 생산효율 등을 비교분석하면서 공란우의 교체를 실시하였다. 즉, OPU 유래 체내 난자의 채취와 수정란의 생산에서 공란우의 “개체차이”가 매우 크다는 것을 확인하였다. 그래서 이러한 결과를 비교분석하면서 가장 효율적인 공란우를 활용하기 위한 기준을 확보하였다는 것이 본 연구에서의 가장 큰 성과라고 판단된다.

그러나 5두 중 실제 채취에 활용 가능한 두수는 4두였으며, 그 중 1두는 채취가 불가능하여 데이터에 포함시키지 않았다. 또 다른 1두 역시 난자 채취시 심한 거부반응으로 채취를 중단하고 이들 2두를 교체하고자 추진 중에 있다 (그림 1).

○선발된 공란우를 기준으로 개량방향에 맞춰 종모우 선정 (6종류의 우수한 종모우 정액 확보 후 이들의 수정란생산 능력 및 근친도 등을 고려해 활용)

현재 국내에는 한우 축군의 개량을 위해 다양한 종모우(씨수소)를 선발하여 동결정액을 전국으로 보급하고 있다. 하지만 선발된 종모우 중 체외수정율 및 배발달율에 있어서도 각기 다르기 때문에 효율적인 수정란 생산을 위해서는 공란우의 근친도 및 씨소의 육질등급 등을 고려하여 정액을 선발하여 활용해야 한다. 표 1은 본 연구에 사용하고자 하는 동결정액의 선발을 위해 6종류의 한우 정액을 우선 선발하고자 도체 중 및 마블링 점수 등을 축협중앙회 한우개량사업소를 통해 조사한 결과이다. 계획서 상에서는 7종류의 정액을 확보하여 최종 선정 작업을 하는 것이었으나, 동결정액의 구입과정에서 6종류의 정액을 확보하여 6종류의 정액으로 수정란의 생산효율 등을 검토하였고 최종적으로 3종류(KPN 642, 641, 507)를 선정하였다.

표 1. 동결정액의 유전능력과 특성

Semen type (KPN)	Carcass weight (kg)	Backfat thickness (mm)	Marbling score
493	2.38	1.48	0.55
494	9.69	3.97	0.22
507	7.08	3.25	0.65
538	14.24	2.2	1.06
641	-2.07	3.49	0.91
642	14.08	3.36	0.83

<2009, 축협중앙회 한우개량사업소>

표 2는 도축장 유래 난자를 이용하여 각 종모우의 정액의 배발달율을 조사한 결과이다. 각 종모우 개체에 따라 배반포기까지의 발달율에 있어서 14.2 ~ 26.9% 까지 다양한 배발달율이 조사되었다. 그중 KPN 507, 641 및 642의 동결정액이 가장 높은 배발달율을 얻어서 OPU 유래 체내난자의 체외수정을 위해 선발하였다.

표 2. 한우 종모우별 체외수정란의 발달율 조사

Semen type	No. of oocytes	No. of culture	No.(%) of 2-4 cells	No. (%) of expanded blastocysts
KPN 493	145	127	96(75.6)	18 (14.2)
KPN 494	132	106	80(75.5)	22 (20.8)
KPN 507	132	103	82(79.6)	25 (24.3)
KPN 538	145	121	92(76.0)	19 (15.7)
KPN 641	140	130	103(79.2)	33 (25.4)
KPN 642	134	108	88(80.6)	29 (26.9)

○호르몬 투여법과 비 호르몬투여방법의 효율성 비교연구

OPU유래 체내난자를 채취하기 위하여 호르몬처리와 비호르몬처리 방법에 따른 체란효율을 비교분석하기 위하여 미경산우 젖소를 이용한 연구를 수행하였다. 위의 결과에서와 같이 미경산우의 경우 난소의 발육이 완전하지 않은 관계로 난포의 발육 수, 회수 수 및 배반포기 배 발달율 등 모든 지표에서 낮은 경우를 보였다. 그러나 본 연구를 위해 한우를 활용하기보다 젖소를 이용한 기본 자료를 얻기 위해 수행

한 결과는 다음과 같다.

표 3을 보면 호르몬을 처리한 공란우의 경우 1,2등급의 난자는 46%, 대조구의 경우는 39%로 조사되어 호르몬 처리구에서 약간 높은 경향을 보였으며, 체외수정 후 난할율의 경우도 호르몬 처리구 (76.9%)가 대조구 (57.1%) 보다 높은 결과를 얻었다. 배발달에 있어서도 호르몬 처리구 (30.8%)가 대조구 (20.3%) 보다 높은 결과를 얻었다. 본 연구에서 비록 호르몬 처리구가 약간 좋은 배반포 성적을 보였으나, 통계 처리결과 유의적 차이는 없었다. 그리고 한번 호르몬 처리를 시술한 공란우는 약 2주간의 휴식기를 가져야 하며 휴식기간에는 지속적인 관리로 인해 인건비 및 사료비 등 경제적으로도 손실임에 틀림없다. 궁극적으로는 수정란을 생산하여 이식하고 지속적으로 활용하기 위해서는 호르몬 처리에 의한 난자의 채취보다는 대조구와 같이 호르몬을 처리하지 않고 주당 2회씩 난자를 채취하는 것이 보다 더 효율적이라고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 호르몬 처리를 하지 않고 지속적으로 주2회씩 체내유래 난자를 채취하였다.

실제 난자를 채취하는 과정에서의 기술적인 부분에서도 호르몬 처리구에서는 난포가 대난포로 성장함으로써 needle 주입 때 난포액의 누출에 의한 난자의 회수율이 낮은 경우가 있을 뿐만 아니라 난포 내에서 성숙과정을 거쳤기 때문에 과립막세포의 팽창에 의한 needle 및 tube 내에서 정체되는 경우가 종종 발생하게 된다. 그러나 호르몬 처리를 하지 않은 대조구에서는 이러한 부차적인 문제점이 발생하지 않을 뿐만 아니라 지속적인 채취에 의해 follicle wave에 따른 성숙중인 난자를 채취할 수 있는 장점이 있다. 그래서 체내유래 난자를 활용한 체외수정란의 생산에서 비 호르몬처리에 의한 주2회씩 OPU 채란방법은 매우 효율적인 수정란의 생산이 가능할 것이다.

표 3. OPU 유래 체내난자 채취를 위한 호르몬 처리에 의한 난자의 회수 및 체외 배발달율

	난자수	난자 등급				IVC	Cleavage (%)	B.L(%)
		1	2	3	4			
대조구	151	23	37	31	60	133	76 (57.1)	27 (20.3) ^a
호르몬 처리	26	3	9	4	10	26	20 (76.9)	8 (30.8) ^a

* 미경산 젖소를 처리하였음.

○ 체내유래 난자 채취기술 개발 및 채취환경 조성

1. 체내유래 난자 채취기술 개발

공란우를 보정틀에 고정시켜 움직임을 최소화 한 후 2% 리도카인 마취제를 약 3-7 ml를 경막외 국소마취를 시키고 꼬리를 묶어 고정하였다. 이후 물로 외음부 세척을 한 후 70% 알콜과 20%로 희석된 베타딘으로 외음부를 소독하였다 (그림2). 직장검사용 장갑으로 난소점검을 하고, 초음파 채취기를 직장검사용 장갑으로 보호하여 질내로 삽입하고, 초음파 채취기기를 통해 난포의 개수를 확인하고, 일회용 long 주사침 (19 G)를 이용하여 2-6 mm크기의 미성숙 난자

를 채취하였다. 주사침 및 흡입되는 관내에는 흡입용 배지 (HEPES + 10 IU Heparin)를 충전하였다. 초음파진단기는 준비된 transducer guide내에 장착되어 있고, guide는 질내로 삽입하여 난소의 난포를 관찰할 수 있게 고안되었다. 질 벽을 통해 난소를 견인하여 transducer에 최대한 밀착시킨 후 난포를 확인하여 미성숙난자를 채취하였다. 흡입은 vacuum pump를 작동시켜서 작업을 용이하게 하였다. 초음파 상에서 난포를 확인한 후 needle을 삽입하여 monitor상에 needle을 횡절단할 수 있도록 위치시켰다. 난질벽을 관통하여 복강 내로 들어가 난소에서 확인된 난포 내에 needle을 삽입한 후 vacuum pump의 foot switch를 작동시켜 미성숙난자와 포함된 난포액을 흡입하여 배지(HEPES + 10 IU Heparin)에 정지시켰다.

초음파 화상에서 난포가 완전히 사라질 때까지 vacuum pump를 작동시켜 음압을 유지시켜 흡입하여 난자를 흡입하게 하였다. 2~3개의 난포 흡입 후에 배지로 세척하는 것을 모든 난포의 흡입이 끝날 때 까지 반복하였다. 채취기술에서의 핵심은 주 2회에 소량의 미성숙난자를 채취함에 있어서 한 개의 유실 없이 채취하는 것이다. 이를 위해서 유입된 혈액과 함께 붙는 현상을 막기 위해 배지에 10IU Heparin 을 첨가하였고, 반복적으로 배지로 세척하였다.

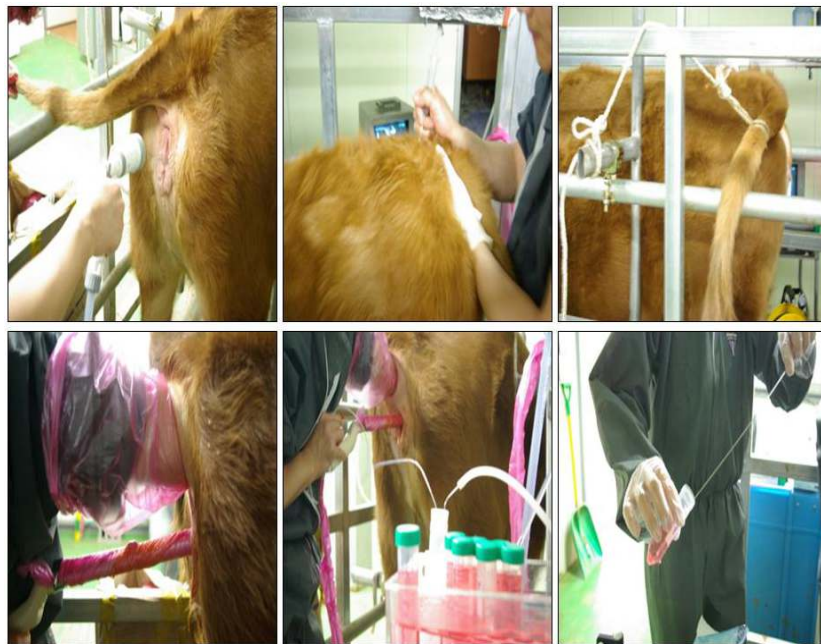


그림 2. OPU 유래 체내난자의 채취과정.

2. OPU유래 체내난자의 채취환경 조성

- 보정틀 : OPU유래 체내난자의 채란 중 공란우의 움직임을 최소화하기 위해서 머리 쪽에는 stanchion 설치하였고, 몸통 쪽에 각 개체마다 몸통을 고정시킬 수 있는 조절 가능한 고정대를 자체 제작하여 설치하였다 (그림3). 설치 후 공란우의 움직임이 최소화되어 채란이 설치 전보다 용이하게 되었고, 채란 시에 유입되는 혈액의 양도 대폭 줄어들었으며, 난포 대비 회수되는 난자의 수도 높아졌다. 즉 보정틀의 자체 제작에 의한 설치는 매우 효율적으로 활용 가능하게

되었다. 기존에 개발되어있는 보정틀은 유압식으로 몸통을 고정시킬 수 있는 시스템인데 고가의 비용이 지출되어야 하는 문제점이 있어 본 연구팀에서는 자체 제작하여 이러한 부분을 보완할 수 있었다. 아래의 그림에서와 같이 몸통의 고정뿐만 아니라 소를 보정틀에 도입하는데 어려움이 많은데 이것은 보정틀의 좌측면을 고정식이 아니라 분리 가능하도록 제작하여 소의 도입을 훨씬 유리하게 제작되었다. 이러한 시스템은 좁은 공간에서 소를 유도할 수 있는 펜스가 없는 실정에서는 매우 효율적으로 활용할 수 있는 시스템으로 판단된다.



그림 3. OPU 채란을 위한 보정틀과 고정된 소의 그림 (자체 제작한 보정틀임).

- 온도 조절

채란 중에 난소의 난포로부터 흡입되는 난자는 배지(HEPES + 10 IU Heparin)에 유입되는데, 이때 배지는 난포의 유입 중에도 적정온도(37 ℃)를 유지할 수 있도록 온도조절장치를 이용한 항온수조에 담겨져 있게 하였다. 항온수저는 채란과정 중에 생기는 움직임에 같이 움직일 수 있도록 이동가능하게 설치하였다 (그림4).



그림 4. OPU유래 체내난자의 채취과정에서 회수액의 보온을 위한 항온장치.

배지의 온도는 적정온도(37 ℃)를 유지하였으나, 채란과정 중에 연결관에 유입되어 이동 중에 적정온도를 유지하기 위해서 채란실에 난방장치를 설치하여 외부온도를 최소 25 ℃이상 유지될 수 있도록 하였다. 특히 겨울철에 수행하는 과정에서는 난자의 온도에 의한 손상을 최소화시킬 필요성이 있기 때문에 실내의 온도조절은 매우 민감한 사항으로서 냉난방 시설을 갖추고 항온수조를 이용하면서 이러한 문제점을 극복하였다 (그림 5).



그림 5. 채란실 내의 난방장치 및 내부 모습.

○ 체내유래 난자의 체외성숙, 수정, 배양기술 개발

자성생축을 이용한 생식세포의 활용기술은 축산부분에서 가축개량의 목적으로 다양하게 이용되어지고 있다. 예를 들면, 도축되어진 암소의 난소를 이용한 생식세포의 재활용 및 과배란 처리유도를 이용한 고능력 축종의 수정란 대량생산 및 이용 등이 있을 것이다. 하지만, 이러한 도축 유래 자성생식세포의 활용은 가축의 개량에 있어 근본적인 해결책이 되지 못한다. 또한, 과배란 처리기술을 활용한 수정란 생산 및 이식에 있어서도 고능력의 축종을 이용하여 한번에 많은 양의 수정란을 생산·이식하여 축종의 개량을 가속화 할 수 있는 이점이 있으나, 한번 흐르몬 처리를 하게 되면 장기간 (약 2개월)의 자축의 휴식기간을 거쳐야 하며 이는 경제적으로 큰 이점이 되지는 못한다. 하지만, Ovum Pick-Up (OPU) 기술을 이용한 가축의 개량은 과거에도 많이 시도되어졌으며, 현재는 이를 더욱더 발전시켜 주 2회 채취하는 수준까지 발전되어 가축의 개량 측면에 많은 이점을 가지고 있다. 하지만 생축의 난자를 채취하는 일련의 과정이 고도로 숙련된 기술이 요구되며, 채취난자의 경우도 채취회당 대량으로 생산할 수 없다. 따라서 소량으로 채취되는 자축의 난자를 체외성숙·수정·배양을 통해 이식가능한 수정란을 효율적으로 생산할 수 있는 기술이 핵심이다.

○ 도축장유래 난자를 이용한 효율적인 배반포 생산 조사

표 4는 도축장 유래 난자를 이용하여 소수의 수정란을 약 50 ul 소적에 배양한 결과이다. 앞서 기술하였지만, 생축을 활용한 자축의 난자의 회수는 극히 소량이며, 과거 많은 연구결과를 보면 소수의 수정란을 체외배양 하였을 때는 극히 낮은 배발달율을 보였음을 보고한 결과들을 볼 수 있다. 따라서 이러한 선행 연구결과를 이용하여 개체별로 소수의 난자만을 채취할 수 밖에 없는 OPU유래 체내난자에 활용코자 한다. 약 50 ul 소적에 각각 난자를 5, 0, 15개씩 배양 하였을 때 15개의 난자를 배양한 처리구에서 높은 배반포 발달율을 보였다. 이러한 결과는 일정 개수 이상의 수정란이 공동배양 되지 못한다면 저조한 배발달율을 얻게 된다는 것을 시사한다.

표 4. 체외배양에 있어 수정란의 개수가 배발달에 미치는 영향

No. of oocyte/ 50 ul drop	No. of replicated	No. of oocytes	No. of cleaved	Blastocyst		
				day 7 (%)	day 8 (%)	Total (%)
5	4	20	13 (65.0)	1 (5.0) ^a	-	1 (5.0) ^a
10	29	281	155 (55.2)	60 (21.4) ^b	22 (7.8)	82 (29.2) ^b
15	34	488	293 (60.0)	165 (33.8) ^c	40 (8.2)	205 (42.0) ^c

○ OPU유래 체내난자 채취 시 난포단계조사 및 난자 회수율

본 연구에서 OPU 유래 체내난자의 채취 목적으로 사용되는 우 축군은 젖소 4두, 한우 4두를 사용하고 있다. 앞서 기술한 바와 같이 OPU 유래 체내난자를 획득하기 위해서는 많은 기술적 숙련도가 필요하며, 이를 바탕으로 지속적으로 생축에서 난자를 채취 할 수 있어야 한다. 또한 기존의 보고에 의하면 소의 경우 follicle wave가 발정주기 당 3회로 보고되었다. 따라서 성공적인 체내난자 회수를 위해서는 각 개체의 난소에서 발육중인 난포상태 (follicle stage)를 필수적으로 조사 관찰 하여야하며, 난소 상태에 따라 채취되는 난자의 질도 다르기 때문에 지속적으로 monitoring을 하여야 한다. 각 난포의 크기는 그림 6의 초음파 사진에 준하여 판단하였다. 아래 표 5는 각개체간 난포의 상태 및 난자의 회수율을 조사한 결과이다. 난포발육상태를 조사한 결과 각 개체마다 대부분이 small follicle 이 우세하게 존재하는 것으로 조사되었다. 이는 매주 2회씩 난자를 채취한 결과 성숙중인 난포만이 존재하는 것으로 판단된다. 또한 각 개체별 난자의 회수율을 조사한 결과는 그림 7와 같다. 그림 7에서 보듯이 대부분의 개체가 평균 약 65%의 난자 회수율을 보였으며, 각 개체별로 약간의 차이가 있는 것으로 조사되었다. 또한, 젖소 및 한우 간에 난자 회수율에 있어 약간의 차이가 있었다.

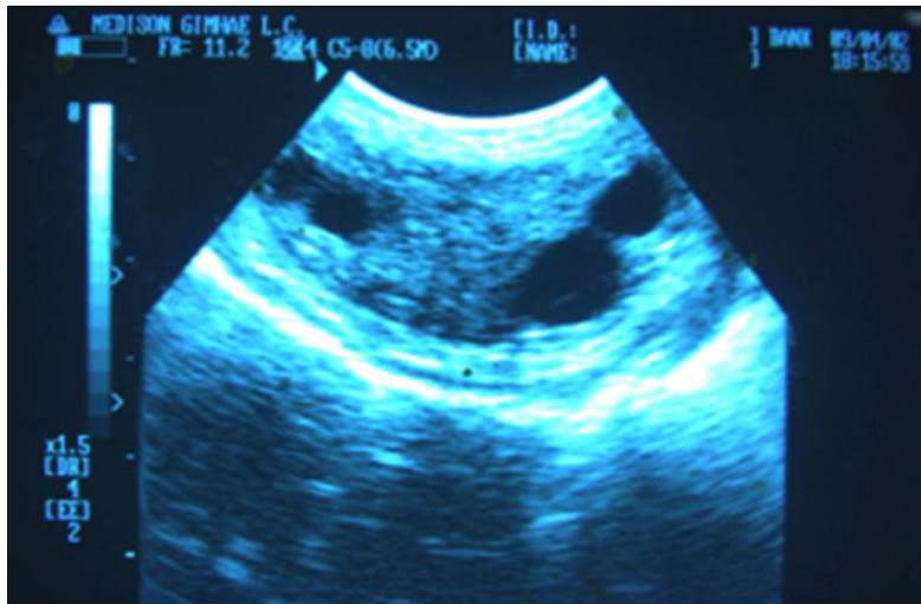


그림 6. 난포의 크기 비교 초음파사진.

표 5. 체내난자 채취시 각 개체별 난포 발육상태 및 난자 회수

	관리번호	Repeat	Follicle stage				Recovered oocytes
			Total	S	M	L	
젓소	7245	16	120	102	7	11	81
	7246	18	96	91	1	4	70
	7247	17	113	108	3	2	71
	7253	18	73	66	5	2	46
Sub total		69	402	367	16	19	268
한우	5535	14	106	105	1	0	73
	7682	22	165	157	7	1	113
	8322	21	145	142	3	0	129
	8490	22	105	100	4	1	67
Sub total		79	521	504	15	2	382

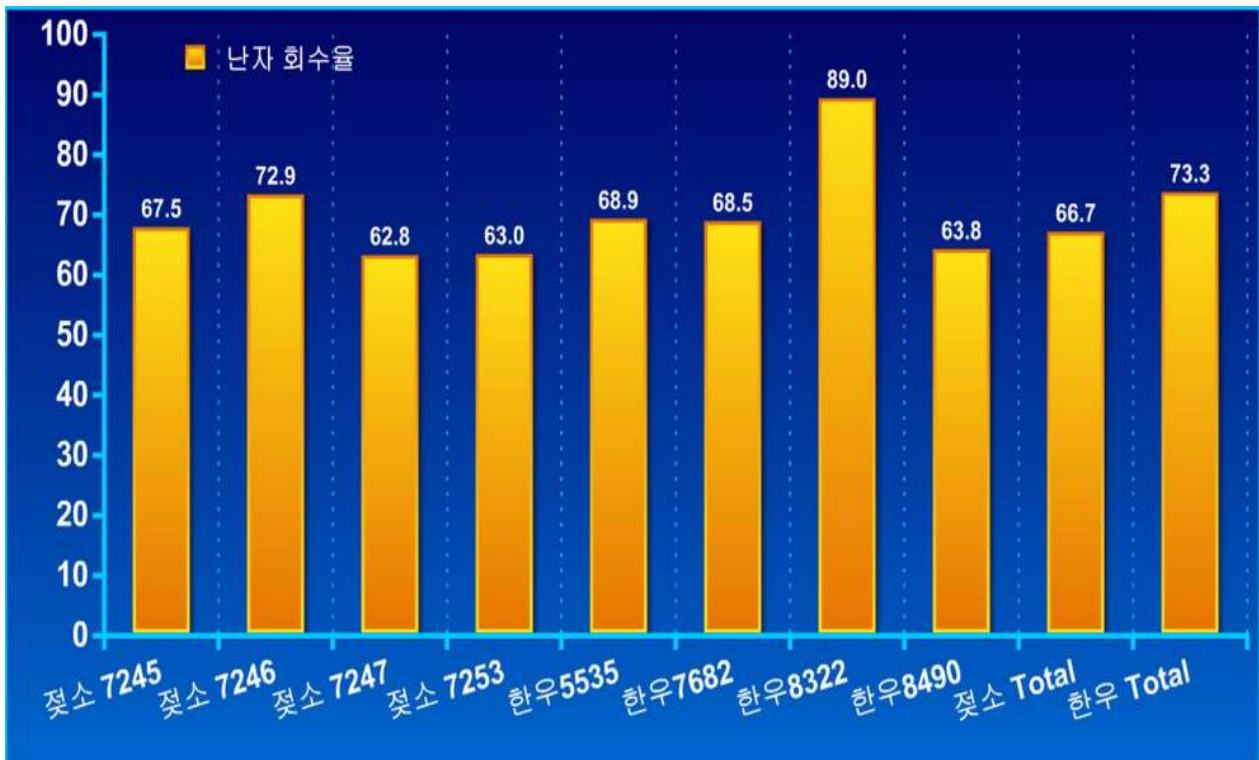


그림 7. 각 개체별 조사된 난포수 대비 체내난자 회수율.

○ 개체별 체내난자 채취 시 회수된 난자의 등급 조사

생축을 이용한 생식세포의 연구에서 개체별 다양성이 매우 강조된다. 이는 어미로부터 물려 받은 유전력 뿐만 아니라 자라온 환경, 먹이의 급식 및 질병에 노출된 환경이 다르며 또한 체내 호르몬의 상태 등이 매일매일 변화한다. 이러한 요인들로 인해 정량화 및 규격화된 체내난자의 회수가 어려운 요인으로 작용한다. 따라서 아래 그림 3의 체내난자 회수 후 등급에 따라 각 개체별 난자의 등급을 나누고 개체별 등급별 회수율을 조사하였다 (그림 8).

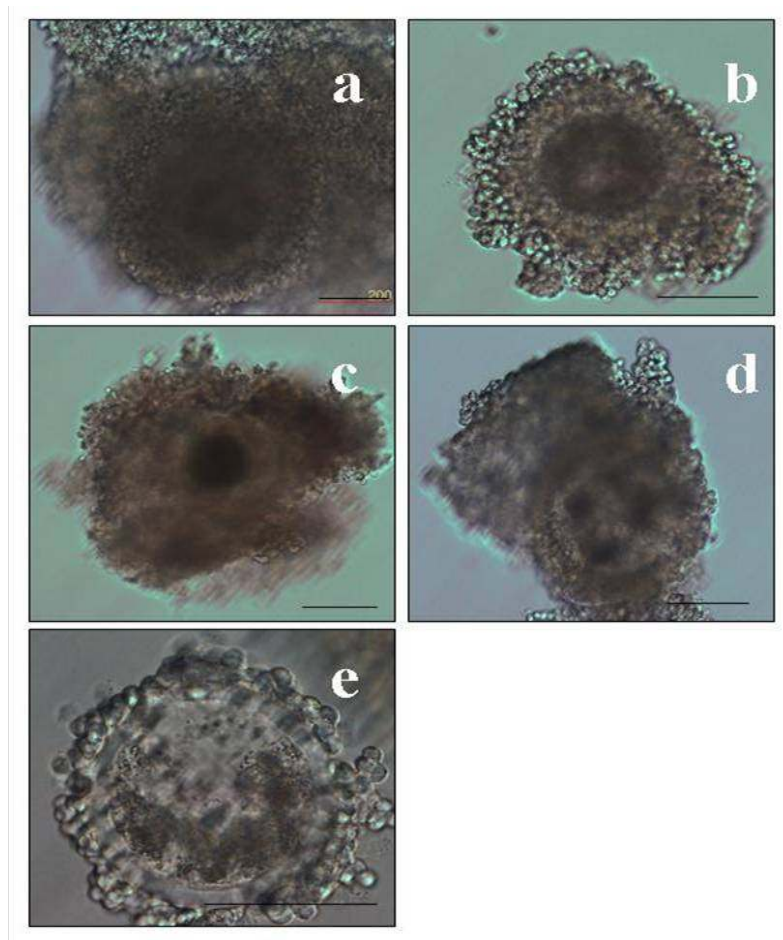


그림 8. 난자 등급별 구분. a) 1 등급, b) 2 등급, c) 3 등급, d) 4 등급 및 e) 사멸난자.

표 6에서 보면 각 개체별로 다양한 등급의 난자가 회수됨을 조사되었고, 그림 9에서 보듯이 grade 1 및 2등급의 난자의 회수는 젖소에서는 개체별로 비슷한 경향을 보였으나, 한우의 경우 개체차이가 월등히 높음을 알 수 있었다.

표 6. 난자 grade stage별 난자의 회수율

	관리번호	Repeat	total follicle	Oocyte grade						
				Total	G1	G2	G3	G4	G1+G2	G3+G4
젓소	7245	16	120	81	13	19	16	33	32	49
	7246	18	96	70	10	18	15	27	28	42
	7247	17	113	71	9	18	16	25	27	41
	7253	18	73	46	6	12	11	13	18	24
Sub total		69	402	268	38	67	58	98	105	156
한우	5535	14	106	73	13	27	21	12	40	33
	7682	22	165	113	1	14	26	72	15	98
	8322	21	145	129	36	39	29	25	75	54
	8490	22	105	67	21	25	11	10	46	21
Sub total		79	521	382	71	105	87	119	176	206

실제 체외수정란을 생산하기 위해서는 G1, G2 등급의 난자를 체외성숙, 수정 및 배발달에 활용하게 되는데 실제 OPU유래 체내난자의 비율을 보면 한우에서 G1 + G2 등급 (176개), G3 + G4 등급 (206개)로서 수정란 생산에 활용할 수 있는 G1 + G2 등급의 난자는 총 회수된 난자 중에서 46% 정도의 비율이었다. 즉 1,2등급의 난자는 1회 채취 당 약 2.2개의 난자를 회수할 수 있고, 총 난자는 4.8개를 회수할 수 있었다. 이렇게 질적으로 우수한 등급의 난자의 회수가 낮은 것을 해결해야만 궁극적으로 많은 수의 이식 가능한 수정란을 생산할 수 있을 것으로 판단된다.

이러한 문제점을 극복하기 위하여 2가지 측면으로 연구를 진행하고자 한다. 첫째, 공란우의 번식기관, 즉 난소의 기능을 회복시켜 난자의 질을 높이는 방법과, 둘째, 채취된 난자의 체외성숙 기간 동안 난자의 질을 향상시킬 수 있는 방법으로 접근하고자 한다.

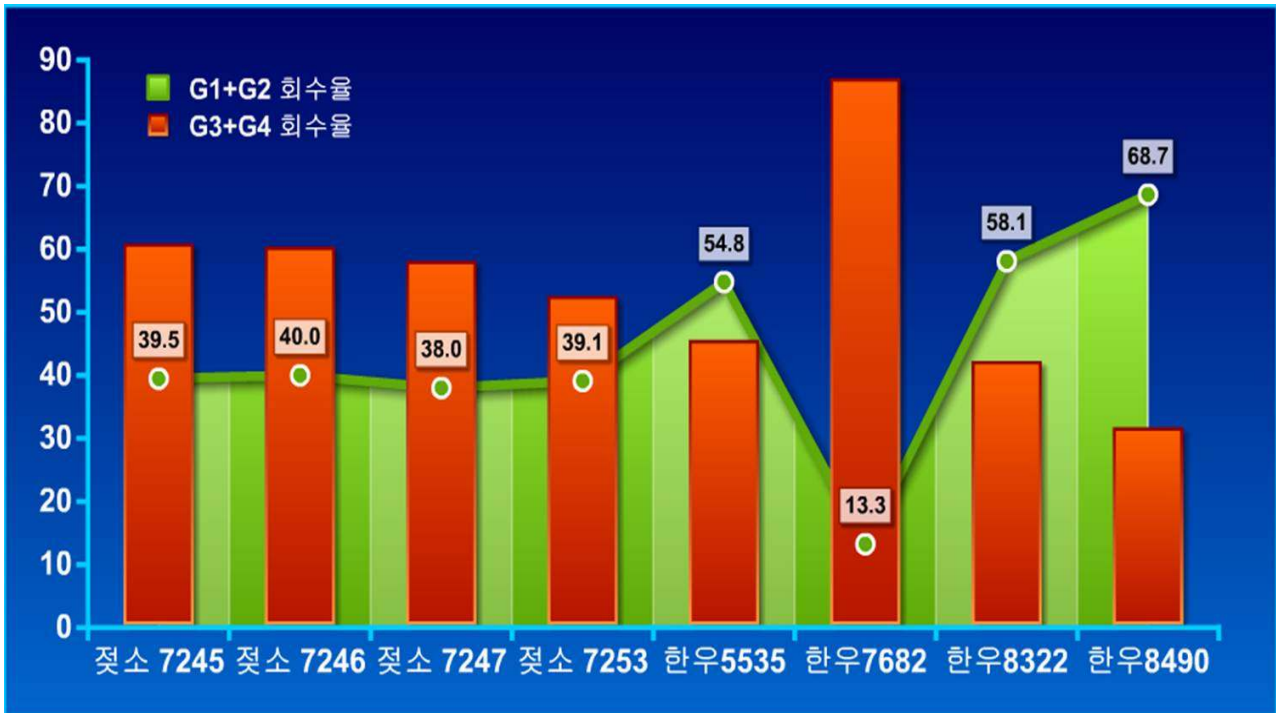


그림 9. OPU 유래 개체별 체내난자 등급별 출현비율.

그림 10 은 반복 횟수에 따라 개체별 평균 회수난자를 조사한 결과이다. 평균적으로 약 4.8개의 난자가 회수가 진행됨을 알 수 있으며, 개체별 차이가 뚜렷함을 알 수 있다. 또한, 1,2 등급난자의 회수는 약 2.2 이나 전체적으로 개체별 차이가 있음을 알 수 있다.

앞서 기술한 바에 의하면 (표 4), 난자의 체내 성숙수정-배양에 있어 정상적인 배발달을 유도하기 위해서는 최소 10개 이상의 난자를 공배양해야만 성공적인 배발달을 유기시킬 수 있음을 기술하였다. 그림 5의 결과를 보면 평균 4.8개의 OPU유래 체내난자를 회수 할 수 있고 또한 정상적으로 배발달을 유기시킬 수 있는 1,2등의 난자는 2.2개에 정도이다. 이러한 조사 결과로 볼 때 OPU유래 체내난자의 체외배양에 있어 많은 어려움이 따름을 시사한다. 따라서 도축장 유래 난자와 구별하여 성공적으로 체내유래 난자의 배발달을 유기시킬 수 있는 기술이 개발되어야한다. 즉 OPU유래 체내난자의 수정란 생산을 위해서는 개체별 난자의 배양이 필수적이다. 왜냐하면 다른 개체의 것과 섞인다면 수정란의 개체별 인식이 불가능할 뿐만 아니라 궁극적으로 향후 송아지의 분만 후 등록을 할 수 없을 것이다. 그리하여 궁극적으로 이러한 적은 난자의 수로 체외수정란을 생산하기 위해서는 다양한 group culture 기술이 개발되어야 할 것으로 판단된다.

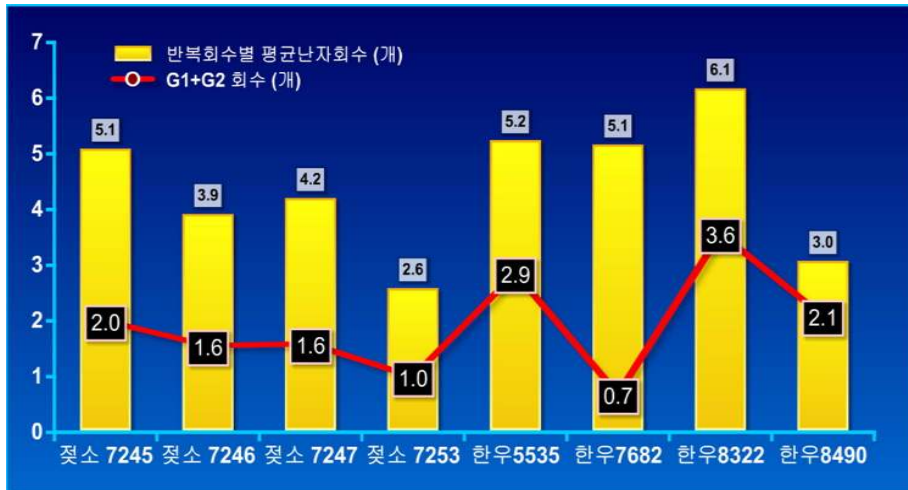


그림 10. 각 개체별 반복회수별 평균 OPU 유래 체내난자의 평균 회수난자와 1,2등급 난자의 회수.

○ OPU 유래 체내난자와 도축장유래 난자의 개체별 배양을 위한 공배양 효과 조사

앞서 언급하였듯이 OPU유래 체내난자는 대량으로 채취하기가 어려운 한계점이 있으며, 또한 적은 수의 난자로 배양을 한다면 성공적으로 배반포를 생산하기 어렵다. 따라서 도축장유래 난자와 공배양을 통해 OPU유래 체내난자의 성공적인 배발달을 유도하고자 한다. 도축장유래 난자와 OPU유래 체내난자의 구별을 위해 도축장유래 난자를 agar에 고정하고 OPU유래 체내난자를 공배양함으로서 배발달을 유도하고자 하였다. 그림 11에서 보듯이 도축장난자를 agar로 고정하였으며 수정 및 배양을 실시하여 성공적으로 배발달을 유도할 수 있었다.

본 연구에서는 OPU유래 체내난자의 채취를 저녁 8시 정도에 실시하여 체외성숙을 유도하였고, 도축장유래 난자는 오후 약 14시쯤에 체외성숙이 들어감으로 인해 시간적인 차이가 있다. 따라서 이러한 시간적 차이를 극복하기 위해 도축장 유래 난자를 핵성숙 억제제인 6-DMAP에 약 6시간정도 배양하여 난자 핵 성숙을 일시적으로 억제한 후 체내난자 체외성숙 배양시 동시에 핵성숙 억제를 풀어줌으로 난자의 핵성숙 cycle을 조절하였다. 아래 표 7에서 보듯이 도축장 유래 난자와 공배양을 실시한 처리구는 공배양을 실시하지 않고 체내난자만을 이용하여 수정/배양시켰을 때 보다 월등히 높은 배발달율을 보였다 (4.4 vs. 26.6%).

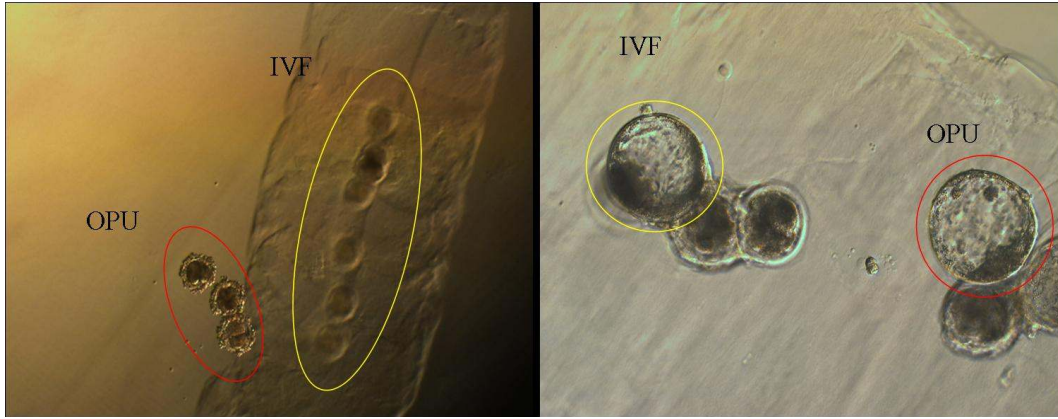


그림 11. OPU 유래 체내난자와 도축장유래 난자의 구별 및 공배양.

표 7. OPU유래 체내난자와 도축장유래 난자의 공배양이 배발달에 미치는 영향

	Oocyte grade				No. of total oocytes recovered	No. of embryos cleaved	No. of blastocyst
	G1	G2	G3	G4			
OPU 난자	39	36	35	26	136	131 (96.3)	6 (4.4) ^a
OPU 및 도축장유래 난자 공배양	10	29	25	30	94	88 (93.6)	25 (26.6) ^b

○ 개체별 OPU유래 체내난자의 체외 발달을 조사

표 8은 개체별 OPU유래 체내난자의 배발달을 조사한 결과이다. 젓소의 경우 개체별 배반포 발달에 있어서는 크게 차이가 없는 것으로 조사되었지만 한우의 경우 개체별로 크게 차이가 나는 것으로 조사되었다. 한우 4두의 OPU유래 체내난자의 배발달능력을 비교분석한 결과 총 회수된 난자에서 17.5%, 1,2등급의 난자에서 34.6%가 배반포기배까지 발달하였다. 그러나 개체별 발달능력에서 큰 차이를 보이고 있다. 즉 7682번의 경우 60.0%를 보인 반면, 5535, 8490번의 경우는 17.5, 26.1%의 배반포기배까지의 발달율을 보였다. 이러한 결과는 공란우를 선발할 때 우수한 능력의 개체선발과 아울러 수정란의 생산능력도 반드시 고려되어야 할 중요한 기준임을 보여주고 있다. 또한, 그림 8을 보면 실제적으로 배반포기 배까지 발달할 수 있는 능력을 가진 1,2 등급의 난자비율, 배반포 생산비율을 조사한 결과 한우의 경우 총 34.6%가 배반포로 발달하였다. 또한 전체적으로 개체별 배반포 생산비율이 크다는 것을 알 수 있었다. 채취 횟수 당 배반포 생산 개수를 조사한 결과 평균적으로 약 1회 채취 당 0.8개였으나 우수한 개체의 것은 약 1.5개의 배반포기 배를 생산할 수 있는 것으로 조사되었다 (그림 12).

이러한 자료를 분석하면 각 개체별 채취되는 난자의 수와 난자의 질적 수준인 grade에서 많

은 차이를 보이고 있을 뿐만 아니라 배 발달율에서도 유의적인 차이를 보이고 있다. 즉 이러한 차이점을 극복하기 위한 연구가 필요하고 채취된 난자의 등급을 높일 수 있는 연구도 또한 필요하다.

표 8. 개체별 OPU 유래 체내난자의 배 발달율

	반복	Recovered oocytes	Oocyte grade				IVCI	IVCII	BL (%) /total oocytes	BL (%) / G1,2 oocytes	
			G1	G2	G3	G4					
젖소	7245	16	81	13	19	16	33	79	41	9 (11.2)	9/32 (28.1)
	7246	18	70	10	18	15	27	54	35	6 (11.1)	6/28 (21.4)
	7247	17	71	9	18	16	25	64	38	8 (12.5)	8/27 (29.6)
	7253	18	46	6	12	11	13	44	25	5 (11.4)	5/18 (27.8)
	합계		268	38	67	58	98	261	139	28 (10.7)	28/105 (26.7)
한우	5535	14	73	13	27	21	12	70	32	7 (10.0)	7/40 (17.5)
	7682	22	113	1	14	26	72	103	60	9 (8.7)	9/15 (60.0)
	8322	21	129	36	39	29	25	120	82	33 (27.5)	33/75 (44.0)
	8490	22	67	21	25	11	10	56	41	12 (21.4)	12/46 (26.1)
	합계		382	71	105	87	119	349	215	61/349 (17.5)	61/176 (34.6)

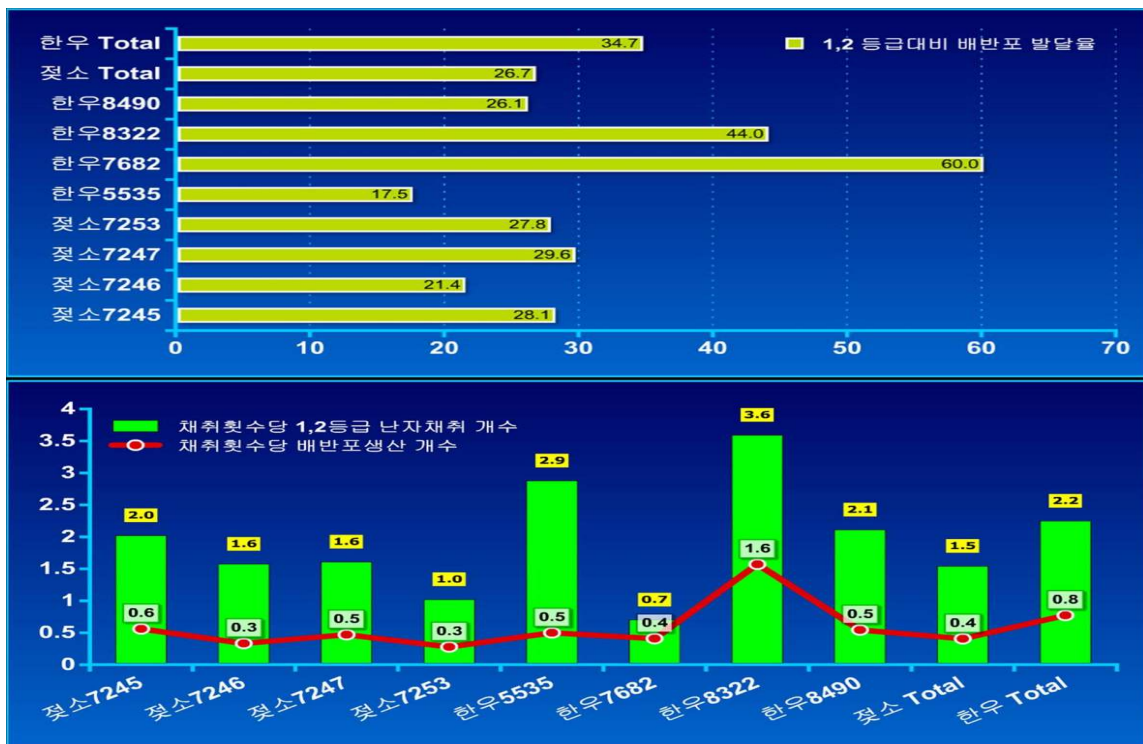


그림 12. 각 개체별 1,2등급 대비 배발달율 및 채취 횟수 당 배반포 생산 개수.

○ 공란우의 지속적인 OPU유래 체내난자 채취율 조사

OPU유래 체내난자를 채취하기 위해서는 공란우에서 지속적으로 양질의 난자를 채취할 수 있어야 한다. 따라서 본 연구에서는 2008년 10월부터 2009년 3월까지 지속적으로 난자를 채취한 결과 지속적으로 난자를 채취 할 수 있었으며, 각 개체별 차이가 있는 것으로 조사되었다 (표 9 및 그림 13).

약 6개월 이상 지속적으로 주 2회씩 OPU 채란을 하여도 기술적으로 전혀 문제가 없는 것으로 판단된다. 초기 훈련과정에서 난자의 회수율이 저조한 성적을 보였지만 일정수준 이상의 기술력이 정립된 상태에서는 채취에는 문제가 없는 것으로 판단된다. 또한 이러한 계속적이고 지속적인 난자의 채취가 공란우 난소 및 질벽에 손상을 주지 않을까 하는 염려를 하였지만 전혀 그러한 문제는 발견되지 않았다. 즉 주 2회씩 OPU 채란은 현재까지 6개월 이상까지 가능한 것으로 판단된다.

표 9. 지속적인 난자 채취 가능성 조사

월	젖소 7245						젖소 7246					
	2008			2009			2008			2009		
	10	11	12	1	2	3	10	11	12	1	2	3
반복횟수	4	8	9	6	5	5	3	5		7	6	5
채취횟수당 평균 채취난자 (개)	3.3	3.3	3.8	6.3	6.6	2	2.3	3.6		3.9	5.2	2.4
채취 횟수당 평균 1및2등급 난자 (개)	3.3	1.9	1.7	2.3	3.2	0.4	2.3	2.4		1.1	1.8	1.8
월	젖소 7247						젖소 7253					
	2008			2009			2008			2009		
	10	11	12	1	2	3	10	11	12	1	2	3
반복횟수	3	5		5	6	6	3	8	9	8	6	4
채취횟수당 평균 채취난자 (개)	6.3	5.8		5.2	4.2	3.3	5.7	3.3	3.6	2.9	2.5	2
채취 횟수당 평균 1및2등급 난자 (개)	2	3.8		2	1.7	1.7	2.7	2.3	2.4	1	1	1
월	한우 5535						한우 7682					
	2008			2009			2008			2009		
	10	11	12	1	2	3	10	11	12	1	2	3
반복횟수			4	8	6				4	8	8	6
채취횟수당 평균 채취난자 (개)			7	5.4	5				3.3	4.6	5.9	4.8
채취 횟수당 평균 1및2등급 난자 (개)			5	2.6	3.2				0.8	0.8	0.6	0.7
월	한우 8322						한우 5535					
	2008			2009			2008			2009		
	10	11	12	1	2	3	10	11	12	1	2	3
반복횟수			4	7	8	6			4	8	8	6
채취횟수당 평균 채취난자 (개)			6	7.9	5.1	5.5			4	2.9	2.8	3.7
채취 횟수당 평균 1및2등급 난자 (개)			2.8	4.7	2.8	3.3			2	2	1.4	3.2

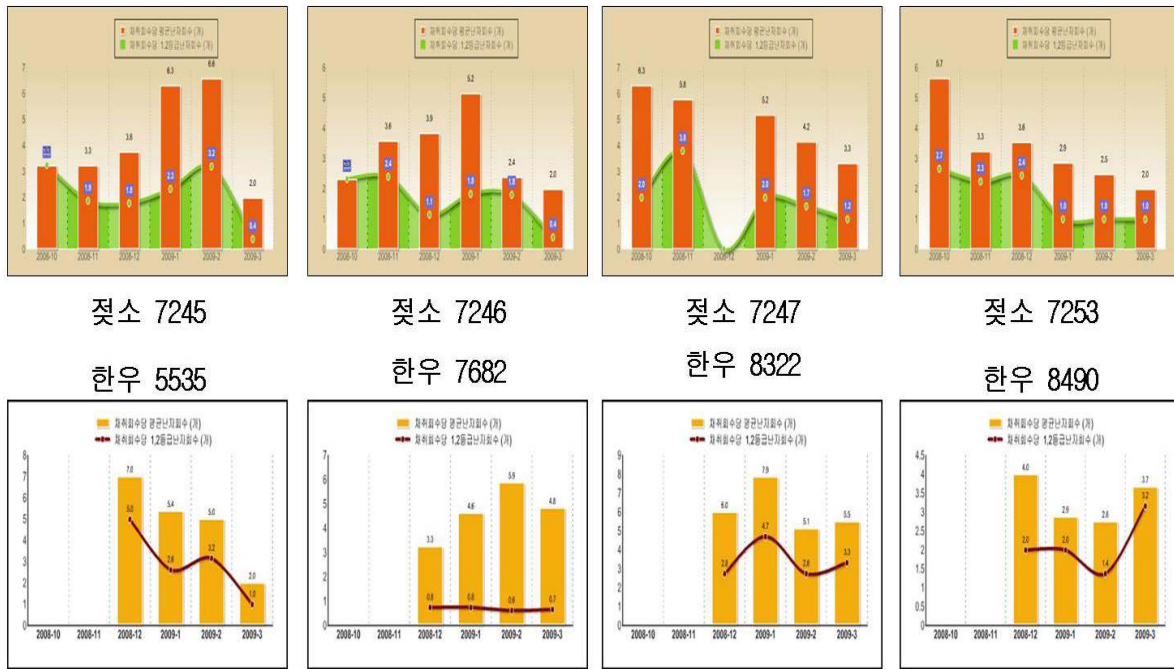


그림13. 각 개체별 월별 체내난자 채취대비 1,2 등급 평균 회수난자.

○ 체내유래 수정란의 생산과 체내 및 체외유래 수정란의 생산효율 연구 (유전자 발현의 차이점 규명하여 최적의 수정란 질적평가 기준 확립)

수정란은 다양한 배양액에 배양되어지며 또한 배양기간이 길기 때문에 많은 요인이 수정란 생산에 작용된다. 또한 체내난자의 경우 회수되는 난자의 개수 또한 제한적이기 때문에 최적의 배양조건 확립과 수정란이 생존할 수 있는 유전자의 발현 또한 중요하다. 따라서 본 연구에서는 OPU유래 체내난자에서 생산된 수정란과 도축장 유래 수정란에서의 유전자 발현 차이를 조사 하고 이를 수정란의 질적 평가에 반영하고자 한다. 따라서 다음과 같이 4개의 후보 유전자를 선택하였다. 1) Midkine (MK)은 pleiotrophin (PTN)과 함께 새로운 heparin-binding growth/differentiation factors의 멤버로 알려져 있으며, 소 난포액에 125 ng/ml로 다량 존재하고 있다. Muramatsu 등(1993)에 따르면 mammals에서 neurite outgrowth activity와 같은 성장과 분화에 매우 다양한 기능들에 관여한다고 보고되어졌고, Karino 등(1995), Minegishi 등(1996) 보고에 따르면 MK는 gonadotropin의 조절 하에서 granulosa cell로부터 생산되어진다고 알려졌다. 또한 Shuntaro 등(2000) 연구보고에 따르면 MK가 체외배양 시에 10 ng/ml 이상 처리하였을 때 대조군과 비교하였을 때 난자의 난할율과 배반포 생산율이 증가된다는 보고도 있다. 그러므로 bovine 난자배양 시 MK와의 공배양은 체외성숙 및 체외발달에 긍정적인 효과를 줄 것으로 판단된다. 2) Gremlin1 은 DNA family proteins의 멤버로써 GREM1은 대단히 잘 보존되어지고 분비되어지는 단백질로 bone morphogenetic proteins(BMPs)의 활성화에 반대되는 작용에 의해 성장, 분화와 발달의 다른 과정에서 중추적인 기능을 수행한다. GREM1은 많은 carcinomas에 stromal cells에서 발현이 되지만 정상조직에선 발현되지 않는다. 그리고

cancer cell 생존을 위한 최적의 미세환경을 제공한다. 그리고 GREM1과 FGF2는 human fetal skin feeder에 의해 분비되는 주된 구성요소들으로써 이는 human embryonic stem cell을 유지해주는 역할을 한다. 또한 GREM1은 mouse와 bovine의 aortic endothelial cell에서 내피 유사분열 활성화 시에 나타난다. 3) Pentraxin 3 (PTX3)는 전형적인 long pentraxin으로 female 수정능력과 선별되어진 병원균들에 대항하는 본질적인 자가 면역에 관여하는 역할을 한다. PTX3는 마우스에선 난구세포가 팽창하는 동안 난구세포에서 생산이 되어지고 그 지질에 존재한다. 최근에 PTX는 conserved protein으로 주기적인 다중결합구조에 의해서 그 특징이 구분되어진다고 발견되었으며, pentraxins은 C-terminal pentraxin domain과 연결되어지고 그들의 유전적 구조, 염색체 위치, 세포의 종류와 유도되어진 자극, 리간들에서도 그 차이가 난다. PTX3는 lipopolysaccharide, interleukin 1, tumor necrosis factor α 와 같은 초기 염증성의 중개자들과 같은 자극에 대한 조직이나 다른 세포들과 macrophage에서 10~20 subunit를 가지는 multimer 단백질이다. 4) Prostaglandin endoperoxide synthase 2 (COX-2)는 소, 쥐, 말등 많은 종에서 COX-2 유전자 및 단백질은 배란직전의 mural granulose cells 에서 발현되며, COX-2의 발현에 의해 granulosa 세포를 난구세포로 분화하는데 결정적인 역할을 한다. 이러한 요인들은 결국 gonadotropin에 의해 유도되며, 높은 COX-2의 발현은 결국 난포 내의 prostaglandins (PGE2 와 PGF2a)의 농도를 끌어 올려 난포를 파열시키고 배란을 유도하는 역할을 한다. 또한, 많은 연구자들은 COX-2는 난구세포에서도 발현됨을 확인하였고, 이를 난자의 성숙에 관여하는지를 조사한 결과 COX-2의 유전자가 제거된 마우스의 경우 난자의 성숙이 미약함을 보고한 결과도 있다. 이러한 요인들은 난구세포에서 COX-2의 유전자가 prostaglandins을 생산하는 역할에 관여하며, 난자의 성숙에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 수정란 배양과정중 변화되는 Midkine, Gremlin1, Pentraxin 3 및 COX-2의 유전자 발현을 조사하고자 하며 현재 sampling 중이다.

[제2세부과제] 개체선발과 수정란인식체계 구축

○ 경제형질의 유전력 기준으로 공란우 선발기준 확립

경상남도 김해축협산하 고등등록우 중 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대로 선발기준 확립

- 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대로 선발기준 확립
- 선발기준에 적합한 공란우 개체 후보 선발

○ 개체별 수정란인식 및 증명서 발급기준 확립

- 제1세부과제에서 선발한 수소 2두와 암소 5두에 대해 한우 생산이력제 DNA 검사에 사용되는 초위성체(Microsatellite, MS)마커와 2쌍의 성감별용 마커를 사용하여 유전자지문검사를 실시해 한우 고급육생산을 위한 개체식별용 DNA 검사를 실시하여 개체별 수정란 인식 마커를 제작하고 산자 생산시 제작된 마커를 이용하여 DNA 검사후 증명서 발급이 필요하다. 표 1은 본 연구에서 개체식별을 위해 사용된 초위성체(Microsatellite, MS)마커와 성감별용 마커의 종류를 나타내었다.

표 1. 초위성체(Microsatellite, MS) 마커 및 성 감별용 마커 리스트

MS name	Label	Size (bp)	비 고
TGLA227	B(FAM)	76 ~ 104	
BM2113	B(FAM)	123 ~ 143	
TGLA53	B(FAM)	154 ~ 188	
ETH10	B(FAM)	212 ~ 224	
SPS115	B(FAM)	246 ~ 260	
TGLA126	G(VIC)	116 ~ 122	
TGLA122	G(VIC)	137 ~ 181	
INRA23	G(VIC)	196 ~ 222	
ETH3	Y(NED)	105 ~ 125	
ETH225	Y(NED)	141 ~ 159	
BM1824	Y(NED)	178 ~ 192	
BOV_X	R(PET)	118	
BOV_Y	R(PET)	242	

- 수소의 경우 정액을 이용하여 Genomic DNA를 추출하였으며 암소의 경우 모근을 이용하여 Genomic DNA를 추출하여 11종의 초위성체(Microsatellite, MS)마커와 2쌍의 성감별용 마커를 이용하여 Multiplex PCR 방법을 이용해 한번에 대립유전자형을 증폭하여 염기서열 분석

장치 (ABI3130xl)를 이용하여 대립유전자형 분석을 위한 전기영동을 실시하였으며, 분석된 대립유전자형은 GeneMapper v4.0 프로그램을 이용하여 Allelic Ladder를 적용해 데이터를 보정하여 표준화 데이터 생성하였다 (표 2, 3). KPN 538의 경우 수정란의 체외발달에 있어 타 정액에 비해 낮은 배발달율을 보여 KPN 538은 수정란 생산시 사용이 적합하지 않은 것으로 판단된다. 또한 상기 언급한 KPN 642, 641 및 507을 이용하여 수정란 생산시 사용하고자 하며, 현재 KPN 641 및 507의 경우는 현재 분석중에 있다.

표 2. 수소(보증종모우) 대립유전자형 분석결과(디지털데이터)

개체 번호	BM 1824	BM 2113	ETH10	ETH22 5	ETH3	INRA2 3	SPS115	TGLA 122	TGLA 126	TGLA 227	TGLA 53	BOV _X	BOV _Y
KPN5 38	12 13	19 21	19 20	23 23	23 26	22 24	21 21	24 30	17 17	20 22	19 21	X	Y
KPN6 42	13 14	19 21	19 22	23 25	26 26	20 24	25 25	30 30	17 18	14 21	31 33	X	Y
KPN6 41	13 14	15 21	19 20	23 23	22 23	17 21	21 25	29 30	17 22	15 20	27 28	X	Y

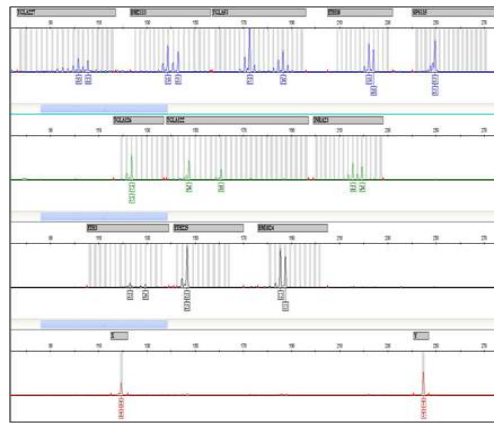


그림 1. 수소(KPN 538, 보증종모우) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터)

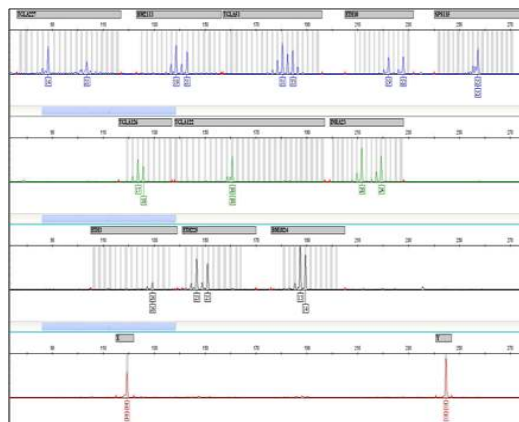


그림 2. 수소(KPN 642, 보증종모우) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터)

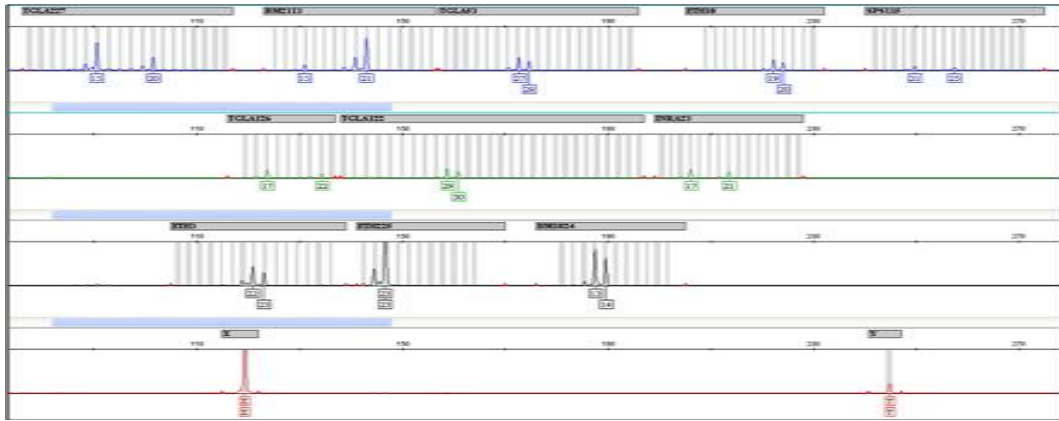


그림 3. 수소(KPN 641, 보증중모우) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터)

표 3. 암소 대립유전자형 분석결과(디지털데이터)

개체 번호	BM 1824	BM 2113	ETH10	ETH225	ETH3	INRA23	SPS115	TGLA 122	TGLA 126	TGLA 227	TGLA 53	BOV_ X	BOV_ Y
8661	13 14	19 20	18 19	23 25	23 24	18 20	25 25	29 40	17 20	22 26	27 34	X	-
7682	14 14	15 19	18 18	23 26	23 23	17 20	23 25	21 26	17 20	19 22	28 35	X	-
5535	13 14	19 21	16 19	23 25	23 26	20 20	25 25	21 25	17 17	19 22	33 34	X	-
8490	13 14	20 20	19 22	23 25	24 27	20 20	21 25	24 29	17 20	19 20	25 34	X	-
8322	13 17	20 21	19 22	23 24	24 26	20 24	25 25	21 43	17 21	20 21	27 34	X	-

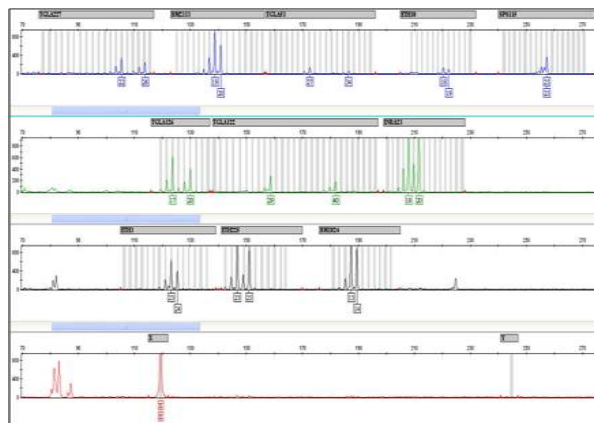


그림 3. 암소(8661) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

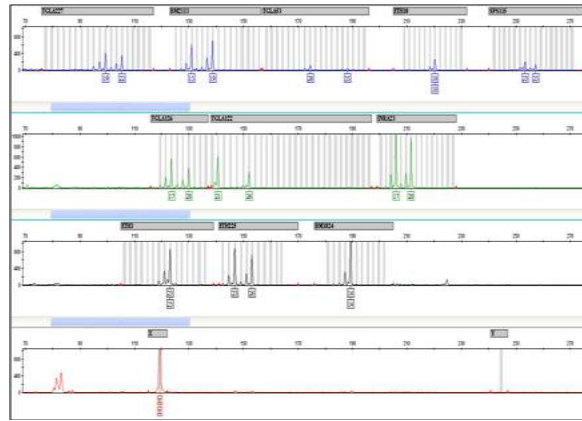


그림 4. 암소(7682) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

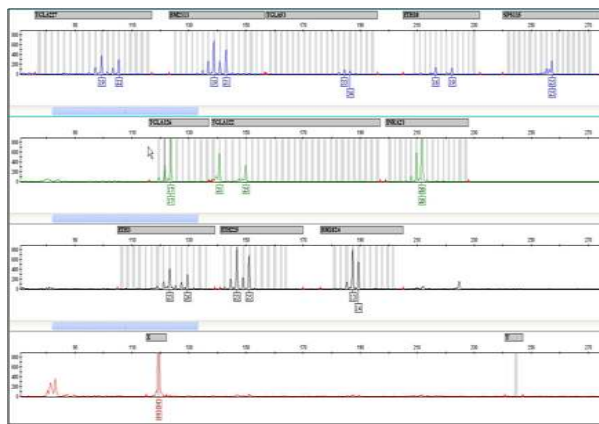


그림 5. 암소(5535) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

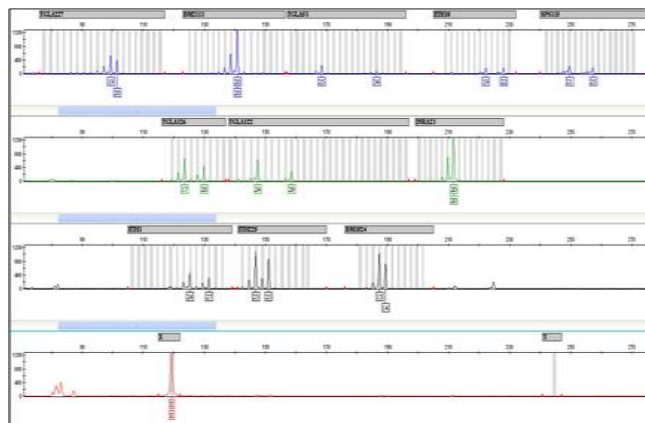


그림 6. 암소(8490) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

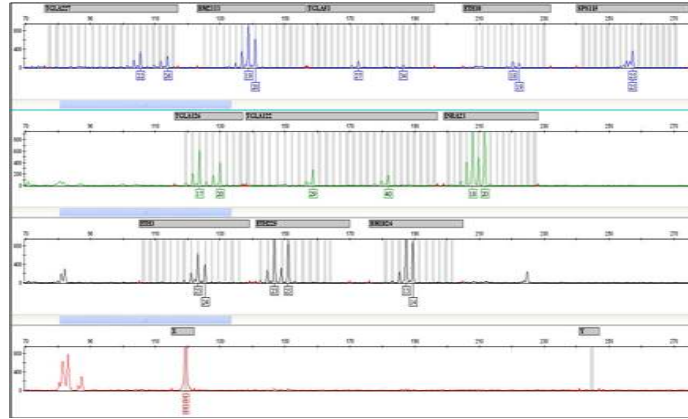


그림 7. 암소(8322) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

표 3에서 보듯이 현재 난자 채취용 공란우의 경우 모두 고유의 유전자 마커를 조사하였고 개체번호 8661의 경우 비록 고등 등록우일지라도 채취된 난자의 등급이 월등히 떨어져 교체하였다. 따라서 한우 고급육 대량생산에 활용될 F0의 대립유전자형을 기초로 추후 생산될 F1의 친자감별을 통해 고급육 생산에 사용된 정액과 수정란을 과학적 검증 기법으로 검증하여 수정란 이식시 발생할 수 있는 문제점을 차단해 농가에 대한 신뢰 구축 및 고급육 생산에 활용한다면 축산 농가 소득 증가에 도움이 될 것으로 사료된다.

○ 제1세부과제에서 1차 선발된 공란우중에서 경제형질의 유전력 기준으로 최종 공란우 선정

현재 활용되고 있는 공란우는 5두 중에서 채취 불가능한 1두를 제외한 4두 (관리번호: 5535, 7682, 8322, 8490)를 활용하고 있다 (그림1). 이들의 선발을 위해서 공란우는 고등등록우로서 정상적인 번식능력을 가지고 있으면서 특히 감염성 질병이 없으며 번식기관의 능력에 문제가 없는 개체를 선발 활용하고자 10두를 선정하고 항시 5두를 OPU 작업에 활용하고 있다. 이들의 선정은 실제 이식 후 산자의 생산하였을 때 고능력, 고급육을 생산할 수 있는 후보축이어야 하는 관계로 매우 엄격한 기준에 의해 협동연구기관인 김해축협에서 확보하고 있는 자료, 즉 후대검증 자료로서 비육 출하성적이 A1++ 성적을 얻은 경험이 있는 고등등록우를 최종 선발하였다. 그러나 아무리 좋은 개체일지라도 OPU 채취과정에서의 문제점, 난자의 회수 숫자, 수정란 생산에 활용할 수 있는 1,2등급의 난자 수, 체외수정란의 생산효율 등을 점검하여 그 효율을 비교분석하여 최종적으로 5두를 확보하여 활용하고 있으며 비교분석하고 있다.

본 연구에서 특히 7682번의 경우는 고등등록우가 아니지만 육량이 아주 우수한 특성을 가지고 있는 개체로서 협동연구기관에서 적극적으로 추천하여 공란우로 활용하고 있다 (체중 : 730kg, 체고 : 148 ,체장 : 170, 흉위 : 213). 또한 본 연구과제의 초기에 채란기술의 습득과 숙련을 위해서 젖소 미경산우 4두 (7245, 7246, 7247, 7253)를 활용한 훈련을 실시하였다. 또한

이들 젖소 미경산우들은 한우와 공히 질병감염 등을 조사하여 선발하였으나, 능력을 전혀 고려하지 않고 선발하였다.

○ Data Base구축으로 조기선발체계 구축

고등등록우의 경우 후대에 1등급 한우를 생산할 수 있는 기초 유전자를 가진 한우이다. 이러한 고등등록우를 조기에 발굴 선발하여 지속적으로 관리하는 시스템을 갖춘다면 축산농가 뿐만 아니라 국가적으로도 큰 이점이 있을 것으로 판단된다. 따라서 지속적으로 고등등록우의 조기발굴에 노력해야 할 것이며, 발굴된 고등등록우를 상기 사용된 초위성체(Microsatellite, MS) 마커를 이용해 대립유전자형을 분석하여 D/B 구축하여 지속적으로 관리하는 시스템을 구축하고자 한다. 또한, 발굴된 고등등록우를 이용하여 OPU유래 체내난자를 회수하여 수정란 생산 시 상기 유전자 마커를 활용하여 개체 추적 시스템을 구축할 수 있다.

[제3세부과제] 체내유래 수정란이식효율 향상기술 개발 (김해축협)

○초음파 및 직장 촉진법 등을 이용한 난소와 자궁 상태별 이식시기 규명

수정란이식을 위한 수란우의준비는 매우 철저하게 실시하였다. 즉 발정확인 2일째에 배란 확인, 이식 전날 황체확인 후 수정란이식을 위한 수란우로 선발하여 이식을 실시하였다. 즉, 발정 확인뿐만 아니라 배란확인, 황체형성 등을 확인 후 최종적으로 수란우로 선발 활용함으로써 수태율을 향상시키기 위한 최선의 방법을 찾고자 노력하였다.

이러한 과정에서 황체형성이 부족하거나 난소 및 자궁의 상태가 건강하지 못하면 이식을 포기하여 이식 전날 수정란을 주문하지 않고 동결 보존하는 방법으로 귀중한 수정란을 비축 및 활용도를 높이는 방법을 구사하였다. 이러한 이식체계의 구축은 매우 효과적이고 수태율 향상시킬 수 있는 방법이다. 왜냐하면 난소, 자궁 등의 번식기계의 상태를 사전에 충분히 점검할 수 있는 시간적이 여유를 가질 수 있음으로써 수태 가능한 개체만을 선발하여 이식에 활용하고자 노력하였다.

이러한 개념의 연구방향은 이식두수를 얻기 위한 것보다 최종적으로 산자 생산율을 높이고, 궁극적으로 농민들로부터의 호응을 얻을 수 있는 방향으로 본 연구를 추진하였다. 그리하여 본 연구과제가 종료되었을 시 협동연구기관의 농민들로부터 산업화를 위한 지속사업으로 발전시킬 필요가 있기 때문이다.

표 1. 발정동기화에 의한 대리모 선발율

처리 방법	두수	비고
처리두수	72	
배란확인 두수	66	발정발현 2일째 확인
황체형성 확인 두수	62	발정발현 6일째 확인
황체형성 부적합 두수	4	
이식 가능 두수	61	발정발현 7일째 이식함

○발정동기화 및 자연발정우 등을 이용한 수정란이식 후 수태율 비교분석

OPU유래 체내수정란의 생산 일정이 매주 2회씩 수, 토요일에 공급이 확정됨으로써 자연발정우를 활용하는 것이 어렵고 의미가 없는 것으로 판단되어 일율적으로 발정동기화를 유도하여 수란우를 확보하는 것으로 결정되었다. 그리하여 본 연구에 활용된 발정동기화방법으로 동기화

를 유도하여 수란우를 확보하여 이식에 활용하였다. OPU유래 체내수정란의 생산기술은 OPU 유래 난자를 활용한 체내수정란 생산, 대리모의 발정동기화, 수정란이식까지 여러 단계로 나눌 수 있는데 이중 수정란의 생산일과 수란우의 발정동기화를 통한 유도발정일이 같아야만 높은 수태율로 이어질 수 있을 것이다. 따라서 발정동기화 또한 체내수정란 생산을 통한 고능력우의 생산기법에서 중요한 역할을 함으로 기존의 확립된 발정동기화법을 활용하였다. 즉, 300 ug/ml GnRH + 1 mg/ml PGF2a + 300 ug/ml GnRH를 처리하여 발정동기화를 유도하였다.

○체내유래 수정란의 이식시기별 수태율 조사

위에서와 같이 매주 수, 토요일에 OPU유래 체내수정란이 공급됨으로써 발정동기화에 의한 수정란이식을 실시함으로써 Day 7일째에 이식을 함으로써 이식시기별 수태율의 비교는 수행하지 못하였다. 가장 효율적이고 우수한 질적 수준이 day 7일째에 이식함으로써 이식시기별 수태율의 비교는 수행하지 않았음.

그러나 현재까지 총 53두의 이식을 실시하였고, 임신감정 한 36두에서 22두가 임신이 확인되어 61.1% 임신율을 확인하였다. OPU유래 체내수정란의 이식을 위해서는 1개의 수정란만을 이식하여 임신유도를 실시하고 있음.

표2. 수정란이식 후 수태율에 관련된 데이터

개체번호	이식 두수	임신감정 (60일)
5535	6	2/3 (66.6%)
7682	7	3/6 (50.0%)
8322	30	14/20 (70.0%)
8490	10	3/7 (42.9%)
Total	53	22/36 (61.1%)

- * 수정란이식은 1두에 1개의 수정란을 이식하였음.
- * 발정발현 후 7일째 이식을 실시하였음.
- * 대리모의 황체형성 등의 판단에 의해 미흡할 때는 수정란을 동결보존 하였음.

○체내유래 수정란이식에 적합한 사육환경 개발과 수란우 상태별 수태율 조사

본 연구에 참여한 농가의 선발은 협동연구기관인 김해축협에서 기존의 한우 체외수정란의 이식에 대한 수태율의 농가별 자료에 근거하여 우수한 성적을 얻은 농가를 우선적으로 선발하여 수란우를 선정 이용하였다. 그리하여 사육환경이 매우 높은 농가를 활용할 수 있었으며 수란우의 상태별 수태율의 비교분석은 아직까지 정확한 데이터를 얻지 못하였음.

3. 2차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
지속적인 공란우 선발 이용	고등등록우로서 후대검증에 의한 A1++ 성적을 얻은 공란우를 우선적으로 선정하여 체형심사, 초음파검사, Body Score, 번식기 질병 감염 여부 및 예방접종 등에 문제가 없는 개체 5두를 최종적으로 공란우로 선정하고 본 연구실에서 채란하여 수정란을 생산하여 개체별로 효율을 조사하여 최종 4두를 2차 공란우로 선발하여 이용하였음.	김해축협 소속의 농가에서 사육중인 고등등록우 중에서 후대검증을 통해 자손의 비육 출하 성적이 A1++ 등급을 획득한 경험이 있는 암소를 최우선적으로 선발하였다. 또한 직장검사에 의한 난소, 자궁 등의 번식기계의 상태와 비만도를 체크할 수 있는 body score, 질병감염 등의 기록을 검토하여 최종선발 이용하였다. 이때 암소의 임신여부 등을 판단하여 5두를 선발하여 본 연구실에서 1주일에 2회씩 약 3~4회 채란을 하여 채취된 난자의 회수율과 난자등급을, 수정란 생산 개수 등을 비교분석하여 가장 효율이 낮은 개체 1두를 제외한 나머지 4두를 2차 공란우로 채택하였음.
생산된 1세대 암소로부터 공란우 조기선발 가능성 조사	세대간격을 줄여 개량효과의 극대화를 도모하기 위해 생산된 송아지를 조기 선발하여 공란우로의 활용가능성을 조사하고자 함.	생산된 송아지의 능력검증이 되지 않은 상태에서 공란우로 선발 활용에는 본 연구취지에 걸맞지 않은 것으로 판단된다. 특수목적, 즉 형질전환 복제동물 등의 개체의 경우에는 유전자 발현만으로 공란우로 선발 활용의 의미를 줄 수 있지만 고급육 대량생산에는 적합한 방법이 아니었다. 예비 연구 결과에서도 미경산우의 경우 난포발육의 정도가 경산우에 비해 숫자가 적어 난자생상효율이 저조하여 OPU유래 수정란의 생산목적에 송아지의 조기선발의 의미는 크지 않은 것으로 판단됨.
호르몬투여와 비 호르몬투여가 난자생산 효율 비교분석	OPU 유래 체내난자는 채취하는 기간에 따른 여러 가지 보고가 있다. 호르몬을 처리하여 약 1달에 2번 채란하는 방법과 1주에 2번씩 난자를 채취하는 방법이 있다. 이러한 방법들을 비교분석하여 가장 효율적으로 난자를 채취하여 수정란을 대량 생산할 수 있는 방법을 모색하고자 함.	호르몬처리에 의한 난자의 회수, 수정란의 생산 효율과 비호르몬 처리에 의한 난자의 회수, 수정란의 생산효율을 비교분석한 결과 호르몬 처리에 의해 난자의 생성은 많이 시킬 수 있었지만 채취하여 실제로 수정란을 생산하는 효율적인 측면에서는 호르몬처리를 한 것이 비효율적이었음. 그리하여 본 연구에서는 호르몬 처리방법을 포기하고 비 호르몬처리에 의한 1주에 2회 난자를 채란하는 방법을 활용하고 있음. 비호르몬처리에 의한 난자의 채취는 회당 약 5.5개 정도의 난자를 회수하고 그 중 1,2등

		<p>급의 난자는 3.8개 정도이며 이들을 체외성숙, 수정 및 배발달을 유도하면 약 1.88개 배반포기 배를 생산할 수 있으며, 우수한 개체의 것은 1회 채취당 평균 약 2개의 이식 가능한 수정란을 생산 할 수 있음. 이러한 결과는 연간 약 200개의 배반포기를 생산 할 수 있을 것으로 판단됨.</p>
<p>체내유래 수정란 대량생산 체계 개발</p>	<p>OPU에 활용되는 공란우의 선정시 가장 효율적으로 수정란을 생산하기 위해서 1주에 2회 채취를 지속적으로 하였을때 효율적으로 채취가 가능한 기간을 조사하였으며, 개체별로의 효율을 비교분석하여 공란우의 선정 시 고려해야 할 사항을 정립하여 공란우 선정체계를 구축하고자 하였음. OPU유래 체내난자는 개체별로 채취할 수 있는 난자의 수가 극히 제한적이기 때문에 기존의 배양방법을 그대로 준용하는 데는 한계점이 있음. 이러한 난제를 해결하기 위하여 group 배양체계를 개발하였음. 또한 새로운 Dish를 이용하여 1개의 drop에 4마리의 공란우를 같이 배양하는 방법과 이전의 방법을 비교분석하여 효율적인 방법을 채택하고자 하였음.</p>	<p>OPU 방법을 이용하여 1주일에 2회 공란우에서 난자를 채취 후 수정란을 생산하는 과정을 6개월간 지속하여 난자의 회수율과 난자등급, 수정란의 생산 효율을 조사하였다. 3개월까지 지속적으로 난자채취 후 수정란 생산효율이 유지 되었으며 4개월째부터 효율이 떨어지는 것을 보아 3개월 활용 후 교체해야 할 것으로 판단되었다. 개체별 효율 또한 월등한 차이를 보여주는 개체들이 있었으며 채취되는 난자의 수가 많은 개체에서 대체적으로 수정란 또한 대량으로 생산되는 것을 알 있었으며 공란우 선정 시 고려해야 할 사항으로 판단되었다. OPU 유래 체내난자는 생축을 활용하여 채취할 수 있어서 난자의 회수는 극히 소량이며 과거 연구 결과 극히 낮은 배발달을 보고 되었다. 따라서 선행결과를 이용하여 배양체계를 개발하기 위해서 50 ul 배양액에 각각 난자를 5, 10, 15개씩 배양하였을 때 15개의 난자를 배양한 처리구에서 높은 배반포 발달율을 보였다. 새로운 Dish 를 이용하여 배양시 1개 drop에 4마리의 공란우를 같이 배양할 수 있어서 15개이상의 난자를 개체별로 구별한 상태에서 배양할 수 있었으며 높은 배반포 발달율을 보였다.</p>
<p>체내유래 수정란의 품질향상 연구</p>	<p>체내난자의 경우 회수되는 난자의 개수 또한 제한적이기 때문에 최적의 배양조건 확립과 수정란이 생존할 수 있는 유전자의 발현 또한 중요하다. 따라서 본 연구에서는 OPU유래 체내난자에서 생산된 수정란과 도축장 유</p>	<p>체내에서 채취된 난자를 3가지 방법으로 배양 후 비교분석 하였다. 채취된 난자만을 배양하였음(cOPU), Agar chip을 이용하여 배양하였음(aOPU). 그리고 채취된 난자를 10개씩 그룹으로 배양하였음(IVP). 이들 방법을 비교분석한 결과 배발달율에서 채취된 난자만을 배양한 것이 현저히 낮았으며 수정란의 질적 평가를 위해 세포 수를 측정된 결과 또한 적은 수치를 보였다. 본 연구에서는 실시간 정량적 중</p>

	<p>래 수정란 생산효율을 비교하고 이들 수정란에서의 유전자 발현 차이를 조사하고 이를 수정란의 질적평가에 반영하고자 조사하였음. 체내난자의 여러가지 배양기술을 통해 생성된 수정란의 질적평가를 하였음. 여러 배양기술을 통해 생성되는 수정란을 이용하여 유전자 발현 패턴을 확인 조사하였음.</p>	<p>합효소연쇄반응을 통하여 sIVP, cOPU 그리고 aOPU 배양시스템으로부터 8일째 회수한 수정란에서 미지의 유전자 발현 패턴을 확인하였으며 분석하였다. cOPU유래 수정란에서의 생물학적 중요한 유전자 CD9, AKR1B1, TXN, PLAC8 들은 비슷하게 발현이 되고, aOPU 유래 수정란에서는 PGSH2 유전발현이 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Agar chip 배양에서 drop당 10개 정도의 수정란을 맞추어 주는 것이 수정란의 체외발달능력을 높일 수 있는 방법이었다는 것을 증명하였다.</p>
<p>체내유래 수정란의 동결방법 연구</p>	<p>본 연구실에서는 유리화동결보존기술(Vitrification method)을 이용하여 수정란을 동결, 용해 후에 생존율을 조사하였음. 수정란을 동결시에 포배강에 의한 결정형성으로 인해 손상을 줄이기 위해서 동결하는 과정에서 미세조작으로 수정란에 구멍을 뚫어 포배강의 액을 제거한 후에 동결, 용해 후 생존율을 비교분석 하였음.</p>	<p>현재 본 연구실에서 개발한 수정란의 동결보존기술은 유리화동결보존기술(Vitrification method)로서 94.3%생존율을 얻고 있다. 동결보존을 위해 미세조작으로 수정란 내의 수분을 최소한으로 줄이는 과정을 거치면서 동결보존 후 생존율을 향상시킬 수 있었다. 동결을 할 때에 AS가 수정란의 생존율과 해칭율에 미치는 영향에 대해 조사하였다. Punctued group은 Holding media에서 평형을 하기 전 미리 micro-manipulater 를 이용하여 Puncture 를 하여 수정란 내 수분을 제거하였다. 결과는 생존율에서 Puncture group의 유의적 효율이 인정이 되었고 해칭율을 비교해볼 때 고도의 유의적 차이가 있었다.</p>
<p>개체별 인식기준 설정</p>	<p>생산이력제에 활용되는 초위성체(Microsatellite, MS) 마커를 이용해 DNA 분석</p>	<p>수정란을 만들기 위해 사용된 종모축과 공란우의 대립유전자형 분석</p>
<p>수정란별 증명서 발급</p>	<p>생산이력제에 활용되는 초위성체(Microsatellite, MS) 마커를 이용해 DNA 분석을 통해 얻은 대립유전자형을 기준으로 증명서 발급</p>	<p>수정란 생산을 위해 사용된 종모축과 공란우의 대립유전자형을 증명서에 삽입하여 증명서 발급</p>
<p>생산된 암송아지에서 조기 공란우 후보축 선발</p>	<p>생산된 1세대 암소의 모근 및 혈액으로부터 DNA를 추출하고 13종의 DNA 마커세트를 이용한 유전자 지문검</p>	<p>생산된 1세대 암소의 모근 및 혈액으로부터 DNA를 추출하고 13종의 DNA 마커를 이용해 유전자 지문검사를 실시 후 부모로 이용된 개체의 유전자 지문과 비교해 혈통 검증 실시 후</p>

	사 후 부모로 이용된 개체의 유전자 지문과 비교해 혈통 검증 실시 후 우수 형질 개체 선발	부의 표현형(일당증체량과 등지방두께, 등심단면적, 근내지방도)과 모의 수정율, 배발달율 및 동결보존 능력 등을 종합 고려해 우수한 공란우 조기선발 가능성을 조사
유산예방 등 임신유지 위한 사육환경 연구	OPU 유래 체외수정란을 이식 후 유산을 방지하기 위한 환경적인 방법을 모색하고자 함	수정란 이식을 할 경우 일반적인 인공수정보다 수태 후 유산확률이 높은 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 유산을 방지하기 위한 방법을 조사 연구하였음. 감염성 유산에 대한 질병관리를 위하여 예방약 접종, 수정란이식기술, 위생관리수준 향상, 질병 발병 시 신속한 조치 및 치료 등에 대해 조사하였음.
호르몬투여 사료보조제 투여 등 임신유지 방안 연구	OPU 유래 체외수정란의 이식 전에 사료보조제를 첨가하여 임신유지율을 비교 분석하고자 함.	본 연구를 위해 이식 전에 사료보조제를 2개월동안 미리 사료와 함께 급여하였음. 수정란 이식 시 수태율과 감정 이후 임신유지에 효과가 보고된 사료보조제를 이식 전에 2개월간 미리 사료와 함께 섭취 후 수태율의 향상과 임신유지에 관하여 조사하였음
1세대 산자의 사육환경 조성	생산된 송아지를 폐사시키지 않고 최대한 건강하게 사육하고자 분만관리 및 송아지 사육관리레 최적의 환경을 제공하고자 함.	송아지에서 가장 관리가 어려운 것이 설사라 판단되어 분만 후 1시간 이내에 초유를 급여하였다. 또한 분만실 바닥에 보일러 시설을 갖추어 체온유지 뿐만 아니라 송아지의 배를 따뜻하게 유지할 수 있음으로서 설사예방에 만족스러운 결과를 얻었다. 이러한 시스템에서 바닥에 깔짚 등을 항상 건조한 상태로 유지하여 다양한 질병예방에 적합한 사육환경을 제공할 수 있었다.

4. 2차년도 세부연구수행 결과

[제1세부과제] 체내유래 수정란 생산체계 확립

○ 지속적인 공란우 선발 이용

2차년도에 활용되고 있는 공란우는 5두 중에서 수정란 생산 효율이 현저히 낮은 1두를 제외한 4두 (바코드번호: 000167895860, 000174162009, 000176144553, 000188851661)를 활용하였다 (그림 1). 이들의 선발을 위해서 공란우는 고등등록우로서 정상적인 번식능력을 가지고 있으면서 특히 감염성 질병이 없으며 번식기관의 능력에 문제가 없는 개체를 선발 활용하고자 5두를 선정하고 항시 4두를 OPU 작업에 활용하고 있다. 이들의 선정은 실제 이식 후 산자의 생산하였을 때 고능력, 고급육을 생산할 수 있는 후보축이어야 하는 관계로 매우 엄격한 기준에 의해 협동연구기관인 김해축협에서 확보하고 있는 자료, 즉 후대검증 자료로서 비육 출하성적이 A1++ 성적을 얻은 경험이 있는 고등등록우를 최종 5두를 선발하였다. 그러나 아무리 좋은 개체일지라도 OPU 채란, 수정란 생산과정에서의 개체별로 차이가 있기 때문에 1주일에 2회 채란하는 방법으로 약 3~4회 난자를 채취하여 OPU 채취과정에서의 문제점, 난자의 회수 숫자, 수정란 생산에 활용할 수 있는 1,2등급의 난자 수, 체외수정란의 생산효율 등을 점검하여 그 효율을 비교분석하여 가장 효율이 낮은 개체 1두를 제외하고 나머지 4두를 최종적으로 확보하여 활용하고 있으며 비교분석하고 있다.

등록번호	등록구분	생년월일	명호(이름)	비코드	성명	등록일	등록번호	등록구분	생년월일	명호(이름)	비코드	성명	등록일																																																																						
221529128	고등	2001-11-14	차철01-03-0059	000167895860	임컷	2001-12-31	221892944	고등	2004-05-22	성주04-02-6200	000174162009	임컷	2004-08-11																																																																						
<table border="1"> <thead> <tr> <th>정액번호 / 명호</th><th>생년월일</th><th>비코드</th><th>등록구분</th><th>등록번호</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>조부 KPN109</td><td>1988-05-11</td><td></td><td>협통</td><td>221024866</td></tr> <tr> <td>부 KPN279</td><td>1995-04-28</td><td>000150168980</td><td>고등</td><td>221175013</td></tr> <tr> <td>조모 금남91-165</td><td>1969-06-30</td><td></td><td>기초</td><td>211223520</td></tr> <tr> <td>외조부 KPN102</td><td>1986-08-20</td><td></td><td>기초</td><td>211148348</td></tr> <tr> <td>모 차철98-02-0044</td><td>1998-06-17</td><td>000143504860</td><td>고등</td><td>221352480</td></tr> <tr> <td>외조모 산철 1 911-091</td><td>1991-07-15</td><td></td><td>고등</td><td>221065192</td></tr> </tbody> </table>							정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호	조부 KPN109	1988-05-11		협통	221024866	부 KPN279	1995-04-28	000150168980	고등	221175013	조모 금남91-165	1969-06-30		기초	211223520	외조부 KPN102	1986-08-20		기초	211148348	모 차철98-02-0044	1998-06-17	000143504860	고등	221352480	외조모 산철 1 911-091	1991-07-15		고등	221065192	<table border="1"> <thead> <tr> <th>정액번호 / 명호</th><th>생년월일</th><th>비코드</th><th>등록구분</th><th>등록번호</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>조부 KPN122</td><td>1988-10-24</td><td>000150167601</td><td>고등</td><td>221027250</td></tr> <tr> <td>부 KPN289</td><td>1995-11-03</td><td>000150169087</td><td>고등</td><td>221243618</td></tr> <tr> <td>조모 0-6</td><td>1990-05-28</td><td></td><td>협통</td><td>221036649</td></tr> <tr> <td>외조부 KPN123</td><td>1988-09-13</td><td>000150167619</td><td>기초</td><td>211200750</td></tr> <tr> <td>모 용암95-01-0039</td><td>1995-05-15</td><td>000131607379</td><td>고등</td><td>221180056</td></tr> <tr> <td>외조모 용암92-0257</td><td>1986-06-30</td><td></td><td>기초</td><td>211230251</td></tr> </tbody> </table>							정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호	조부 KPN122	1988-10-24	000150167601	고등	221027250	부 KPN289	1995-11-03	000150169087	고등	221243618	조모 0-6	1990-05-28		협통	221036649	외조부 KPN123	1988-09-13	000150167619	기초	211200750	모 용암95-01-0039	1995-05-15	000131607379	고등	221180056	외조모 용암92-0257	1986-06-30		기초	211230251
정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호																																																																															
조부 KPN109	1988-05-11		협통	221024866																																																																															
부 KPN279	1995-04-28	000150168980	고등	221175013																																																																															
조모 금남91-165	1969-06-30		기초	211223520																																																																															
외조부 KPN102	1986-08-20		기초	211148348																																																																															
모 차철98-02-0044	1998-06-17	000143504860	고등	221352480																																																																															
외조모 산철 1 911-091	1991-07-15		고등	221065192																																																																															
정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호																																																																															
조부 KPN122	1988-10-24	000150167601	고등	221027250																																																																															
부 KPN289	1995-11-03	000150169087	고등	221243618																																																																															
조모 0-6	1990-05-28		협통	221036649																																																																															
외조부 KPN123	1988-09-13	000150167619	기초	211200750																																																																															
모 용암95-01-0039	1995-05-15	000131607379	고등	221180056																																																																															
외조모 용암92-0257	1986-06-30		기초	211230251																																																																															
변식자 성명	이태우	변식자 주소	경남 산청군 차철면 상법리				변식자 성명	신용철	변식자 주소	경북 성주군 용암면 계상리																																																																									
소유자 성명	이태우	소유자 주소	경남 산청군 차철면 상법리				소유자 성명	신삼철	소유자 주소	경북 성주군 용암면 상연2리 619-25																																																																									
특징	모색	면선	미선	배선	불	기타	특징	모색	면선	미선	배선	불	기타																																																																						
	황	중	결	결	상황			황	중	결	전	상황																																																																							
부위	체중	체고	상지 부고	체장	흉심	흉폭	고장	요리폭	곤폭	좌골폭	흉위	전관위	체적 년월일																																																																						
체력치	124	126	142	65	40	51	43	41	25	173			2004-09-12																																																																						
심사 항목	체적 균형	지질 품위	머리 폭	전구	중구	후구 엉덩이	넓적다리	유기 성기	지체 보양	점수	심사 년월일																																																																								
값출	23	22	24	22	22	24	24	22	23	77.2	2004-08-12																																																																								
등록번호	등록구분	생년월일	명호(이름)	비코드	성명	등록일	등록번호	등록구분	생년월일	명호(이름)	비코드	성명	등록일																																																																						
221707693	고등	2003-03-23	황남01-01-0387	000176144553	임컷	2003-07-15	223193943	고등	2005-12-02	삼척05-01-1152	000188851661	임컷	2006-03-08																																																																						
<table border="1"> <thead> <tr> <th>정액번호 / 명호</th><th>생년월일</th><th>비코드</th><th>등록구분</th><th>등록번호</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>조부 KPN123</td><td>1988-09-13</td><td>000150167619</td><td>기초</td><td>211200750</td></tr> <tr> <td>부 KPN333</td><td>1997-03-02</td><td>000140404633</td><td>고등</td><td>221292432</td></tr> <tr> <td>조모 022090-202</td><td>1990-09-08</td><td></td><td>고등</td><td>221045406</td></tr> <tr> <td>외조부</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>모 황남99-00-0022</td><td>1995-06-30</td><td>000130455943</td><td>기초</td><td>211379172</td></tr> <tr> <td>외조모</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>							정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호	조부 KPN123	1988-09-13	000150167619	기초	211200750	부 KPN333	1997-03-02	000140404633	고등	221292432	조모 022090-202	1990-09-08		고등	221045406	외조부					모 황남99-00-0022	1995-06-30	000130455943	기초	211379172	외조모					<table border="1"> <thead> <tr> <th>정액번호 / 명호</th><th>생년월일</th><th>비코드</th><th>등록구분</th><th>등록번호</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>조부 KPN219</td><td>1999-03-15</td><td>000150168394</td><td>고등</td><td>221094488</td></tr> <tr> <td>부 KPN452</td><td>1999-02-19</td><td></td><td>고등</td><td>221399069</td></tr> <tr> <td>조모 21596</td><td>1992-03-12</td><td>000120552288</td><td>협통</td><td>221088525</td></tr> <tr> <td>외조부</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>모 삼척05-00-0225</td><td>2001-01-01</td><td>000172119906</td><td>기초</td><td>211909395</td></tr> <tr> <td>외조모</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>							정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호	조부 KPN219	1999-03-15	000150168394	고등	221094488	부 KPN452	1999-02-19		고등	221399069	조모 21596	1992-03-12	000120552288	협통	221088525	외조부					모 삼척05-00-0225	2001-01-01	000172119906	기초	211909395	외조모				
정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호																																																																															
조부 KPN123	1988-09-13	000150167619	기초	211200750																																																																															
부 KPN333	1997-03-02	000140404633	고등	221292432																																																																															
조모 022090-202	1990-09-08		고등	221045406																																																																															
외조부																																																																																			
모 황남99-00-0022	1995-06-30	000130455943	기초	211379172																																																																															
외조모																																																																																			
정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호																																																																															
조부 KPN219	1999-03-15	000150168394	고등	221094488																																																																															
부 KPN452	1999-02-19		고등	221399069																																																																															
조모 21596	1992-03-12	000120552288	협통	221088525																																																																															
외조부																																																																																			
모 삼척05-00-0225	2001-01-01	000172119906	기초	211909395																																																																															
외조모																																																																																			
변식자 성명	허종민	변식자 주소	경남 창원군 대합면 모전리1095				변식자 성명	윤귀영	변식자 주소	강원 삼척시 도계읍 녹구리																																																																									
소유자 성명	허종민	소유자 주소	경남 창원군 대합면 모전리1095				소유자 성명	윤귀영	소유자 주소	강원 삼척시 도계읍 녹구리																																																																									
특징	모색	면선	미선	배선	불	기타	특징	모색	면선	미선	배선	불	기타																																																																						
	황	중	결	중	상황			황	중	양	중	상황																																																																							
부위	체중	체고	상지 부고	체장	흉심	흉폭	고장	요리폭	곤폭	좌골폭	흉위	전관위	체적 년월일																																																																						
체력치	119	121	137	66	38	50	44	41	24	170			2005-06-19																																																																						
심사 항목	체적 균형	지질 품위	머리 폭	전구	중구	후구 엉덩이	넓적다리	유기 성기	지체 보양	점수	심사 년월일																																																																								
값출	23	23	22	22	23	25	24	23	22	76.85	2005-06-19																																																																								
등록번호	등록구분	생년월일	명호(이름)	비코드	성명	등록일	등록번호	등록구분	생년월일	명호(이름)	비코드	성명	등록일																																																																						
221707693	고등	2003-03-23	황남01-01-0387	000176144553	임컷	2003-07-15	223193943	고등	2005-12-02	삼척05-01-1152	000188851661	임컷	2006-03-08																																																																						
<table border="1"> <thead> <tr> <th>정액번호 / 명호</th><th>생년월일</th><th>비코드</th><th>등록구분</th><th>등록번호</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>조부 KPN123</td><td>1988-09-13</td><td>000150167619</td><td>기초</td><td>211200750</td></tr> <tr> <td>부 KPN333</td><td>1997-03-02</td><td>000140404633</td><td>고등</td><td>221292432</td></tr> <tr> <td>조모 022090-202</td><td>1990-09-08</td><td></td><td>고등</td><td>221045406</td></tr> <tr> <td>외조부</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>모 황남99-00-0022</td><td>1995-06-30</td><td>000130455943</td><td>기초</td><td>211379172</td></tr> <tr> <td>외조모</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>							정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호	조부 KPN123	1988-09-13	000150167619	기초	211200750	부 KPN333	1997-03-02	000140404633	고등	221292432	조모 022090-202	1990-09-08		고등	221045406	외조부					모 황남99-00-0022	1995-06-30	000130455943	기초	211379172	외조모					<table border="1"> <thead> <tr> <th>정액번호 / 명호</th><th>생년월일</th><th>비코드</th><th>등록구분</th><th>등록번호</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>조부 KPN219</td><td>1999-03-15</td><td>000150168394</td><td>고등</td><td>221094488</td></tr> <tr> <td>부 KPN452</td><td>1999-02-19</td><td></td><td>고등</td><td>221399069</td></tr> <tr> <td>조모 21596</td><td>1992-03-12</td><td>000120552288</td><td>협통</td><td>221088525</td></tr> <tr> <td>외조부</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>모 삼척05-00-0225</td><td>2001-01-01</td><td>000172119906</td><td>기초</td><td>211909395</td></tr> <tr> <td>외조모</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>							정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호	조부 KPN219	1999-03-15	000150168394	고등	221094488	부 KPN452	1999-02-19		고등	221399069	조모 21596	1992-03-12	000120552288	협통	221088525	외조부					모 삼척05-00-0225	2001-01-01	000172119906	기초	211909395	외조모				
정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호																																																																															
조부 KPN123	1988-09-13	000150167619	기초	211200750																																																																															
부 KPN333	1997-03-02	000140404633	고등	221292432																																																																															
조모 022090-202	1990-09-08		고등	221045406																																																																															
외조부																																																																																			
모 황남99-00-0022	1995-06-30	000130455943	기초	211379172																																																																															
외조모																																																																																			
정액번호 / 명호	생년월일	비코드	등록구분	등록번호																																																																															
조부 KPN219	1999-03-15	000150168394	고등	221094488																																																																															
부 KPN452	1999-02-19		고등	221399069																																																																															
조모 21596	1992-03-12	000120552288	협통	221088525																																																																															
외조부																																																																																			
모 삼척05-00-0225	2001-01-01	000172119906	기초	211909395																																																																															
외조모																																																																																			
변식자 성명	허종민	변식자 주소	경남 창원군 대합면 모전리1095				변식자 성명	윤귀영	변식자 주소	강원 삼척시 도계읍 녹구리																																																																									
소유자 성명	허종민	소유자 주소	경남 창원군 대합면 모전리1095				소유자 성명	윤귀영	소유자 주소	강원 삼척시 도계읍 녹구리																																																																									
특징	모색	면선	미선	배선	불	기타	특징	모색	면선	미선	배선	불	기타																																																																						
	황	중	결	중	상황			황	중	양	중	상황																																																																							
부위	체중	체고	상지 부고	체장	흉심	흉폭	고장	요리폭	곤폭	좌골폭	흉위	전관위	체적 년월일																																																																						
체력치	119	121	137	66	38	50	44	41	24	170			2005-06-19																																																																						
심사 항목	체적 균형	지질 품위	머리 폭	전구	중구	후구 엉덩이	넓적다리	유기 성기	지체 보양	점수	심사 년월일																																																																								
값출	23	23	22	22	23	25	24	23	22	76.85	2005-06-19																																																																								

그림 1. 2차년도 한우 고등등록우 OPU 유래 체내 남자 공란우 정보.

○ 호르몬투여와 비 호르몬투여가 난자생산 효율 비교분석

OPU유래 체내난자를 채취하기 위하여 호르몬처리와 비 호르몬처리 방법에 따른 채란효율을 비교분석하기 위하여 미경산우 젖소를 이용한 연구를 수행하였다. 아래의 결과에서와 같이 미경산우의 경우 난소의 발육이 완전하지 않은 관계로 난포의 발육 수, 회수 수 및 배반포기 배 발달율 등 모든 지표에서 낮은 경우를 보였다. 그러나 본 연구를 위해 한우를 활용하기보다 젖소를 이용한 기본 자료를 얻기 위해 수행한 결과는 다음과 같다.

표 1을 보면 호르몬을 처리한 공란우의 경우 1,2등급의 난자는 46%, 대조구의 경우는 39%로 조사되어 호르몬 처리구에서 약간 높은 경향을 보였으며, 체외수정 후 난할율의 경우도 호르몬 처리구 (76.9%)가 대조구 (57.1%) 보다 높은 결과를 얻었다. 배발달에 있어서도 호르몬 처리구 (30.8%)가 대조구 (20.3%) 보다 높은 결과를 얻었다. 본 연구에서 비록 호르몬 처리구가 약간 높은 배반포 성적을 보였으나, 통계 처리결과 유의적 차이는 없었다. 그리고 한번 호르몬 처리를 시술한 공란우는 약 2주간의 휴식기를 가져야 하며 휴식기간에는 지속적인 관리로 인해 인건비 및 사료비 등 경제적으로도 손실임에 틀림없다. 궁극적으로는 수정란을 생산하여 이식하고 지속적으로 활용하기 위해서는 호르몬 처리에 의한 난자의 채취보다는 대조구와 같이 호르몬을 처리하지 않고 주당 2회씩 난자를 채취하는 것이 보다 더 효율적이라고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 호르몬 처리를 하지 않고 지속적으로 주 2회씩 체내유래 난자를 채취하였다.

실제 난자를 채취하는 과정에서의 기술적인 부분에서도 호르몬 처리구에서는 난포가 대난포로 성장함으로써 needle 주입 때 난포액의 누출에 의한 난자의 회수율이 낮은 경우가 있을 뿐만 아니라 난포 내에서 성숙과정을 거쳤기 때문에 과립막세포의 팽창에 의한 needle 및 tube 내에서 정체되는 경우가 종종 발생하게 된다. 그러나 호르몬 처리를 하지 않은 대조구에서는 이러한 부차적인 문제점이 발생하지 않을 뿐만 아니라 지속적인 채취에 의해 follicle wave에 따른 성숙 중인 난자를 채취할 수 있는 장점이 있다. 그래서 체내유래 난자를 활용한 체외수정란의 생산에서 비 호르몬처리에 의한 주2회씩 OPU 채란방법은 매우 효율적인 수정란의 생산이 가능할 것이다.

표 1. OPU 유래 체내난자 채취를 위한 호르몬 처리에 의한 난자의 회수 및 체외 배발달율

	난자수	난자 등급				IVC	Cleavage (%)	B.L(%)
		1	2	3	4			
대조구	151	23	37	31	60	133	76 (57.1)	27 (20.3) ^a
호르몬 처리	26	3	9	4	10	26	20 (76.9)	8 (30.8) ^a

* 미경산 젖소를 처리하였음.

○ 체내유래 수정란 대량생산 체계 개발

수정란이식은 우수한 유전 형질을 보유하는 암소로부터 다수의 수정란을 생산하여 유전능력이 떨어지는 다른 대리모에게 이식하여 송아지를 생산함으로써 우수한 유전형질을 가진 소를 효과적으로 증식시킬 수 있고, 형질이 동일한 여러 마리의 소를 대량 생산함으로써 능력 검정 등의 효율성을 높임으로써 소의 개량에 매우 유용하게 이용할 수 있는 기술이다. 수정란이식 기술은 가축개량의 목적으로 다양하게 이루어지고 있다. 예를 들면, 도축되어진 암소의 난소를 이용한 생식세포의 재활용 및 과배란처리 유도를 이용한 고능력 축종의 수정란 대량생산 및 이용 등이 있을 것이다. 하지만, 이러한 도축 유래 자성생식세포의 활용은 가축의 개량에 있어 근본적인 해결책이 되지 못한다. 또한, 과배란처리기술을 활용한 수정란 생산 및 이식에 있어서도 고능력의 축종을 이용하여 한번에 많은 양의 수정란을 생산·이식하여 축종의 개량을 가속화 할 수 있는 이점이 있으나, 한번 호르몬처리를 하게 되면 장기간 (약 2~4개월)의 자축의 휴식기간을 거쳐야 하며 이는 경제적으로 큰 이점이 되지 않는 못한다. 하지만, Ovum Pick-Up (OPU) 기술을 이용한 가축의 개량은 과거에도 많이 시도되어졌으며, 현재는 이를 더욱더 발전시켜 주 2회 채취하는 수준까지 발전되어 가축의 개량 측면에 많은 이점을 가지고 있다. 하지만 생축의 난자를 채취하는 일련의 과정이 고도로 숙련된 기술이 요구되며, 채취난자의 경우도 채취회당 대량으로 생산할 수 없다. 따라서 소량으로 채취되는 자축의 난자를 체외성숙·수정·배양을 통해 이식가능한 수정란을 효율적으로 생산할 수 있는 기술이 핵심이다. 이와 같은 OPU 수정란의 생산 체계의 성공과 효율은 유전적인 요인과 비 유전적인 요인 모두에 좌우된다. 예를 들면, OPU 기술자, OPU 보조, OPU 간격, 호르몬 처리, 공란우에 따른 난자의 질, 공란우의 사용기간 등이다. OPU 유래 수정란을 안정적으로 대량생산 할 수 있는 체계를 구축하기 위해서는 위의 요인들의 기술 정립이 핵심이다.

(1) 공란우의 지속적인 채취 기간에 대한 조사

OPU 유래 체내 난자를 채취하기 위해서는 공란우에서 지속적으로 양질의 난자를 채취 할 수 있어야 한다. 따라서 OPU 방법으로 체내 유래 난자를 채취하여 수정란을 생산하는 과정에서 채란 기간별로 난포 생성수, 난자 회수율, 난자의 등급, 배반포 발달율, 1회 채란 시 생산하는 수정란 개수를 분석하여 공란우를 효율적으로 활용할 수 있는 기간을 조사하였다.

본 연구에서는 OPU 방법으로 체외수정란을 생산하는 과정에서 1개월에서 6개월까지 기간별로 난포 생성수, 난자 회수율, 난자등급율, 배반포 발달율 등을 조사함으로써 효율적인 공란우의 사용과 교체 시기를 제시하고자 하였다.

채취 기간별 난포의 생성수를 조사한 결과는 표 2 와 같다. 1개월에서 5개월까지의 난포 생성수는 7.8 ± 0.6 , 9 ± 0.7 , 7.0 ± 0.6 , 7.2 ± 0.8 , 6.2 ± 0.82 개로 유의적인 차이가 없었으나 ($P < 0.05$), 6개월째에는 2.8 ± 0.4 개로 급격하게 줄어든 것을 알 수 있었다.

표 2. 지속적인 채취 기간에 따른 1회 난포 생성수 조사

기간	채취 횟수	난포수 (mean±SEM)
1개월	40	311 (7.78±0.57)
2개월	54	486 (9.0±0.68)
3개월	48	334 (6.96±0.60)
4개월	33	237 (7.18±0.83)
5개월	21	130 (6.19±0.82)
6개월	12	34 (2.83±0.39)

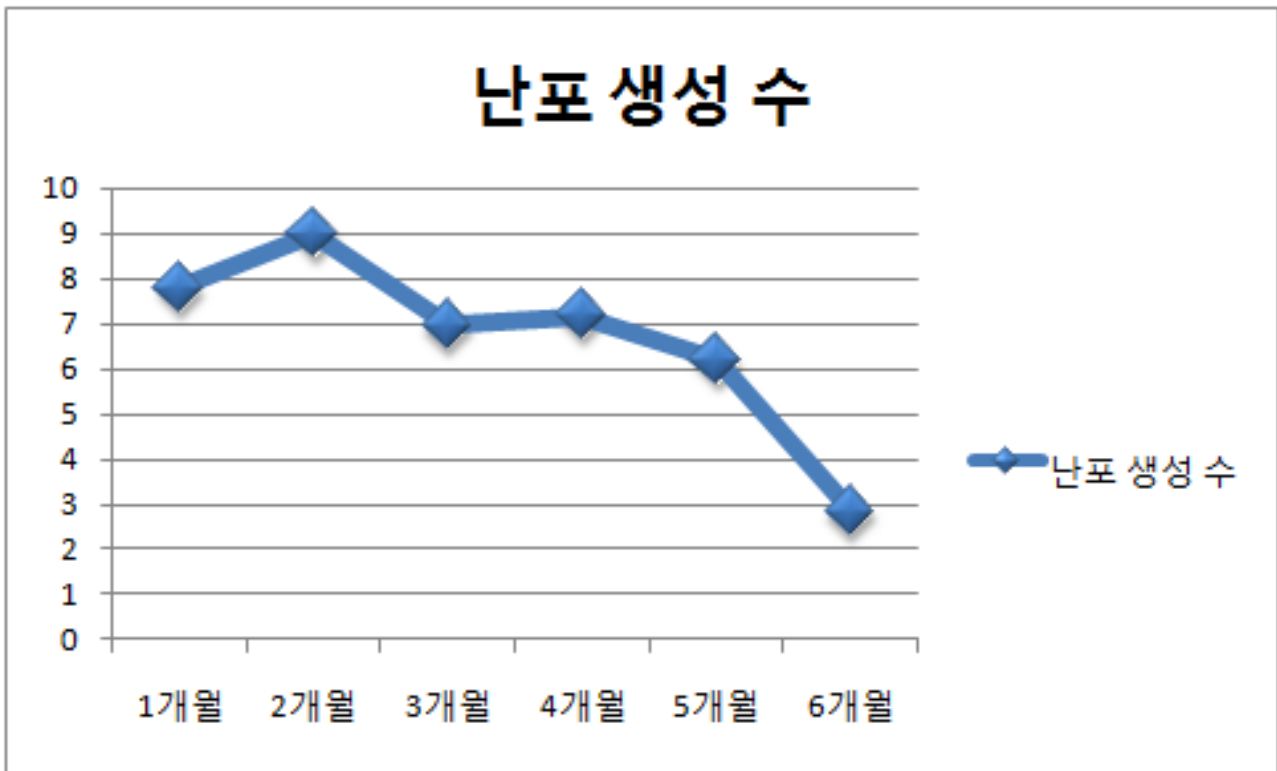


그림 2. 지속적인 채취 기간에 따른 1회 채취 시 평균 난포 생성수.

채란기간에 따른 난자 회수율은 표 3과 같다. 채란기간에 따른 난자 회수개수는 1개월에서 3개월까지는 6.0 ± 0.5 , 6.2 ± 0.7 , 5.2 ± 0.6 개로 유의적인 차이가 없었으나, 4개월부터 6개월까지 3.7 ± 0.5 , 2.8 ± 0.4 , 1.2 ± 0.2 개로 유의적으로 적어지는 것을 알 수 있었다($P < 0.05$). 난자 회수율 또한 1개월에서 3개월까지는 76.9%, 69.3%, 75.2%로 유의적인 차이가 없었으나, 4개월에서 6개월까지는 51.1%, 44.6%, 41.2% 로 유의적으로 낮아지는 것을 알 수 있었다($P < 0.05$).

표 3. 지속적인 채취 기간에 따른 남자 회수율 조사

기간	남자 회수 개수 (mean±SEM)	남자 회수율
1 개월	239 (5.98±0.51)	76.85
2 개월	337 (6.24±0.69)	69.34
3 개월	251 (5.23±0.57)	75.15
4 개월	121 (3.67±0.54)	51.05
5 개월	58 (2.76±0.41)	44.62
6 개월	14 (1.17±0.24)	41.18

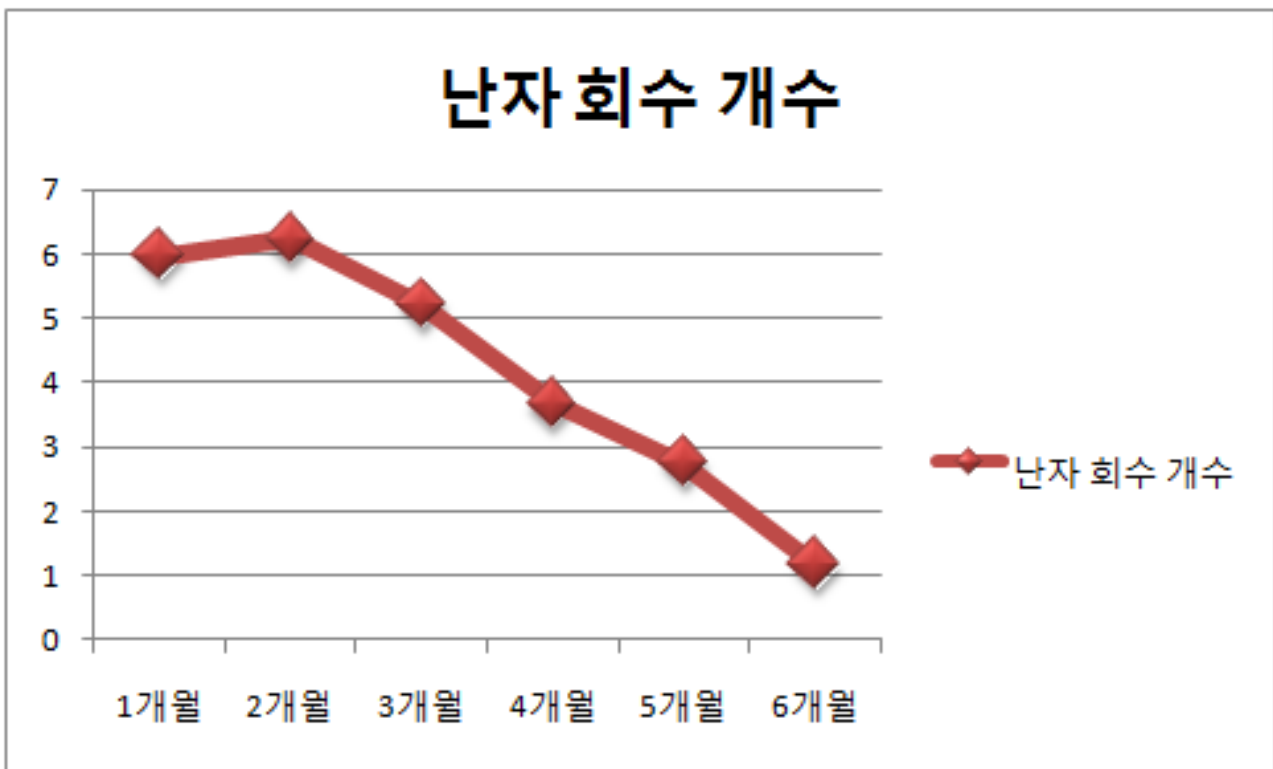


그림 3. 지속적인 채취기간에 따른 1회 채취 시 남자회수 개수 조사

채취기간에 따른 남자등급은 표 4와 같다. 남자등급은 Grade 1, 2등급 출현율이 1개월부터 3개월까지 Grade 1은 1.8 ± 0.3 , 2.2 ± 0.3 , 1.9 ± 0.3 , Grade 2는 2.1 ± 0.3 , 2.4 ± 0.3 , 2.1 ± 0.3 로 유의적으로 차이가 없었으나, 4, 5개월에는 Grade 1은 1.7 ± 0.3 , 1.1 ± 0.3 , Grade 2는 1.3 ± 0.3 , 0.7 ± 0.2 로 유의적으로 줄어들었으며($P < 0.05$), 6개월에는 Grade 1은 0.3 ± 0.1 , Grade 2는 0.5 ± 0.2 로 현저히 줄어든 것을 알 수 있었다. Grade 3과 4의 출현율은 유의적으로 차이가 없었다($P < 0.05$).

표 4. 지속적인 채취 기간에 따른 남자 등급을 조사

기간	총 남자 수 (mean±SEM)	남자등급			
		1등급	2등급	3등급	4등급
1 개월	239	72 (1.8±0.27)	84 (2.1±0.28)	48 (1.2±0.24)	35 (0.86±0.22)
2 개월	337	119 (2.20±0.26)	130 (2.41±0.29)	70 (1.30±0.23)	18 (0.33±0.11)
3 개월	251	92 (1.92±0.27)	99 (2.06±0.32)	39 (0.81±0.18)	21 (0.44±0.14)
4 개월	121	57 (1.73±0.27)	44 (1.33±0.28)	17 (0.52±0.18)	3 (0.09±0.05)
5 개월	58	24 (1.14±0.33)	14 (0.67±0.16)	14 (0.67±0.23)	6 (0.29±0.12)
6 개월	14	4 (0.33±0.14)	6 (0.5±0.19)	1 (0.08±0.08)	3 (0.25±0.18)

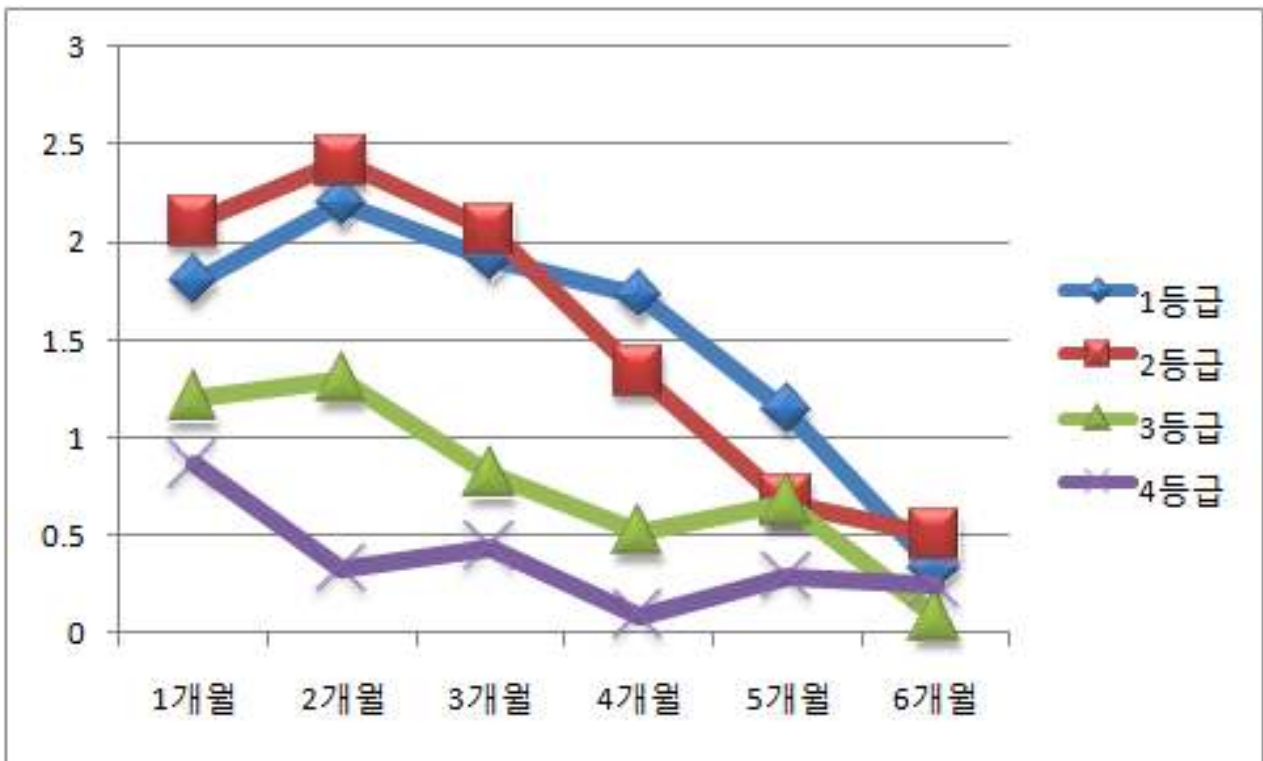


그림 4. 지속적인 채취기간에 따른 남자 등급을 조사.

채란기간별 배반포 발달율은 표 5와 같다. 1-3개월까지의 배반포 발달율은 37.2%, 40.4%, 44.6%로 높은 발달율을 보이며 차이가 없었으나, 4, 5, 6개월째에는 24.8%, 29.31%, 28.6%로 급격하게 줄어드는 것을 알 수 있었다. 1회 채취 시 수정란의 생산 개수 또한 1-3개월까지는 2.2 ± 0.3 , 2.5 ± 0.3 , 2.3 ± 0.4 개로 유의적인 차이가 없었으나($P < 0.05$), 4-6개월까지는 0.9 ± 0.2 , 0.8 ± 0.2 , 0.3 ± 0.2 개로 유의적으로 줄어드는 것을 알 수 있었다($P < 0.05$).

표 5. 지속적인 채취 기간에 따른 수정란 생산 효율 조사

기간	난자 수	수정율 (%)	배 발달율 (%)	1회 채취 시 수정란 생산 수 (mean±SEM)
1 개월	239	187 (78.24)	89 (37.24)	89 (2.23±0.33)
2 개월	337	261 (77.45)	136 (40.36)	136 (2.52±0.30)
3 개월	251	198 (78.88)	112 (44.62)	112 (2.33±0.35)
4 개월	121	81 (66.94)	30 (24.79)	30 (0.91±0.19)
5 개월	58	43 (74.14)	17 (29.31)	17 (0.81±0.16)
6 개월	14	7 (50)	4 (28.57)	5 (0.33±0.19)

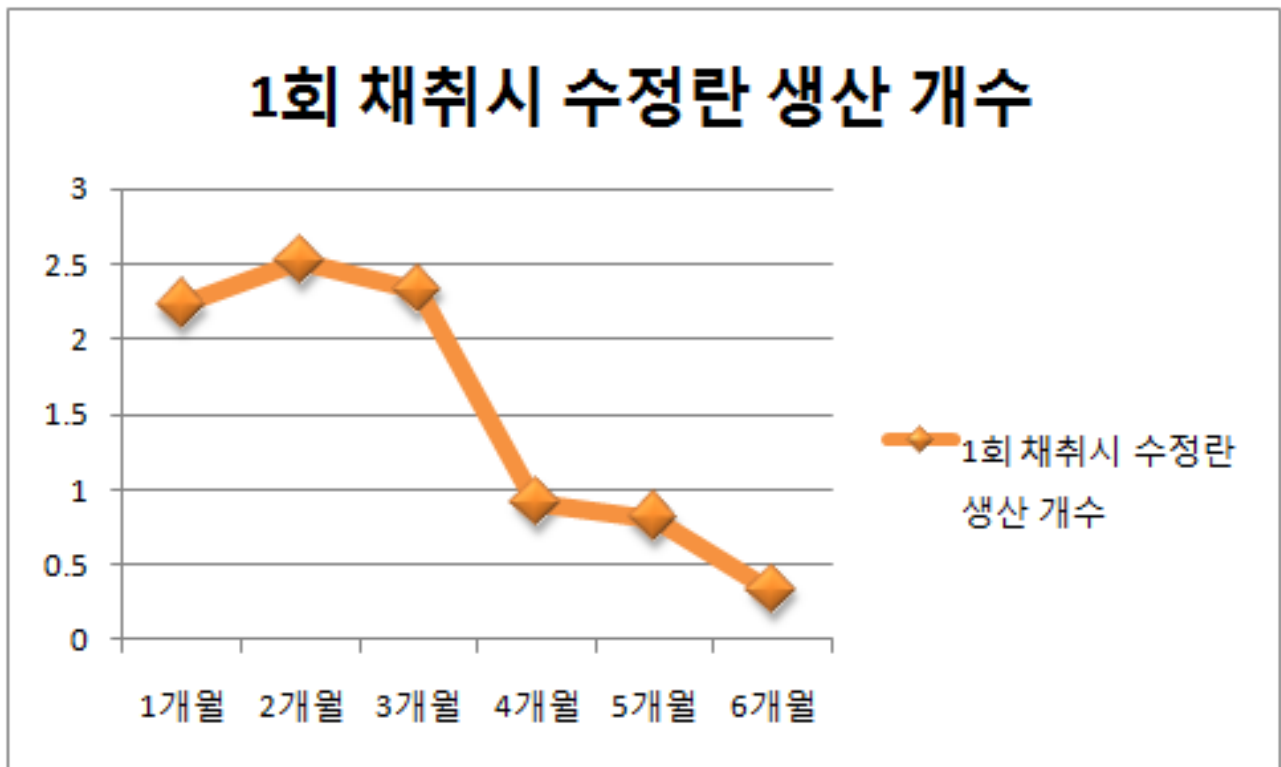


그림 5. 지속적인 채취 기간에 따른 1회 채취 시 수정란 생산 효율 조사

본 연구는 OPU 방법으로 체외수정란을 생산하여 1개월에서 6개월까지 기간별로 난포 생성수, 난자회수율, 난자등급율, 배반포 발달율 등을 조사함으로써 효율적인 공란우의 사용과 교체시기를 제시하고자 하였다. 난포 생성수에 대한 조사는 1개월에서 5개월까지는 차이가 없고 6개월째에 급격하게 줄어든 것으로 조사되었다(표 2). 난자 회수개수는 1개월에서 3개월까지는 유의적 차이가 없고, 4개월에서 6개월까지 점차적으로 낮아지는 것으로 조사되었다(표 3). 난자 등급과 배반포 발달율 또한 1개월에서 3개월까지는 차이가 없고, 4개월부터 6개월까지 점차적으로 낮아지는 것으로 조사되었다(표4, 5). 이러한 결과는 4개월째부터 난포의 개수가 감소하면서 난자의 회수개수가 감소하여 1회 채란 시 배반포의 생성 수가 감소하는 것으로 보여진다. 1개월에서 3개월까지의 공란우의 사용은 난포 형성수, 채취된 난자의 수, 배반포 발달율 등 유의적인 차이가 없었는데, 이는 다른 연구에서 1주일에 1회, 1주일에 2회, 1-5일 간격으로 OPU 방법으로 채란하여 10주까지 난포수, 난자수, 발달율 등 조사하였으나 1주일에 1회 채란 시 배반포 생성 수가 0.9 ± 0.9 , 1주일에 2회 채란 시 배반포 생성수가 0.8 ± 0.9 로 2가지 방법 모두 본 연구의 결과보다 낮았지만 10주까지 채란과정에서의 유의적인 차이는 없었다는 것이 본 연구 결과와 비슷하였다.

본 연구에서는 1주일에 2회 채란하였으며, 한 달에 8회 채란을 실시하여 1개월부터 3개월까지 1회 채란 시 수정란 생산 개수는 2.2 ± 0.3 , 2.5 ± 0.3 , 2.3 ± 0.4 였다. 다른 연구에서는 FSH를 사용하여 과배란 치료법을 이용하여 1달에 1회 채란을 실시하였으며 난포개수는 25.0 ± 4.5 , 38.3 ± 8.2 로 높았으나 난자회수가 3.5 ± 1.4 , 11.3 ± 3.6 로 적었으며 배반포의 생성수는 0.3 ± 0.5 , 6.2 ± 1.9 로 낮았다. 1회 채란 시 6.2 ± 1.9 개의 수정란 생산은 본 연구보다 높은 수치이지만, 본 연구에서는 한달에 8회 채란을 하였고, 이 연구에서는 1달에 1회 채란을 실시하였다. 따라서 본 연구에서의 수정란 생산 효율이 더 높았다.

본 연구에서의 1주일에 2회, OPU방법으로 난자를 채란하여 수정란의 생산하는 것이 수정란의 생산효율이 높다고 사료되며, 공란우를 보다 효과적으로 활용하기 위해서 1주일에 2회 채란하여 수정란을 생산하는 방법에서 채란기간에 따라 생산 효율이 떨어지는 시기를 조사한 결과 공란우를 3개월 동안 활용 후 교체하는 것이 경제적이며 효과적인 방법으로 보여진다.

(2) 개체에 따른 공란우의 활용 효율에 대한 조사

Ovum Pick-up(OPU)로 알려져 있는 질을 통하여 복강 내 난소의 난포에서 초음파기계를 이용하여 난자를 회수하는 것은 1998년(Pieterse 등, 1988) 처음 시행된 이래, 원하는 우수한 형질과 유전능력을 가진 소의 선택 가능성과 우량우의 대량 생산이 가능하다는 점에서 현재까지도 연구가 활발하게 이루어지고 있으며 실제 적용사례도 점차 증가하는 추세이다. OPU는 체외수정(IVF: *in vitro* fertilization)기술과 결합하여 우량우의 선택과 대량생산이 더 극대화된다

는 점에서 기술적 효율성을 인정받고 있다. 하지만 인공수정기술에서 과배란 처리된 난자 85% 이상이 이식 가능한 수정란으로 발달이 가능함과 비교하여 체외배양으로 발달된 OPU난자 수정란 발달율이 아직 20%에 머물러 있다. 체외수정과 후 발달에 미치는 영향은 배아의 자체 발달능력, 배양액에 첨가되는 시약, 배양조성 환경 등 다양한 원인이 존재한다. 특히 수컷의 정자가 수정률과 후 발달에 영향을 미치는 차이는 개체별로 상이하게 나타난 것으로 조사됐다. 암컷의 개체별 생산하는 난포 수, 난자 수, 이식가능한 수정란 수의 차이 역시 다를 것으로 생각되는 바 이와 관련하여 집중적으로 연구한 사례가 아직 없어 암컷의 경우에도 개체별 차이가 존재하는 것을 알아보기 위해 추가적인 실험이 필요할 것이다. 따라서 본 연구에서는 난포 수, 난자 회수율, 회수된 난자, 배아 발달 등 여러 가지 관점에서 개체별로 존재하는 차이를 조사하여 효율적인 OPU 수정란 생산을 위해 공란우 선정의 중요성을 알아보려고 실험을 수행하였다.

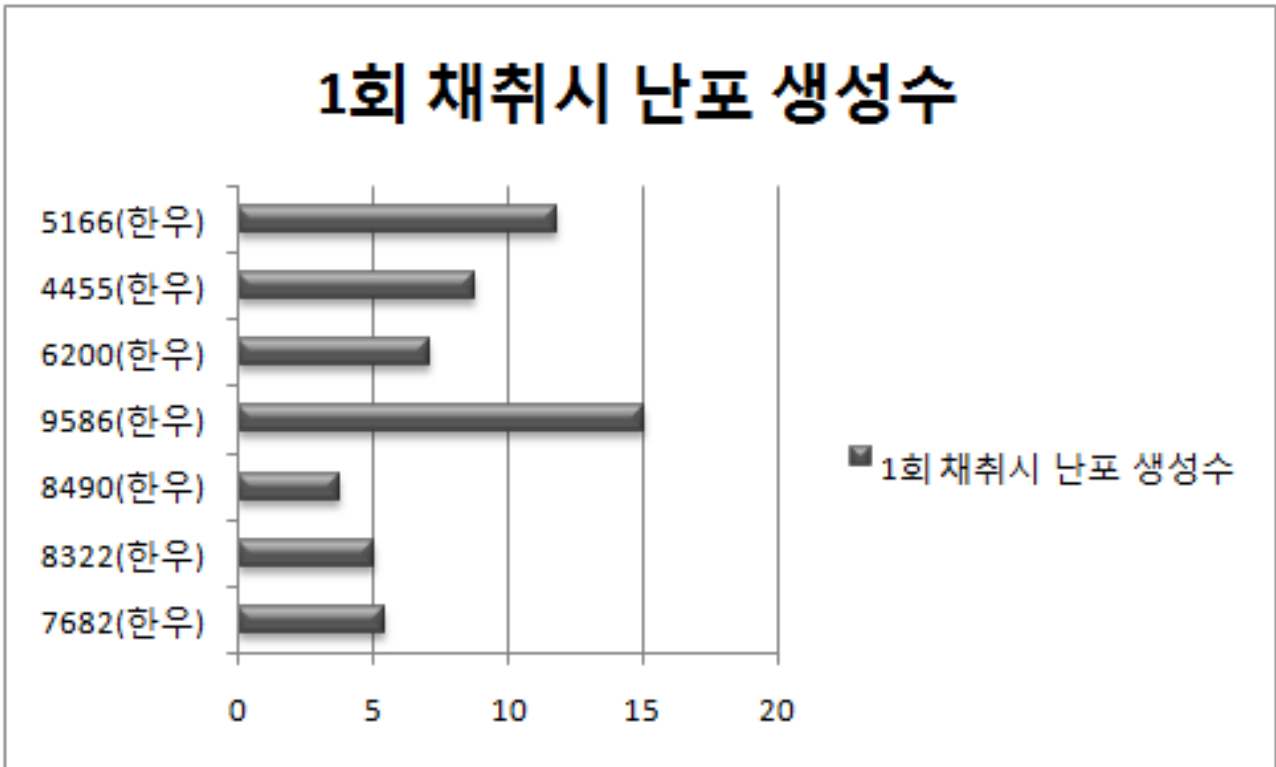
개체에 따른 난포 생성율은 표 6에서 나타내었다. 9586, 6200, 4455, 5166 번이 각각 15.1 ± 0.67 , 7.11 ± 0.59 , 8.73 ± 0.43 , 11.8 ± 0.99 로 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), 7682, 8322, 8490 번이 각각 5.45 ± 0.31 , 5.05 ± 0.33 , 3.78 ± 0.23 로 유의적으로 낮았다($p < 0.05$).

표 6. 개체별 난포 생성 수

개체번호	채란 횟수	난포 생성수 (mean±SEM)
7682	40	218 (5.45 ± 0.31)
8322	40	202 (5.05 ± 0.33)
8490	40	151 (3.78 ± 0.23)
9586	30	453 (15.1 ± 0.67)
6200	18	128 (7.11 ± 0.59)
4455	30	262 (8.73 ± 0.43)
5166	10	118 (11.8 ± 0.99)

그림 6. 개체별 난포 생성 수.

1회 채취시 난포 생성수



개체에 따른 난자 회수율은 표 7에 나타내었다. 개체에 따른 난자 회수 개수는 9586, 5166 공란우가 10.97 ± 0.92 , 8.2 ± 0.95 개로 유의적으로 높았으며, 7682, 8322, 8490 공란우는 3.18 ± 0.30 , 3.13 ± 0.32 , 2.15 ± 0.25 개로 유의적으로 낮은 것을 알 수 있다. 난자 회수율은 9586, 6200, 4455, 5166 공란우가 72.63%, 74.22%, 67.18%, 69.49%로 유의적으로 높았으며, 7682, 8322, 8490 공란우는 58.26%, 61.88%, 56.95%로 유의적으로 낮은 것을 알 수 있다.

표 7. 개체별 난자 회수율

개체번호	난자 회수개수 (mean \pm SEM)	난자 회수율
7682	127 (3.18 \pm 0.30)	58.26
8322	125 (3.13 \pm 0.32)	61.88
8490	86 (2.15 \pm 0.25)	56.95
9586	329 (10.97 \pm 0.92)	72.63
6200	95 (5.28 \pm 0.74)	74.22
4455	176 (5.87 \pm 0.45)	67.18
5166	82 (8.2 \pm 0.95)	69.49

1회 채란시 개체별 남자 회수 개수

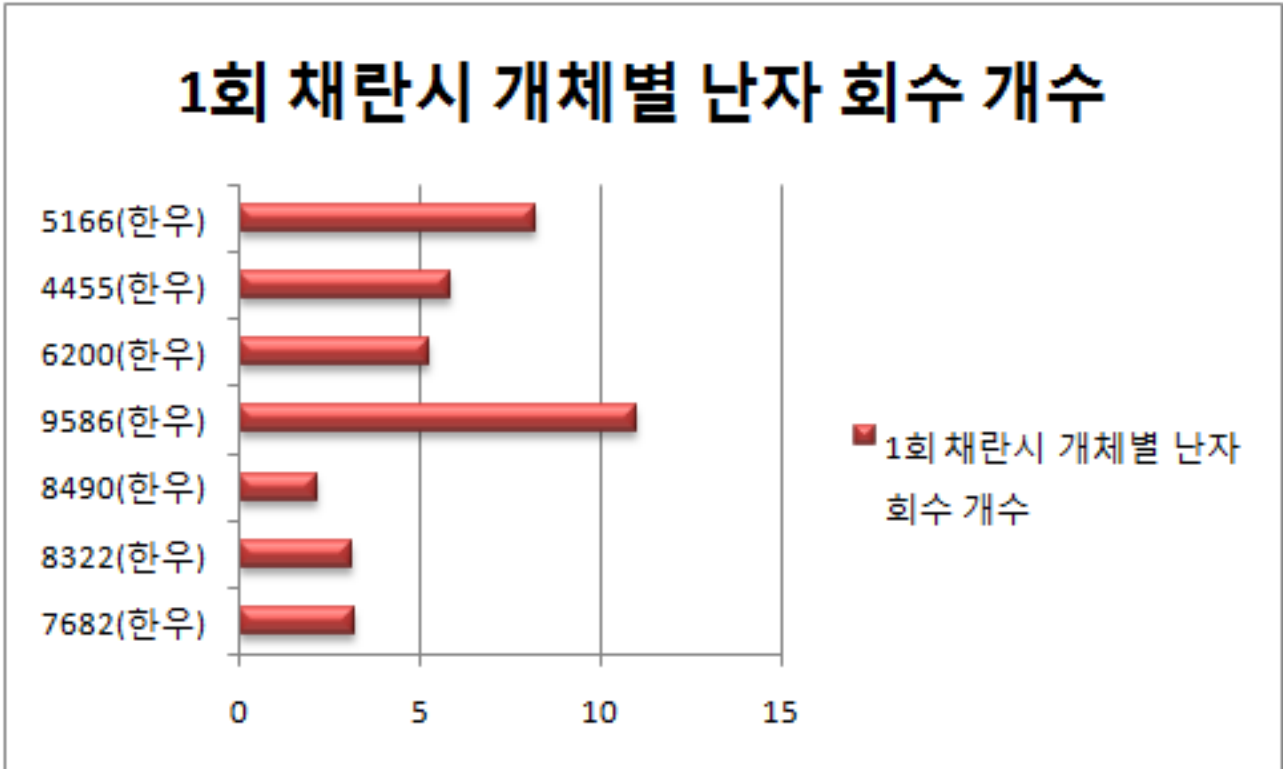


그림 7. 1회 채란 시 개체별 남자 회수 개수.

표 8. 개체별 따른 남자 등급율

개체번호	남자 회수 수 (mean±SEM)	남자 등급			
		1등급	2등급	3등급	4등급
7682	127 (3.18±0.30)	9 (0.23±0.10)	28 (0.60±0.12)	42 (1.05±0.21)	48 (1.15±0.24)
8322	125 (3.13±0.32)	57 (1.43±0.16)	42 (1.05±0.15)	17 (0.43±0.12)	9 (0.23±0.09)
8490	86 (2.15±0.25)	36 (0.90±0.14)	40 (1.0±0.15)	2 (0.05±0.05)	8 (0.2±0.07)
9586	329 (10.97±0.92)	120 (4.0±0.40)	132 (4.4±0.47)	66 (2.2±0.37)	11 (0.37±0.15)
6200	95 (5.28±0.74)	40 (2.22±0.35)	35 (1.94±0.31)	20 (1.11±0.31)	0 (0±0)
4455	176 (5.87±0.45)	68 (2.27±0.20)	75 (2.5±0.32)	23 (0.77±0.21)	10 (0.33±0.12)
5166	82 (8.2±0.95)	38 (3.8±0.29)	25 (2.5±0.65)	19 (1.9±0.41)	0 (0±0)

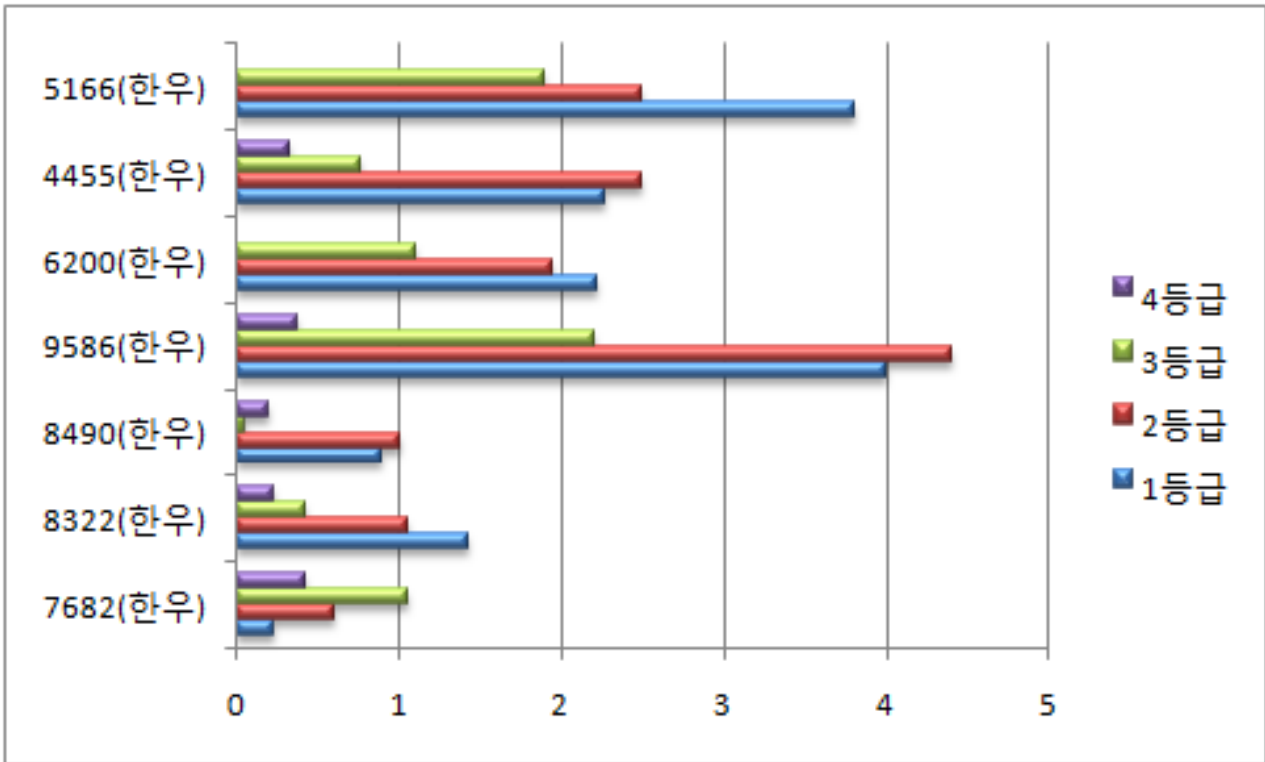


그림 8. 개체별 남자 등급율.

개체에 따른 남자의 등급율은 표8 에 나타내었다. 개체에 따른 남자의 등급율은 8322, 9586, 6200, 4455, 5166 의 공란우에서는 1등급의 남자 개수가 1.43 ± 0.16 , 1.43 ± 0.16 , 4.0 ± 0.40 , 2.22 ± 0.35 , 2.27 ± 0.20 , 3.8 ± 0.29 로 유의적으로 많았으나, 7682, 8490 공란우는 Grade 1의 남자 개수가 0.23 ± 0.10 , 0.90 ± 0.14 로 현저히 적은 것을 알 수 있다. 4등급의 남자 개수는 7682 공란우가 1.15 ± 0.24 로 많았고. 8322, 8490, 9586, 6200, 4455, 5166 공란우가 0.23 ± 0.09 , 0.2 ± 0.07 , 0.37 ± 0.15 , 0 ± 0 , 0.33 ± 0.12 , 0 ± 0 로 현저히 적은 것을 알 수 있었다.

표 9. 개체별 따른 수정란 발달율

개체번호	난자수	수정률 (%)	배 발달율 (%)	1회 채란 시 수정란 생산 수 (mean±SEM)
7682	127	79 (62.2)	13 (10.24)	13 (0.33±0.10)
8322	125	94 (75.2)	64 (51.2)	64 (1.60±0.20)
8490	86	55 (63.95)	27 (31.4)	27 (0.68±0.10)
9586	329	270 (82.1)	146 (44.4)	146 (4.8±0.53)
6200	95	78 (82.1)	43 (45.3)	43 (2.39±0.35)
4455	176	144 (81.8)	77 (43.8)	77 (2.57±0.26)
5166	82	57 (69.5)	18 (22.0)	18 (1.8±0.25)

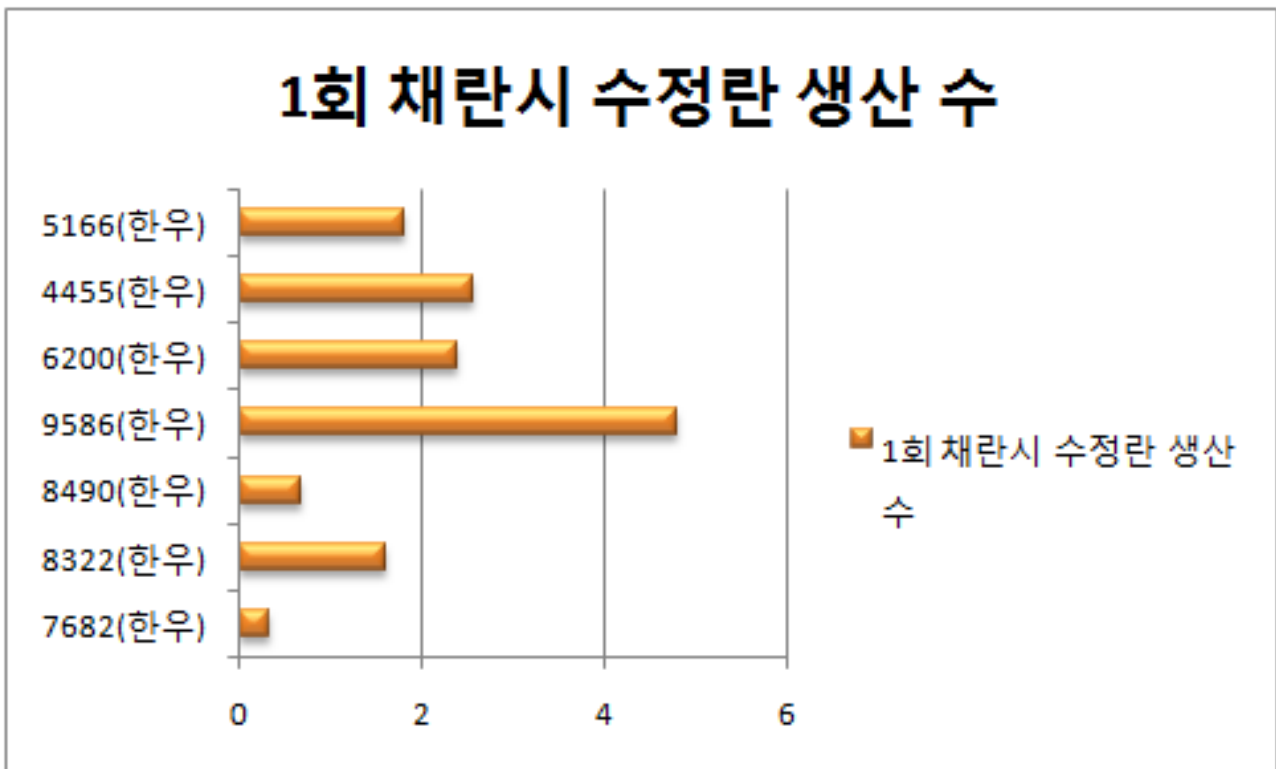


그림 9. 1회 채란시 개체별 따른 수정란 생산 수.

개체에 따른 배반포 발달율은 표 9에 나타내었다. 개체에 따른 배반포 발달율은 8322, 9586, 6200, 4455 공란우가 각각 51.2%, 44.4%, 45.3%, 43.8%로 유의적으로 높았으며, 8490, 5166 공란우는 31.4%, 22.0%로 유의적으로 낮았으며, 7682 공란우는 10.24%로 현저히 낮은 것을 알 수 있다. 개체에 다른 1회 채란 시 수정란 생산개수는 9586 공란우가 4.8 ± 0.53 개로 유의적으로 높았으며, 8322, 6200, 4455, 5166 공란우가 1.60 ± 0.20 , 2.39 ± 0.35 , 2.57 ± 0.26 , 1.8 ± 0.25 로 유의적으로 낮았다. 7682, 8490 공란우는 0.33 ± 0.10 , 0.68 ± 0.10 로 현저히 낮은 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 보면 개체별로 난자 회수율, 난자 등급, 수정란 생산 수 등이 월등히 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 실제 수정란을 생산하기 위해서는 회수되는 난자의 수가 많아야 하며, 난자의 수가 많을수록 1, 2등급의 질이 우수한 난자 또한 많이 회수 가능하였다. 질적 수준이 높은 난자가 많은 개체에서 최종적으로 1회 채란 하였을 때 생성되는 수정란의 수 또한 많았다. 따라서 공란우의 선정 시 2~3회 채란을 하여 난자 회수율, 난자 등급, 수정란 생산되는 수를 평가하여 우수한 개체만을 도나로 활용하는 것이 체내유래 난자의 대량생산체계를 확립하는데 필요할 것으로 판단된다.

(3) 새로운 Dish를 이용한 배양 기술의 효율 조사

1차년도에 기술한 바에 의하면 (표 10), 난자의 체내 성숙·수정·배양에 있어 정상적인 배발달을 유도하기 위해서는 최소 10개 이상의 난자를 공배양해야만 성공적인 배발달을 유지시킬 수 있었음을 기술하였다. 난자의 회수 개수가 9586 공란우를 제외한 나머지 공란우에서 3~8개의 난자가 회수되었다. 이러한 조사 결과로 볼 때 OPU 유래 체내난자의 체외 배양에 있어 많은 어려움이 따름을 시사한다. 따라서 개체별로 구별하여 성공적으로 체내유래 난자의 배 발달을 유지시킬 수 있는 기술이 개발되어야 한다. 즉 OPU 유래 체내난자의 수정란 생산을 위해서는 개체별 난자의 배양이 필수적이다. 왜냐하면 다른 개체의 것과 섞인다면 수정란의 개체별 인식이 불가능할 뿐만 아니라 궁극적으로 향후 송아지의 분만 후 등록을 할 수 없을 것이다. 그리하여 궁극적으로 이러한 적은 난자의 수로 체외 수정란을 생산하기 위해서는 다양한 grop culture 기술이 개발되어야 할 것으로 판단된다. 그리하여 본 연구에서는 개체별로 구별이 가능한 상태에서 1개의 drop에서 4마리의 개체를 배양할 수 있는 새로운 dish를 이용하여 배양 기술의 효율을 조사하였다.

표 10. 체외배양에 있어 수정란의 개수가 배발달에 미치는 영향

No. of oocyte/ 50 ul drop	No. of replicated	No. of oocytes	No. of cleaved	Blastocyst		
				day 7 (%)	day 8 (%)	Total (%)
5	4	20	13 (65.0)	1 (5.0) ^a	—	1 (5.0) ^a
10	29	281	155 (55.2)	60 (21.4) ^b	22 (7.8)	82 (29.2) ^b
15	34	488	293 (60.0)	165 (33.8) ^c	40 (8.2)	205 (42.0) ^c

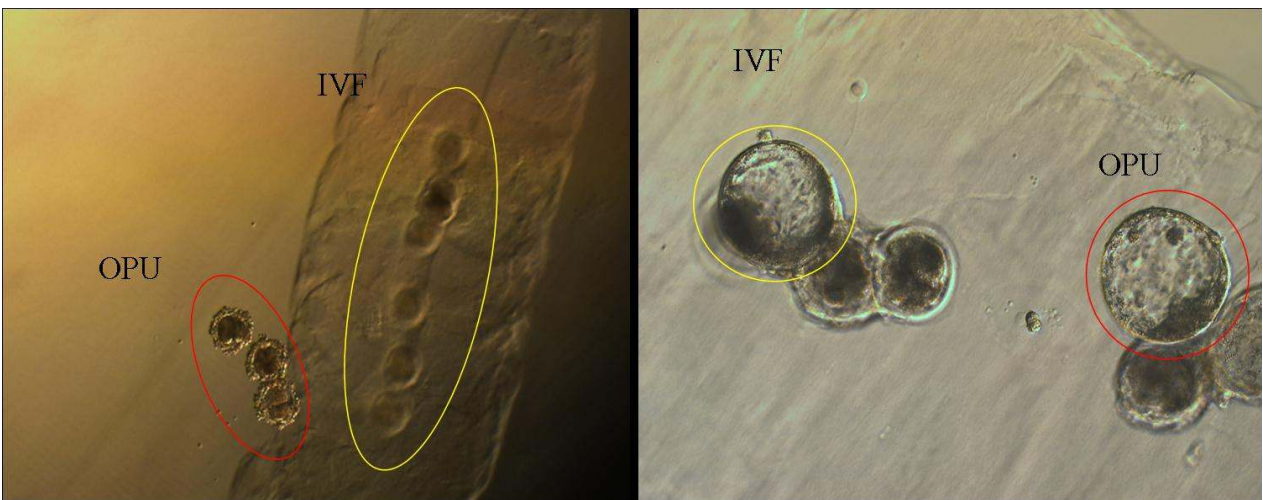


그림 10. Agar chip을 이용한 OPU 유래 체내난자와 도축장유래 난자의 구별 및 공배양

표 11. OPU 유래 체내난자와 도축장유래 난자의 공배양, GPS dish가 배발달에 미치는 영향

	Oocyte grade				No. of total oocytes recovered	No. of embryos cleaved	No. of blastocyst
	G1	G2	G3	G4			
OPU 난자	39	36	35	26	136	131 (96.3)	6 (4.4) ^a
OPU 및 도축장유래 난자 공배양	10	29	25	30	94	88 (93.6)	25 (26.6) ^b
GPS dish를 이용한 배양	266	267	128	21	682	549 (80.5)	284 (41.6) ^c

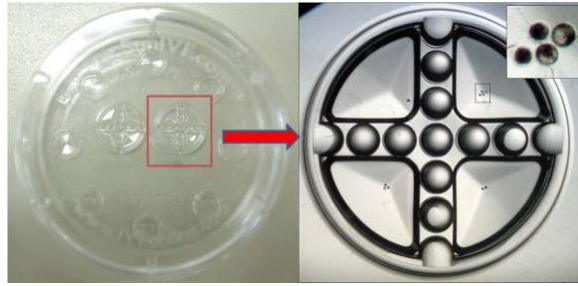


그림 11. 새로운 dish를 이용한 배양

표 12에서 보는 바와 같이 1년차에 1회 채취 당 이식 가능한 수정란을 0.9개 생산하였으나, 2년차에 3.23r로 증가되었고 1년차, 2년차 평균 1.88개를 생산할 수 있었다. 이는 개체별 생산효율이 증가되었을 뿐만 아니라 GPS dish를 이용한 배양체계 등 OPU 유래 수정란의 생산에 관련된 전반적인 기술을 발전시켰다고 판단된다. 이러한 생산효율을 년 생산율을 환산하면, 즉 공란우를 4개월마다 교체한다는 조건으로 계산하면 약 200개 정도 생산 가능하다.

표 12. 개체별 평균 수정란 생산 개수 비교

개체번호	채란횟수	수정란생산개수	1회 채란 시 수정란 생산개수
7682	40	13	0.33
8322	40	67	1.68
8490	40	28	0.7
1차년도 합계	120	108	0.9
9586	30	146	4.87
6200	30	77	2.57
4455	18	43	2.39
5166	10	18	1.8
2차년도 합계	88	284	3.23
1+2차년도 합계	208	392	1.88

○ 체내유래 수정란의 품질향상 연구

수정란은 다양한 배양액에 배양되어지며 또한 배양기간이 길기 때문에 많은 요인이 수정란 생산에 작용된다. 또한 체내난자의 경우 회수되는 난자의 개수 또한 제한적이기 때문에 최적의 배양조건 확립과 수정란이 생존할 수 있는 유전자의 발현이 중요하다.

표 13은 실시간 정량적 중합효소연쇄반응을 위한 사용된 primer의 정보를 나타낸 것으로 6개 유전자를 활용하였다.

표 13. 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응을 위한 Primers 에 대한 정보

Gene name	Accession number	Forward primer (5'---3')	Reverse primer (5'---3')	Fragment Size
Aldo-keto reductase family 1, member B1 (AKR1B1)	BT021058	tgcaaccCAAatact ctttt	aaaagcctagctgaaa ggat	106
CD9 molecule (CD9)	NM_173900	agatcttccgaagca aatc	caaagttagtggcaaa ggaa	238
Thioredoxin (TXN)	AF104105	tgatcaagcctttctt tcat	taatggtggcttcaagt ttt	195
Placenta-specific 8 (PLAC8)	NM_001025	tctgacattttaccg ctct	atctcattgcagcatttt ct	131
Prostaglandin G/H synthase-2 (PGSH2)	NM_174445	atcctcccacagtca aagat	gcacatcacacactct gttg	162
Actin bita (ACTB)	NM_173979	atcttgaatggacag ccatc	tgtacaggaaagccct gact	120

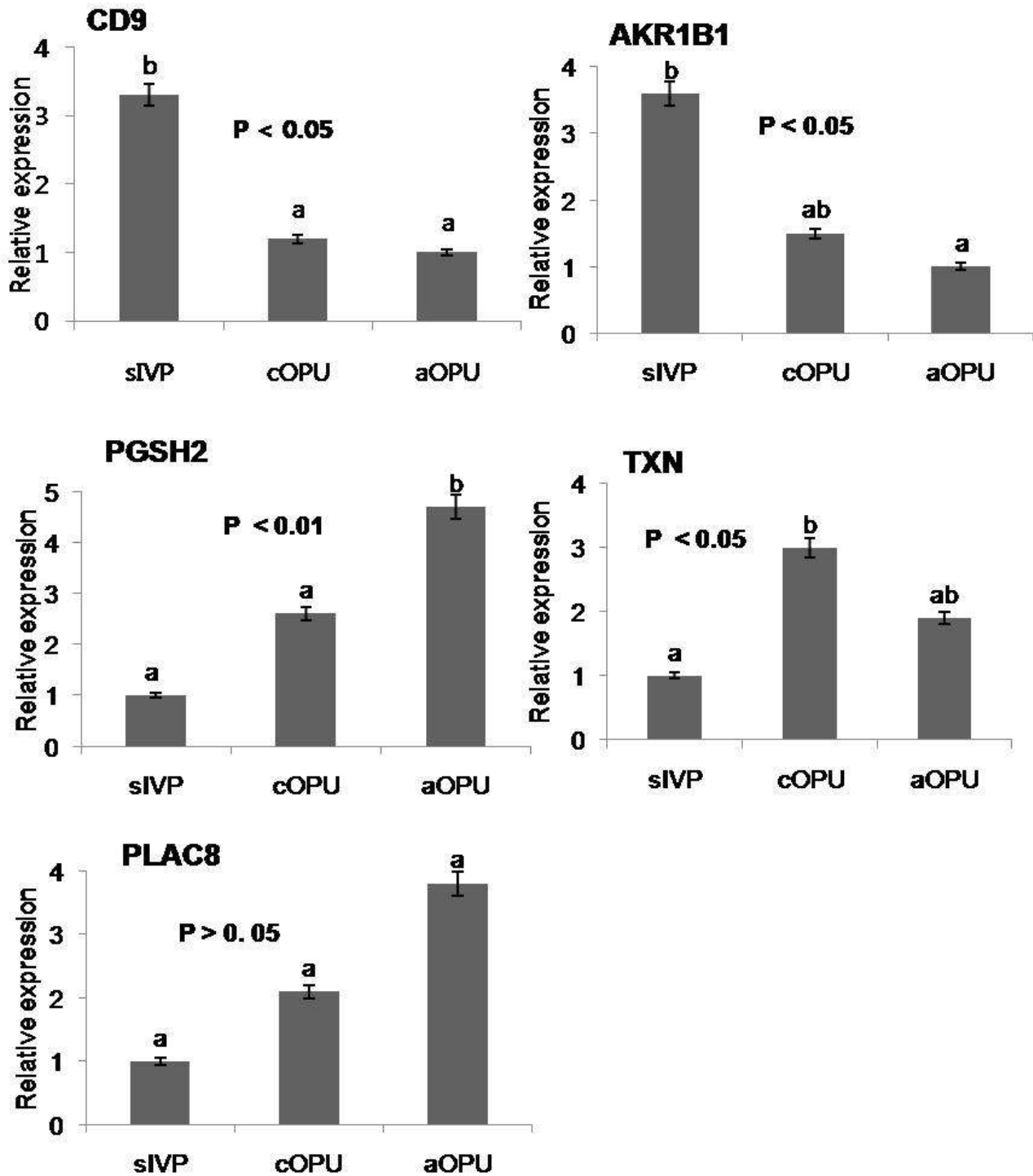


그림 12. 실시간 정량적 중합효소연쇄반응을 통한 수정란의 유전자 발현 패턴

실시간 정량적 중합효소연쇄반응을 통하여 sIVP, cOPU 그리고 aOPU coculture 시스템으로부터 8일째 회수한 blastocyst에서 미지의 유전자 발현패턴을 확인한 결과로써, 유전자의 발현 패턴은 gene-specific PCR product의 melting curve 분석과 1.5% agarose 전기영동을 통하여 확인을 하였습니다. cOPU 유래 blastocyst에서의 생물학적 중요한 유전자인 CD9, AKR1B1, TXN 그리고 PLAC8은 그 발현의 패턴이 비슷하였고 ($P > 0.05$), aOPU 유래 blastocyst에서는

PGSH2의 뉴전자 발현이 높게 나타났다 ($P < 0.01$). sOPU 유래 blastocyst와 비교했을 때, aOPU 유래 blastocyst에서 embryo 착상을 방해하는 유전자인 CD9과 AKR1B1의 발현은 down-regulation 되었고 반면에 embryo의 착상과 관련된 유전자인 PGSH2와 TXN의 발현은 up-regulation 되었다.

표 14. 한우 COCs 의 체외발달능력

Culture system	Presumptive zygote (n)	Cleavage (%)	Blastocyst (%)	Total cell (Mean \pm SD)
Control OPU	148	65.0 ^a	13.3 ^a	115.0 ^a \pm 28.0
Agar chip coculture	103	81.3 ^a	34.5 ^b	127.8 ^a \pm 21.2
Slaughter house IVP	80	75.0 ^a	31.3 ^b	129.5 ^a \pm 17.6

표 14는 한우 COCs의 체외발달 능력을 나타내며, aOPU (agar chip coculture)와 cOPU (control OPU)사이의 cleavage rate는 차이가 나지 않지만, blastocyst rate은 aOPU가 cOPU보다 유의적으로 높게 나타났다. 그리고 aOPU의 cleavage와 blastocyst 발달능력은 sIVP (slaughter house IVP) 그룹과 비슷한 경향을 보였다. 게다가 blastocyst의 질적 차이를 측정 한 결과 blastocyst당 전체 세포수는 cOPU, aOPU 그리고 sIVP 그룹 모두에서 차이를 보이지 않았다. 이와 같은 연구결과에서 Agar chip Co-culture 시스템을 배양체계에 이용하는 것이 OPU 수정란의 생산에 매우 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

○ 체내유래 수정란의 동결방법 연구

수정란이식기술의 산업화를 위해서는 반드시 해결되어야 할 부분이 수정란의 동결보존기술이다. 동결정액을 이용하듯이 수정란도 동결보존 후 활용할 수 있는 기술개발이 이루어진다면 시간적, 공간적 제한을 극복할 수 있을뿐만 아니라 발정은 개체에 언제라도 이식이 가능할 것이다. 현재 본 연구실에서 개발한 수정란의 동결보존기술은 유리화동결보존기술(Vitrification method)로서 표 15에서 보는 바와 같이 94.3% 생존율을 얻고 있다. 동결보존을 위해 미세조작으로 수정란 내의 수분을 최소한으로 줄이는 과정을 거치면서 동결보존 후 생존율을 향상시킬 수 있었다. 이렇게 생산된 수정란을 동결보존하고 필요 시 용해 후 이식하여 산자생산의 목적으로 이용한다면 가축개량의 목적에 크게 기여하는 기술이라고 판단된다. 궁극적으로 수정란이식에서 생산된 수정란은 전량 이식하지 못하면 반드시 동결보존 후 차후 필요 시 활용할 수 있어야 한다. 이러한 측면에서 수정란의 동결보존은 정액의 동결정액과 같이 현장의 실용화에 반드시 요구되는 기술이다. 본 연구실에서는 아래와 같은 결과로써 수정란을 동결보존하는 기술을 94.3%까지 안정적으로 정립하였으며 앞으로는 현장에서 인공수정과 같이 간편하게 활용할 수 있도록 straw에 수정란을 장착하여 동결보존하는 방법을 연구하여 산업화에 접목시킬 연구를 진행해야 할 것이다.

표 15. 동결 보존액의 독성이 수정란에 미치는 영향

Exposed solution	Artificial shrinkage	No. of blastocyst used	No. (%) of blastocyst developed to re-expanded at 24 hr post-thawing
VS1 + VS2	Control	30	24 (96.0) ^a
	Punctured	35	33 (94.3) ^a

표 15는 액체질소에 침지하지 않고 동결 보존액의 독성에 대하여 수정란에 미치는 영향에 대한 연구의 조사이다. Holding media에서 10분간 평형시킨 후 Vitrification solution 1에서 5 min, vitrification solution 2에서 30초 이내에 노출시킨 후 곧 바로 용해 medium에서 용해과정을 거친 후 최종 Culture media에서 여러번 washing 후 24 h 동안 배양하였다. 결과적으로 Control group이 96% Punctured group이 94.3%로 수치상 높았으나 유의적 차이는 없었다.

표 16. 동결 용해 후 생존율과 부화율

Treatment	No. (%) of blastocyst recovered/vitrified	No. (%) of blastocyst at 12 hr	
		Survived/recovered	Hatching/recovered
Control	32/35 (91.4)	25/32 (78.1)*	0/32 (0.0)**

Punctured	29/31 (93.5)	27/29 (93.1)	15/29 (51.7)
-----------	--------------	--------------	--------------

표 16은 동결을 할 때에 AS가 수정란의 생존율과 해칭율에 미치는 영향에 대한 조사이다. 결 방법은 상위와 동일 하고 Punctued group은 Holding media 에서 평형을 하기 전 미리 micro-manipulater를 이용하여 Puncture를 하여 수정란 내 수분을 제거하였다.결과는 생존율에 서 Puncture group의 유의적 효율이 인정이 되었고 해칭율을 비교해볼 때 고도의 유의적 차이 가 있었다.

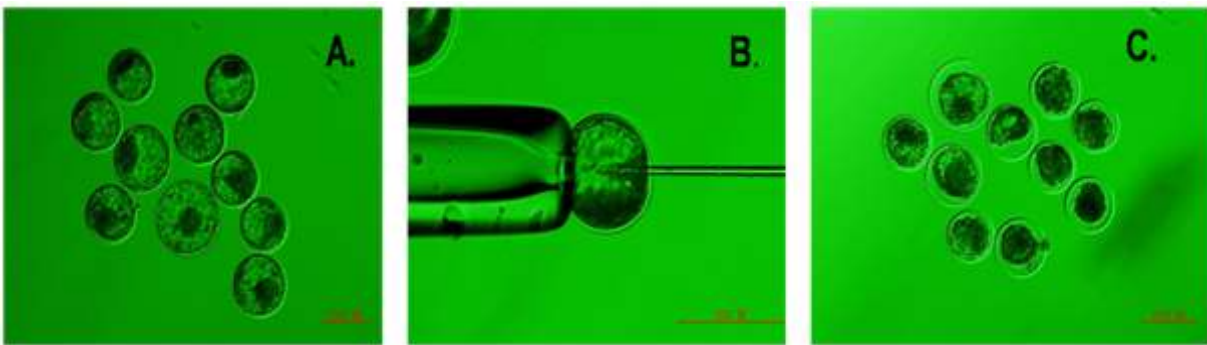


그림 13. 수정란에 Puncture 하는 과정.

표 17. 동결 용해 후 수정란의 Apoptosis 비교

Treatments	Total cells	Apoptotic cells
Non-frozen	93.8 ± 32.1 ^a	8.6 ± 7.0 ^c
Control	143.4 ± 27.1 ^b	8.0 ± 6.3 ^c
Punctured	168.6 ± 31.1 ^b	0.3 ± 0.7 ^d

표 17은 동결 용해 후 고정액을 이용하여 수정란을 고정시켜 Tunnel staining을 통한 수정란 의 동결에 대한 Apoptosis를 보기 위한 실험이다. 동결을 하지 않은 fresh 한 수정란, 동결은 하였으나 Punctured를 하지 않은 Control group, 동결 시 Puncture를 한 group 세 그룹으로 나뉘어 염색을 하여 Apoptosis된 cell을 counting 하였다. 결과적으로 Total cell에서는 Control, Punctured group은 차이가 없었으나 Non-frozen과는 차이가 있었다. 그리고 염색 후 Apoptotic cell을 비교해볼 때 Non-frozen, control 간은 차이가 없었고 Punctured group은 차 이를 보였다. 따라서, 동결을 할 때 수분을 제거함으로써 cell의 apoptosis를 낮출 수 있다고 본다.

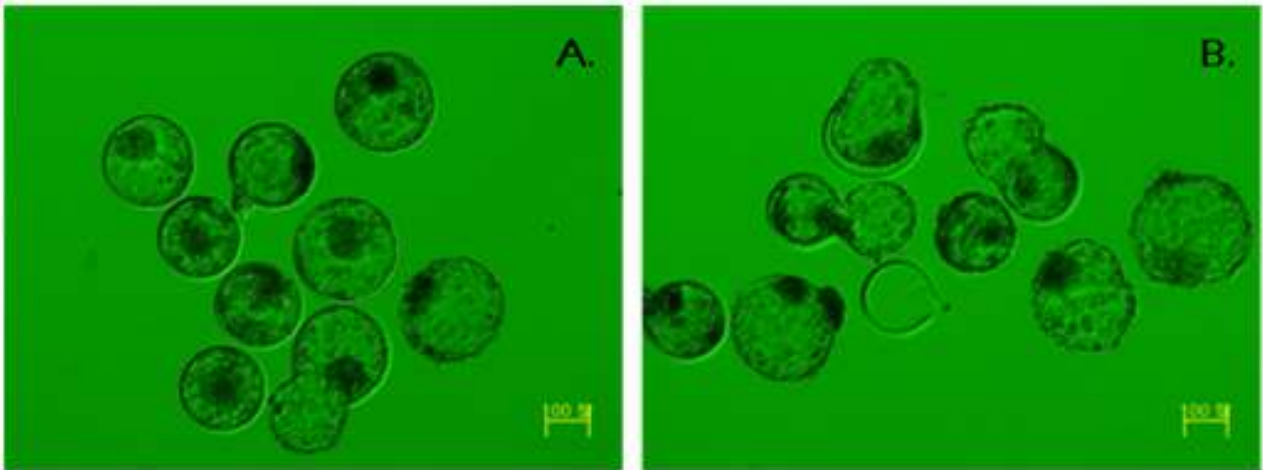


그림 14. 동결 용해 후 Puncture group과 control group의 12 h 이상 culture한 후 배반포

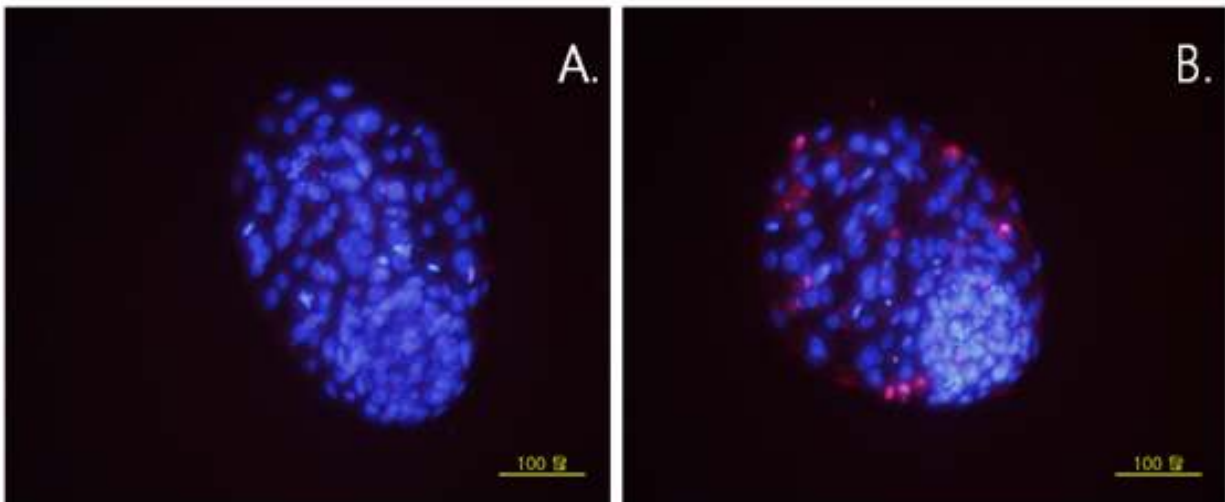


그림 15. TUNEL 염색에 의한 Apoptosis 비교(A. puncture, B. control).

[제2세부과제] 개체선발과 수정란인식체계 구축

○ 개체별 인식기준 설정

경상남도 김해축협산하 고등등록우 중 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대로 선발기준 확립

- 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대로 선발기준 확립
- 선발기준에 적합한 공란우 개체 후보 선발

○ 각 수정란별 증명서 발급

- 제1세부과제에서 선발한 수소 3두와 암소 5두에 대해 한우 이력추적용 DNA 검사에 사용되는 초위성체(Microsatellite, MS)마커 11종과 2쌍의 성감별용 마커를 사용하여 유전자지문 검사를 실시해 한우 고급육생산을 위한 개체식별용 DNA 검사를 실시하여 개체별 수정란 인식 마커를 제작하고 산자 생산 시 제작된 마커를 이용하여 DNA 검사 후 친자감별법을 통해 친자를 확인 후 증명서 발급이 가능한 시스템을 구축하였다. 표 1은 본 연구에서 개체 식별을 위해 사용된 초위성체(Microsatellite, MS)마커와 성감별용 마커의 종류를 나타내었다.

표 1. 초위성체(Microsatellite, MS) 마커 및 성 감별용 마커 리스트

MS name	Label	Size (bp)	비 고
TGLA227	B(FAM)	76 ~ 104	
BM2113	B(FAM)	123 ~ 143	
TGLA53	B(FAM)	154 ~ 188	
ETH10	B(FAM)	212 ~ 224	
SPS115	B(FAM)	246 ~ 260	
TGLA126	G(VIC)	116 ~ 122	
TGLA122	G(VIC)	137 ~ 181	
INRA23	G(VIC)	196 ~ 222	
ETH3	Y(NED)	105 ~ 125	
ETH225	Y(NED)	141 ~ 159	
BM1824	Y(NED)	178 ~ 192	
BOV_X	R(PET)	118	
BOV_Y	R(PET)	242	

- 수소의 경우 정액을 이용하여 Genomic DNA를 추출하였으며 암소의 경우 모근을 이용하여 Genomic DNA를 추출하여 11종의 초위성체(Microsatellite, MS)마커와 2쌍의 성감별용 마커를 이용하여 Multiplex PCR 방법을 이용해 대립유전자형을 증폭하여 염기서열 분석장치 (ABI3130x)를 이용해 대립유전자형 분석을 위한 전기영동을 실시하였으며, 분석된 대립유전자형은 GeneMapper v4.0 프로그램을 이용하여 Allelic Ladder를 적용해 데이터를 보정하여 표준화 데이터 생성하였다(표 2).

표 2. 한우 고급육 생산을 위한 부모 개체 대립유전자형 분석결과(디지털데이터)

개체번호	BM1824	BM2113	ETH10	ETH225	ETH3	INRA23	SPS115	TGLA122	TGLA126	TGLA227	TGLA53	BOV_X	BOV_Y											
KPN538	12	13	19	21	19	20	23	23	23	26	22	24	21	21	24	30	17	17	20	22	19	21	X	Y
KPN642	13	14	19	21	19	22	23	25	26	26	20	24	25	25	30	30	17	18	14	21	31	33	X	Y
KPN641	13	14	15	21	19	20	23	23	22	23	17	21	21	25	29	30	17	22	15	20	27	28	X	Y
8661	13	14	19	20	18	19	23	25	23	24	18	20	25	25	29	40	17	20	22	26	27	34	X	-
9586	14	14	15	19	18	18	23	26	23	23	17	20	23	25	21	26	17	20	19	22	28	35	X	-
6200	13	14	19	21	16	19	23	25	23	26	20	20	25	25	21	25	17	17	19	22	33	34	X	-
4455	13	14	20	20	19	22	23	25	24	27	20	20	21	25	24	29	17	20	19	20	25	34	X	-
5166	13	17	20	21	19	22	23	24	24	26	20	24	25	25	21	43	17	21	20	21	27	34	X	-

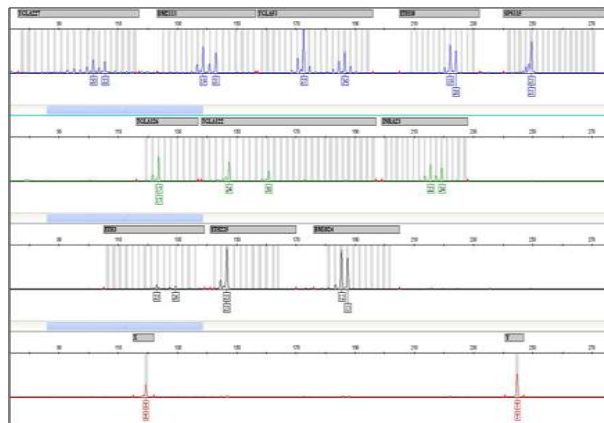


그림 1. 수소(KPN 538, 보증종모우) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터)

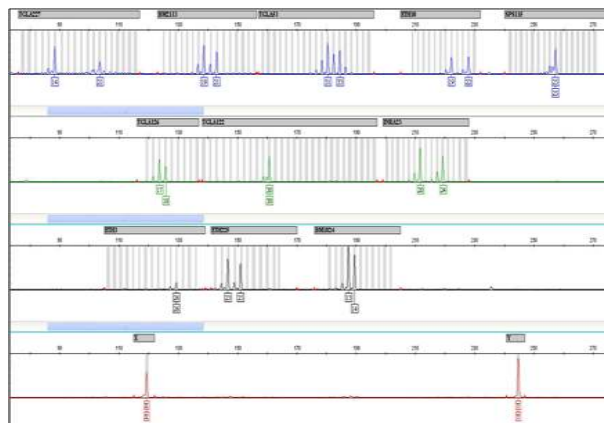


그림 2. 수소(KPN 642, 보증종모우) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터)

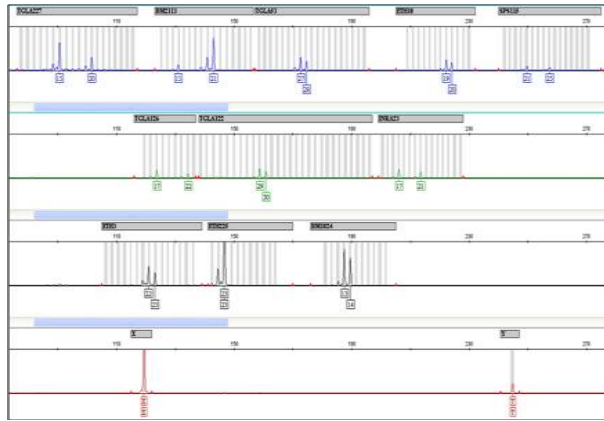


그림 3. 수소(KPN 641, 보증종모우) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터)

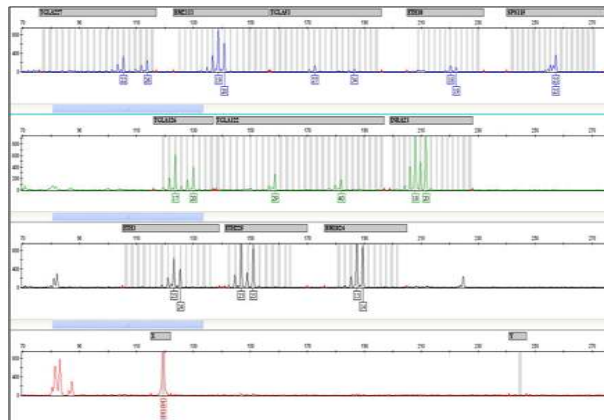


그림 4. 암소(8661) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

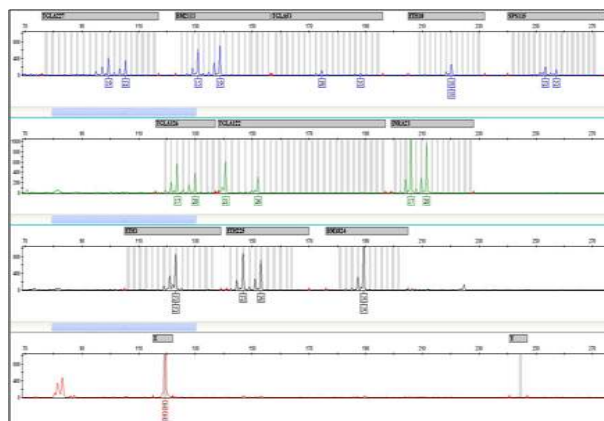


그림 5. 암소(9586) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

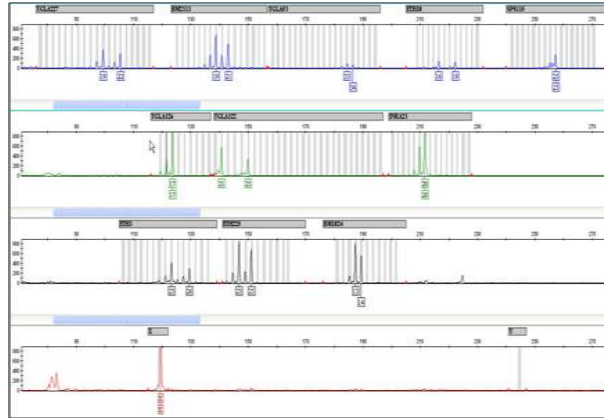


그림 6. 암소(6200) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

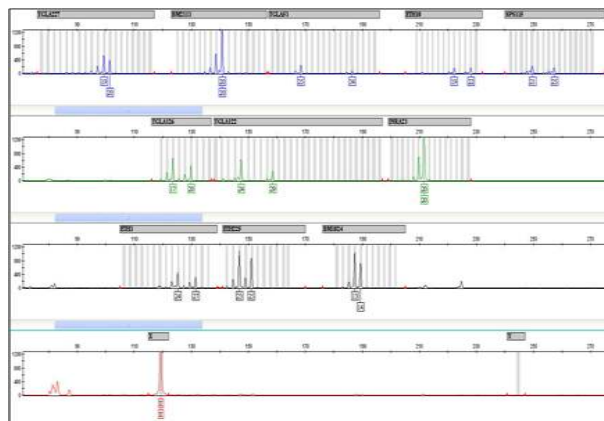


그림 7. 암소(4455) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

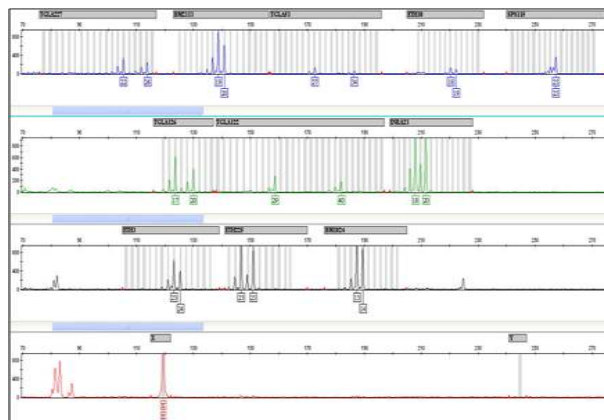
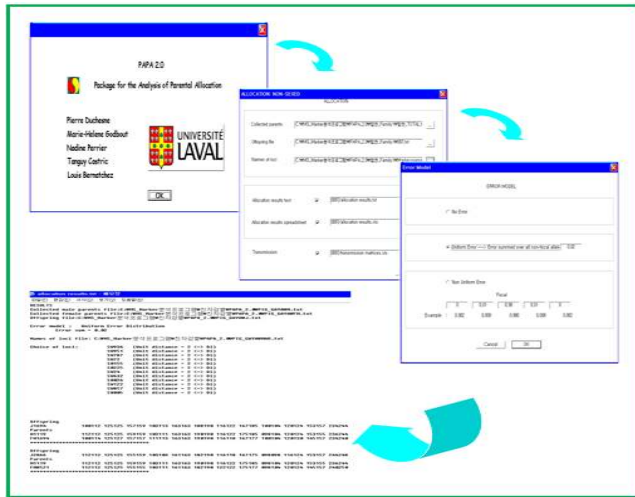


그림 8. 암소(5166) 대립유전자형 분석결과(아날로그 데이터).

한우 고급육 생산을 위해 고등등록우 정액과 OPU유래 체내난자를 이용해 생산한 수정란으로 태어날 F1 개체의 DNA 분석을 통한 친자감별을 이용해 혈통 검증을 실시하기 위해 예비 실험을 실시하여 100% 친자를 확인하였고 친자감별 시 Package for the Analysis of Parental allocation 검증 방식을 적용한 PAPA 2.0 프로그램을 이용하여 검증을 실시하였다(그림 9).



OFFSPRING	MALE	FEMALE
LK-39	K5-6	L5-41
LK-42	K5-6	L5-41
LK-43	K5-21	L5-34
LK-45	K5-21	L5-34
LK-48	K5-21	L5-34
LK-49	K5-21	L5-34
LK-50	K5-21	L5-34
LK-53	K5-15	L5-21
LK-56	K5-15	L5-27
LK-57	K5-15	L5-21
LK-59	K5-15	L5-21
LK-60	K5-15	L5-21
LK-63	K5-6	L5-89
LK-64	K5-6	L5-89
LK-66	K5-6	L5-89
LK-69	K5-6	L5-89
LK-71	K5-7	L5-27
LK-72	K5-7	L5-27
LK-74	K5-7	L5-27
LK-75	K5-7	L5-27

그림 9. 친자감별 프로그램 PAPA 2.0 모식도.

○ Data Base구축으로 조기선발체계 구축

고등등록우의 경우 후대에 1등급 한우를 생산할 수 있는 기초 유전자를 가진 한우이다. 이러한 고등등록우를 조기에 발굴 선발하여 지속적으로 관리하는 시스템을 갖춘다면 축산농가 뿐만 아니라 국가적으로도 큰 이점이 있을 것으로 판단된다. 따라서 지속적으로 고등등록우의 조기발굴에 노력해야 할 것이며, 발굴된 고등등록우를 상기 사용된 초위성체(Microsatellite, MS) 마커를 이용해 대립유전자형을 분석하여 D/B 구축하여 지속적으로 관리하는 시스템을 구축하고자 한다. 또한, 발굴된 고등등록우를 이용하여 OPU유래 체내난자를 회수하여 수정란 생산 시 상기 유전자 마커를 활용하여 개체 추적 시스템을 구축할 수 있다.

[제3세부과제] 체내유래 수정란이식효율 향상기술 개발 (김해축협)

○ 유산예방 등 임신유지 위한 사육환경 연구

수정란이식은 임신 후에 높은 유산율이 가장 큰 문제가 되고 있다. 따라서 임신된 소의 10% 이상 유산이 발생되고 있는 농장에서는 유산의 원인을 정확하게 밝혀야 할 것이며, 유산 피해가 많이 않는 농장에서도 감염성 유산에 대한 질병관리를 위하여 예방약 접종, 인공수정, 위생 관리수준 향상, 질병발병 시 신속한 조치 및 치료 등이 필요하다.

본 팀에서는 발정확인 후 7~8일째 수정란이식을 실시하였는데 수정란이식 1일전에 황체형성 등을 확인 후 최종적으로 수란우로 선발 활용하는 과정에서 예방약을 접종하였다. 이 후 수정란 이식을 실시하는 과정에서 외음부의 분뇨를 1차로 70% 알콜로 세척하고, 2차로 베타딘을 20%로 희석하여 깨끗이 소독 후에 수정란이식 기구를 마찬가지로 1차, 2차 세척을 하여 수정란을 셋팅 후에 외음부에 주입을 하였다. 표 1과 같이 이식한 대리모에 대해서는 자연교배나

인공수정, 수정란 이식을 통해 전염되는 캄필로박터 감염증, 트리코모나스병 등과 같은 균에 대해서 정기적인 검사를 실시 하였다. 또한 부르셀라병, 렙토스피라병, IBR, BVD 등과 같이 젖소의 다른 기관에 감염된 뒤 생식기에 감염되는 질병을 예방하기 위해서 외부 소를 구입시에 구입하려고 하는 농장의 유산 발생 현황을 파악하고 질병검사를 통해서 구입하도록 하였다. 이러한 개념은 농장의 위생관리수준을 향상시켜서 외부 오염원으로의 감염을 막는 것으로써 본 연구팀의 이식 후 임신된 소에서는 유산된 소가 발생하지 않았다.

표 1. 유산을 유발할 수 있는 질병의 진단부위 및 백신유무

질병명	진단부위	백신	일반적 발생시기
부르셀라병	혈액, 태아와 태반	있음	임신 7-9개월
렙토스피라병	혈액, 태아와 태반	있음	임신 7-9개월
캄필로박터감염증	태아와 태반	없음	임신 2-6개월
트리코모나스병	질 배출물	없음	임신 2-6개월
BVD	혈액, 태아와 태반	있음	일정하지 않음
네오스포라병	혈액과 뇌조직	없음	임신 5-7개월
마이코플라스마병	태아와 태반	없음	임신 6-9개월
리스테리아병	태아와 태반	없음	임신 6-9개월
살모넬라병	태아	없음	임신 6-9개월
파라인플라엔자3형	추혈	있음	일정하지 않음

○ 호르몬투여, 사료보조제 투여 등 임신유지 방안 연구

농가에서는 감염성 유산에 대한 질병관리를 위하여 예방약 접종, 인공수정, 위생관리수준 향상, 질병발병 시 신속한 조치 및 치료 등을 실시하는 동시에 수정란 이식 전에 대리모의 질병 및 건강을 좋은 상태로 유지하는 것 또한 중요하다고 판단되어 이식 전 2개월동안 사료와 함께 조사료를 급여하였다. 인공수정 시 수정률을 높여주었다고 보고가 된 *B-carotene* 제재를 1일 1두에 사료와 함께 100 g을 2개월간 섭취를 시킨 후 수정란이식을 실시하여 수정란이식 시 수태율 향상도 함께 도모하였다. 사료보조제를 섭취한 대리모는 정확한 주기에 발정이 관찰되었으며 수정란이식 하루 전 황체검사 시에도 양호한 황체상태를 점검하였다. 또한 임신감정 후 유산된 개체는 없었다.

표 2. 수정란이식 후 수태율에 관련된 데이터

이식횟수	총 이식두수	임신두수	재발정 두수	수태률(%)
1차이식	65	33	32	50.8
2차이식	32	18	14	56.3
3차이식	14	5	9	35.7
4차이식	9	5	4	55.6
5차이식	4	4	0	100
계	124	65	-	52.4

- * 수정란이식은 1두에 1개의 수정란을 이식하였음.
- * 발정발현 후 7~8일째 이식을 실시하였음.
- * 대리모의 황체형성 등의 판단에 의해 미흡할 때는 수정란을 동결보존 하였음.

○ 1세대 산자의 사육환경 조성

수정란이식에 의해 생산된 송아지의 관리를 위해 분만실을 구축하였다. 분만 1주일 전부터 대리모는 분만실로 이동하여 분만 후 약 2주동안 생활하게 된다. 겨울철 분만 시 설사예방과 온도유지 등의 목적으로 분만실에 보일러 시스템을 갖추었다. 송아지의 설사는 폐사의 가장 큰 원인으로 생각되어 특히 설사예방을 위해 분만실 바닥에 항상 적정 온도를 유지하기 위해 보일러가 항상 건조를 시설을 설치하였다. 이것은 궁극적으로 바닥의 온도를 유지함으로써 깔짚이 항상 건조한 상태를 유지할 수 있고 송아지의 배가 따뜻하게 유지하여 설사예방에 큰 효과를 보였다. 또한 분만 1시간 이내에 반드시 초유를 급여하는 것은 매우 중요하였다.

5. 3차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
지속적인 공란우 선발 이용	고등등록우로서 후대검증에 의한 A1++ 성적을 얻은 공란우를 우선적으로 선정하여 체형심사, 초음파검사, Body Score, 번식기 질병 감염 여부 및 예방접종 등에 문제가 없는 개체 3두를 최종적으로 공란우로 선정하고 본 연구실에서 채란하여 수정란을 생산하여 개체별로 효율을 조사하였다.	고등등록우 중에서 후대검정을 통해 자손의 비육 출하 성적이 A1++ 등급을 획득한 경험이 있는 암소를 최우선적으로 선발하였다. 또한 직장검사에 의한 난소, 자궁 등의 번식기계의 상태와 비만도를 체크할 수 있는 body score, 질병감염 등의 기록을 검토하여 최종선발 이용하였다. 이때 암소의 임신여부 등을 판단하여 4두를 선발하려 하였으나 구제역으로 인하여 3두만을 선발하여 본 연구실에서 1주일에 2회씩 약 3~4회 채란을 하여 채취된 난자의 회수율과 난자등급을, 수정란 생산 개수 등을 비교분석하였다.
생산된 1세대 암소로부터 공란우 조기선발 가능성 조사	생산된 암송아지를 공란우로의 활용은 특수한 목적을 가진 소가 아닌 이상 그 의미가 없는 것으로 판단되어 성숙 후 선발 활용하는 것이 바람직하다고 판단 공란우로서의 능력을 조사하고자 하였다.	생산된 1세대 산자는 1차년도에 이식한 53두에서 33두의 산자가 생산되었다. 생산된 산자 33두는 수송아지 20두, 암송아지 13두였으며, 13두의 암송아지에 대하여 공란우 조기선발 가능성을 조사하려 하였으나, 성숙 기간까지 도달하지 못한 관계로 2012년 2월 이후 조사를 실시하기로 하였다.
OPU 방법을 통해 채취된 난자의 등급 향상 연구	체내유래 난자의 등급을 향상시키기 위하여 지속성 비타민을 투여하여 1,2등급 난자의 회수율을 높이기 위하여 연구하였음.	지속성 비타민 E(2회 채란 당 5ml)와 사료첨가제(1일 100g)를 주기적으로 투여하여 1,2등급의 비율을 높이고자 하였음. 또한 사료 첨가제를 지속적으로 급여하여 난자의 등급 향상을 연구하였다. 연구결과 개체별에 따른 난자의 등급향상은 개체에 따른 차이를 보였으나 전체적으로 1,2등급의 비율이 상승함을 확인함.
체내유래 수정란 대량생산 체계 정립 및 체계화	체내유래 수정란 대량생산 체계를 정립, 체계화 하기 위하여, 지속성 비타민 E를 투여 한 후, 난자의 회수율, 수정란 생산율, 생산된 수정란의 등급을 조사하였다.	공란우의 상태에 따라 주 2회 난자를 채취하였으며 채취된 난자에서 수정란까지의 생산비율을 상승시키고자 배양체계를 정립하고자 비타민 E를 투여(2회 채란 시 5ml)하여 수정란 생산에 도입 한 결과, 수정란의 1회 생산량이 비투여하였을 때 보다 약 2배 가까지 증가하였으며, 수정란의 등급이 향상된 것을 확인하였다.
체내유래 수정란	비타민 E 투여를 통하여 OPU 채란 시 난포의 형성과	비타민 E 투여 시 난포 형성과 회수된 수정란의 등급에는 개체에 따른 차이를 보였으나,

품질향상과 분자적 분석방법 개발	난자의 회수 및 수정란의 등급향상시키고자 하였다.	배발달율과 생산된 수정란의 등급은 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 차후 체내유래 수정란 생산 시 비타민 E를 이용하면 수정란의 품질이 향상될 것으로 기대된다
체내유래 수정란의 산업화를 위한 동결방법 연구 및 액체질소로부터 오염방지를 위한 방안 기술 개발	유리화동결보존기술을 이용한 동결수정란이 액체질소에 그대로 넣어두게 되면 저장된 수정란 안으로 액체질소가 침투할 수 있고 액체질소 오염 시에는 바이러스나 병원균에 의해 수정란이 전염될 수 있다. 이에 대한 방안을 연구.	본 연구실에서는 유리화동결보존기술(Vitrification method)을 이용하여 잉여수정란을 동결보존 하였으며, 용해 후에 이식을 실시하였음. 액체질소에 의한 바이러스 및 병원균에 의한 오염으로부터 수정란을 보호하기 위한 방법을 연구하여 동결된 수정란을 동결튜브에 보관, 액체질소와 완벽히 격리하는 방법을 개발하였음
개체별 인식기준 설정	쇠고기 이력추적에 활용되는 초위성체(Microsatellite, MS) 마커를 이용해 DNA 분석을 통해 얻은 대립유전자형을 기준으로 개체별 인식기준 설정	수정란을 만들기 위해 사용된 종모축과 공란우를 대상으로 11종의 초위성체(Microsatellite, MS) 마커와 2종의 성감별 마커를 이용해 대립유전자형 분석하여 각각의 개체를 인식
각 수정란별 증명서 발급	종모축 및 공란우에 대해 초위성체(Microsatellite, MS) 마커를 이용해 각 수정란의 진위를 분석하여 증명서 발급	수정란을 만들기 위해 사용된 종모축과 공란우의 DNA를 각각 추출 추출된 DNA를 이용하여 대립유전자형을 분석하기 위해 Multiplex PCR 방법으로 유전자형 증폭 염기서열 분석장치 활용해 대립유전자형 분석 후 분석결과를 이용해 친자확인 방법으로 공란우의 진위를 확인후 증명서 발급
생산된 암송아지에서 조기 공란우 후보축 선발	경제형질의 유전력 등을 기준으로 최종 후보 공란우를 선정	경제형질의 유전력 등을 기준으로 선발된 공란우 후보개체 중 번식능력 등을 고려하여 최종 선발
농가별 수정란이식 수태율을 조사하여 차이점 비교	2농가를 선정하여 각 농가의 수태율을 조사하고 그에 따른 농가의 차이점을 분석 및 개선.	2농가를 선정(A, B농가)하여 각 농가의 수태율을 조사하고 농가의 사양관리 등의 차이점을 분석하려 하였으나 구제역으로 인하여 2012년 2월에 임신감정 예정이다.
사료보조제 투여, 대리모 사료비 등을	사료보조제 투여 여부에 따른 수태율을 조사하고 사료첨가제의 효율성을 검증하여	선정된 2농가에 사료첨가제 투여군과 비투여군으로 나누어 이식을 실시하였으며 구제역으로 인하여 2012년 2월에 임신감정 예정이다.

통한 수태율 향상 방안 연구	수태율 향상을 연구	
1세대 산자의 능력검증	1차년도에 생산된 산자의 체형, 육종가, 초음파검사 등을 측정하여 능력을 검증	1차년도에 53두의 대리모에 이식을 실시하여 생산된 산자(암 : 13두, 수 :20두)의 능력을 검증하기 위하여 체형, 육종가, 초음파 검사를 실시할 예정이었으나 17개월령 이전에는 예측이 어려워 2012년 2월 이후 측정하여 OPU 유래 수정란 이식의 효율성을 검증할 예정

6. 3차년도 세부연구수행 결과(자유기술)

[제1세부과제] 체내유래 수정란 생산체계 확립

○ 지속적인 공란우 선발 이용

2010년 10월부터 2011년 4월까지 전국적인 구제역 발생으로 채란 및 이식을 일시 중단하였다. 이후 구제역 전파에 대한 위험 때문에 공란우 선발이 힘들었으며, 구제역이 종료된 후에도 농가들의 구제역에 대한 우려 때문에 8월부터 OPU 기술을 이용하여 수정란을 생산하였다. 공란우는 총 3두를 선발하여 실시하였으며 3차년도에 활용되는 공란우는 3두를 활용하였다(그림 1). 이들의 선발을 위해서 공란우는 고등등록우로서 정상적인 번식능력을 가지고 있으면서 특히 감염성 질병이 없으며 번식기관의 능력에 문제가 없는 개체를 선발 활용하였고 항시 3두를 OPU 작업에 활용하고 있다. 이들의 선정은 실제 이식 후 산자의 생산하였을 때 고능력, 고급육을 생산할 수 있는 후보축이어야 하는 관계로 매우 엄격한 기준에 의해 후대검증 자료로서 비육 출하성적이 A1++ 성적을 얻은 경험이 있는 고등등록우 3두를 선발하였다. 그러나 아무리 좋은 개체일지라도 OPU 채란, 수정란 생산과정에서의 개체별로 차이가 있기 때문에 1주일에 2회 채란하는 방법으로 약 3-4회 난자를 채취하여 OPU 채취과정에서의 문제점, 난자의 회수 숫자, 수정란 생산에 활용할 수 있는 1,2등급의 난자 수, 체외수정란의 생산효율 등을 점검하여 수정란을 생산, 이식에 사용하였다.

등록번호	등록구분	생년월일	명호(이름)	개계식별번호	성별	등록일
221729580	고등	2003-05-10	서진09-01-0069	000175845339	남	2003-09-25
구분	장액번호 / 영호	생년월일	개계식별번호	등록구분	등록번호	
r 조부	KPN123	1989-09-13	000150167819	기초	211200750	
부	KPN273	1995-08-24	000150168922	고등	221204509	
나 조모	서산11-616	1991-03-15	000120550604	말동	221044584	
r 외조부						
모	서진03-00-0052	1999-08-16	000137880169	기초	211751103	
나 외조모						
번식자 성명	유철근	번식자 주소	경남 서산시 옥동면 사다리			
소유자 성명	유철근	소유자 주소	경남 서산시 옥동면 사다리			

특징

모색	면선	대선	배선	봉	기타
황	중	결	결	상방	

개체유전능력

구분	년도체중(kg)	배위장근단면적(cm²)	등지방두께	근내지방도(점)
유전능력 (EPD)A	6.65	0.67	0.97	-0.2
	A	C	D	D

체형 및 심사성적

목적부위	체고	체장	흉심	좌골폭	중합평가					
육종기코드	D	C	C	C						
심사부위	체적 균형	지골 골위	머리 목	전구 중구	우구 엉덩이	넙적 다리	유기 성기	지개 모양	심사 점수	
육종기코드	C	C	C	C	D	D	C	B	C	77.43

등록번호	등록구분	생년월일	명호(이름)	개계식별번호	성별	등록일
223280182	고등	2006-06-16	경주06-01-0099	000198544463	남	2006-07-18
구분	장액번호 / 영호	생년월일	개계식별번호	등록구분	등록번호	
r 조부	KPN171	1990-12-17		말동	221044575	
부	KPN374	1998-01-01	000143351203	고등	221023808	
나 조모	의성11913-44	1991-11-20	000162880518	고등	221047312	
r 외조부						
모	경주02-00-3615	2000-01-01	000152536151	기초	211887310	
나 외조모						
번식자 성명	이영태	번식자 주소	경북 경주시 신내면 내일리 896			
소유자 성명	공순호	소유자 주소	경남 창원군 영신면 옥사리 561-1			

특징

모색	면선	대선	배선	봉	기타
황	결	양	중	일	

개체유전능력

구분	년도체중(kg)	배위장근단면적(cm²)	등지방두께	근내지방도(점)
유전능력 (EPD)A	-2.99	-0.38	0.27	0.11
	D	D	D	D

체형 및 심사성적

목적부위	체고	체장	흉심	좌골폭	중합평가					
육종기코드	C	C	A	B						
심사부위	체적 균형	지골 골위	머리 목	전구 중구	우구 엉덩이	넙적 다리	유기 성기	지개 모양	심사 점수	
육종기코드	A	A	A	A	A	A	A	B	C	80.19

등록번호	등록구분	생년월일	명호(이름)	개계식별번호	성별	등록일
224128896	말동	2008-07-10	고형08-01-2958	002034529586	남	2008-12-19
구분	장액번호 / 영호	생년월일	개계식별번호	등록구분	등록번호	
r 조부	KPN249	1994-08-21	000150168683	고등	221172345	
부	KPN595	2001-08-04	000168193617	고등	221514822	
나 조모	마산98-01-S244	1998-04-20	000143052447	고등	221542285	
r 외조부						
모	고형07-00-3316	2006-01-01	000202833161	기초	241112259	
나 외조모						
번식자 성명	이준복	번식자 주소	경북 고령군 상림면 용리 947			
소유자 성명	이준복	소유자 주소	경북 고령군 상림면 용리 947			

특징

모색	면선	대선	배선	봉	기타
황	상	우	전		

개체유전능력

구분	년도체중(kg)	배위장근단면적(cm²)	등지방두께	근내지방도(점)
유전능력 (EPD)A	0.7	1.31	-0.19	0.21
	C	B	B	D

체형 및 심사성적

목적부위	체고	체장	흉심	좌골폭	중합평가				
육종기코드									
심사부위	체적 균형	지골 골위	머리 목	전구 중구	우구 엉덩이	넙적 다리	유기 성기	지개 모양	심사 점수
육종기코드									

그림 1. 3차년도 한우 고등등록우 OPU 유래 체내 난자 공란우 정보.

○ 생산된 1세대 암소로부터 공란우 조기선발 가능성 조사

1차년도에 생산된 수정란을 이용하여 이식 후 태어난 산자의 공란우의 활용여부를 조사하고자 하였다. 이식한 대리모 53두에서 생산된 산자는 총 33두가 생산되었으며, 그 중 20두의 수송아지를 제외한 13두의 암송아지에 대하여 조사하고자 하였다(그림 2). 하지만 암송아지의 성숙이 도달하지 못한 관계로 조사를 하지 못하였다.



그림 2. 1차년도 수정란 이식으로 태어난 송아지

○ OPU 방법을 통해 채취된 난자의 등급향상 연구

1,2차년도 연구결과에서 OPU 유래 체내 난자를 채취함에 있어서 최초 채란 이후 OPU 작업 시 채란율이 저하되고, 난자의 등급 또한 저하되므로 이를 높이기 위하여 지속성 비타민 E와 사료첨가제를 통하여 채란율과 난자의 등급 향상을 위하여 연구하였다.

지속성 비타민 E와 사료첨가제 투여 시 평균 생산개수에서는 개체별로 차이를 보였으며, 전체적인 난자의 등급은 상승하는 것을 보였다. 회수된 난자의 등급별 평균은 다음과 같다. 난자의 등급별 평균은 개체에 따른 차이를 보였다.

비타민 E 투여 전후 회수된 난자의 등급율은 표 1에 나타내었다. 개체에 따른 난자의 등급율은 4446, 4533 공란우에서 1등급 난자의 비율이 비타민 E와 사료첨가제 투여군에서 32%, 41%로 유의적으로 높았으나, 2956 공란우는 비투여군에서 37%로 높은 것을 알 수 있었다. 4등급 난자 개수는 4446 공란우가 투여군과 비투여군 모두 1.19 ± 1.76 , 1.50 ± 1.90 로 다른 개체에 비하여 유의적으로 높은 것을 알 수 있었다. 1등급난자의 개수는 2956 공란우가 투여군(4.70 ± 4.22), 비투여군(4.29 ± 2.98) 모두 다른 개체에 비하여 높았다. 비타민 E와 사료첨가제 투여군에서 비율은 낮았으나, 1등급 난자의 개수는 높은 것을 알 수 있었다.

표 1. 개체별 난자 등급

	개체번호	난자 등급(%) (mean±SEM)				
		1등급	2등급	3등급	4등급	총계
비타민 E 비투여	4446	29 (28) (1.81±1.05)	18 (18) (1.13±1.15)	36 (35) (2.25±1.69)	19 (19) (1.19±1.76)	102 (6.37±3.56)
	2956	30 (37) (4.29±2.98)	21 (26) (3.00±0.58)	26 (32) (3.71±2.21)	4 (5) (0.57±0.79)	79 (11.2±3.90)
	4533	47 (30) (2.76±1.99)	42 (27) (2.47±2.03)	58 (37) (3.41±2.00)	9 (6) (0.53±0.80)	156 (9.18±4.41)
비타민 E 투여	4446	18 (32) (1.80±1.62)	6 (11) (0.60±0.70)	17 (30) (1.70±1.57)	15 (27) (1.50±1.90)	56 (5.60±3.27)
	2956	47 (33) (4.70±4.22)	44 (30) (4.40±3.17)	46 (31) (4.60±2.99)	7 (5) (0.70±1.49)	145 (14.50±5.56)
	4533	35 (41) (3.50±3.06)	23 (27) (2.30±2.21)	21 (25) (2.10±2.02)	6 (7) (0.60±1.07)	85 (8.50±4.60)

회수된 난자에서 1,2등급 평균 등급별 평균은 개체에 따른 차이를 보였다.

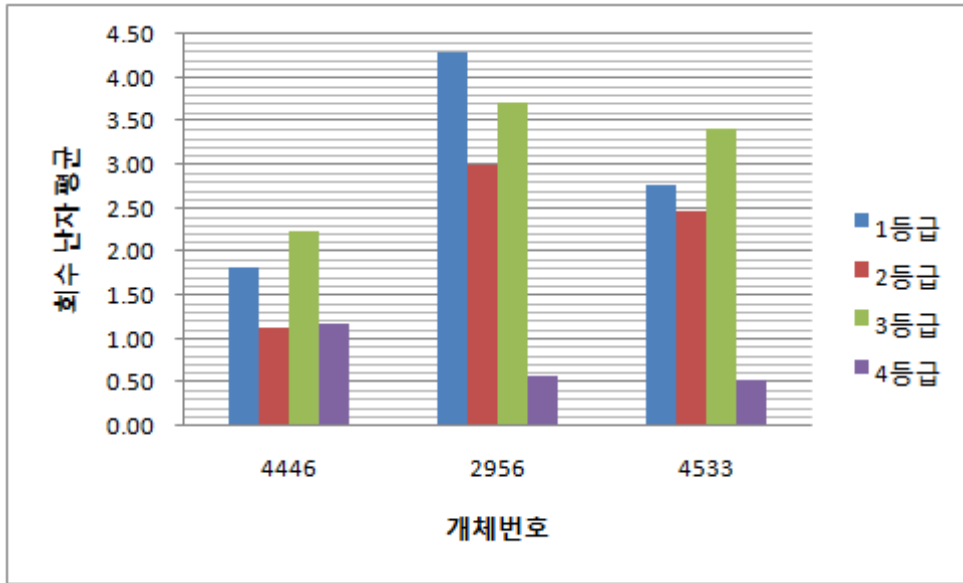


그림 3. 비타민 E와 사료첨가제 비투여 시 회수된 난자의 평균 등급

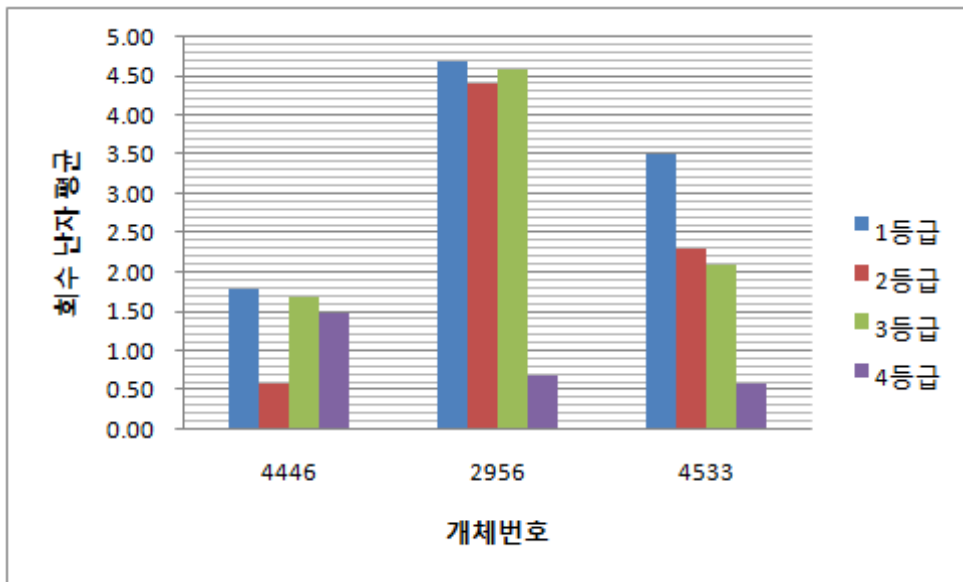


그림 4. 비타민 E와 사료첨가제 투여 시 회수된 난자의 평균 등급

○ 체내유래 수정란 대량생산 체계 정립 및 체계화

OPU 기법을 이용한 체내유래 수정란의 생산은 우수한 형질을 보유한 암소로부터 다수의 난자를 회수하여 수정란을 생산하는 기법으로 선발강도가 높고, 기존의 과배란 처리방법에 의한 수정란 생산보다 많은 수의 수정란을 생산할 수 있다. 또한 4개월 채란 후 휴지기 없이 인공수정을 통한 수태가 가능하다. 이러한 이유로 분만 이후 다시 채란을 할 수 있는 장점이 있고, 그에 따라 우수한 형질의 난자를 계속적으로 생산이 가능하므로 경제적이다.

이에 본 연구실에서는 우수한 수정란의 대량생산을 위하여 질 좋은 난자를 회수하기 위하여 비타민 E를 투여하여 1,2등급의 난자 회수율의 상승을 연구하였다. 비타민 E는 생식기능 및

근기능을 향상시키며 부족하면 생식기능저하, 무정자, 유산, 불임증을 유발하는 것으로 알려졌다. 이에 본 연구실에서는 OPU 채란시 생식기능을 증진시켜 난자의 채란율을 높이고 생산되는 수정란의 등급 향상을 위하여 수행하였다.

(1) 지속형 비타민 E 투여 전후 난포형성과 채란율

비타민 E 투여 전후 개체에 따른 난포 생성율은 표 2에서 나타내었다. 2956, 4533 번이 비타민 E 비투여군 21.4 ± 5.9 , 18.0 ± 3.4 보다 투여군 23.8 ± 7.3 , 20.5 ± 5.9 이 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), 4446번은 투여군 14.8 ± 4.2 보다 12.2 ± 3.7 으로 유의적으로 낮았다($p < 0.05$)(그림 5).

표 2. 개체별 난포 생성 수

	개체번호	채란 횟수	난포 생성수 (mean±SEM)
비타민 E 비투여	4446	16	236 (14.8 ± 4.2)
	2956	7	150 (21.4 ± 5.9)
	4533	17	288 (18.0 ± 3.4)
비타민 E 투여	4446	10	122 (12.2 ± 3.7)
	2956	10	238 (23.8 ± 7.3)
	4533	10	205 (20.5 ± 5.9)

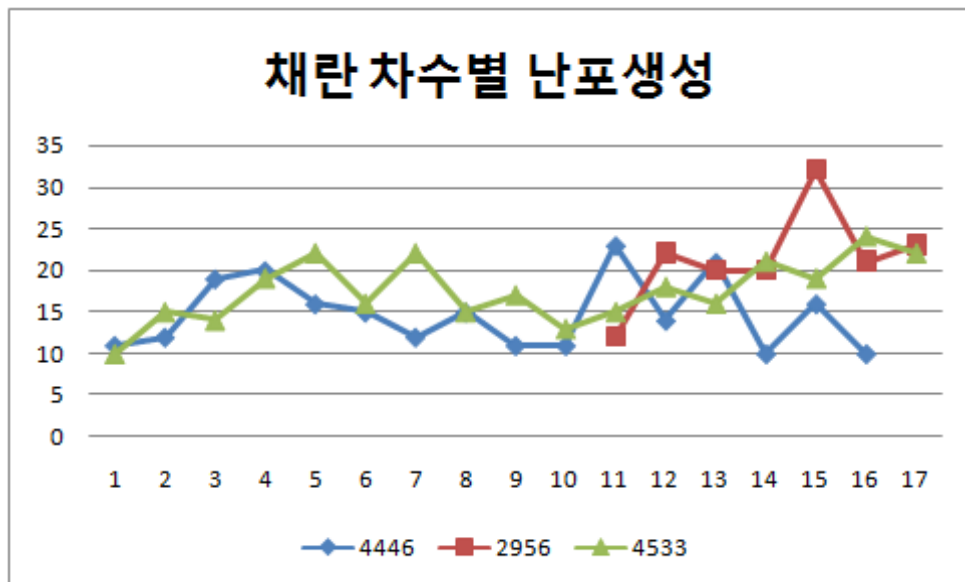


그림 5. 비타민 E 투여전 난포생성

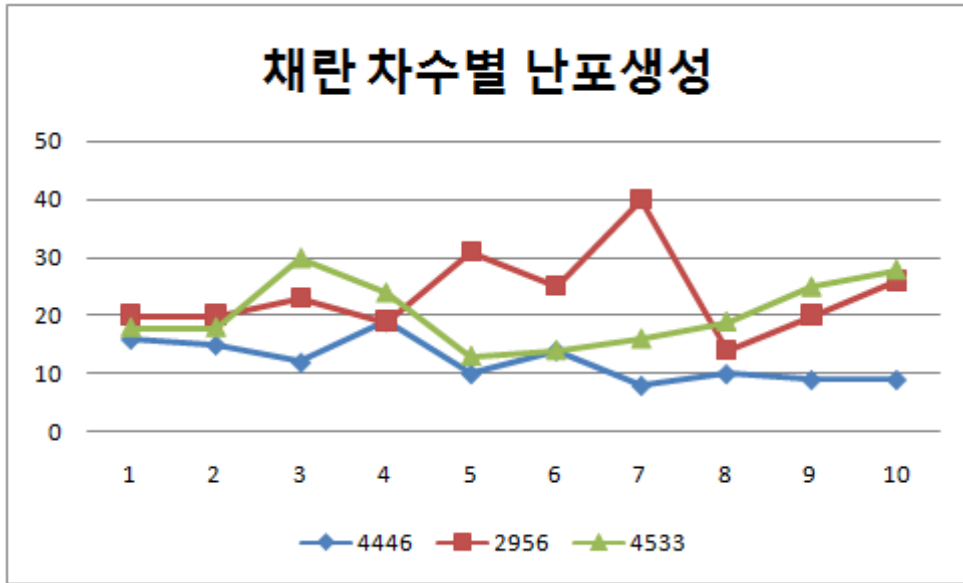


그림 6. 비타민 E 투여 후 난포생성

비타민 E 투여에 따른 난자 회수율은 표 3에 나타내었다. 개체에 따른 난자 회수 개수는 2956 공란우가 비타민 E 투여군에서 14.5 ± 5.6 로 유의적으로 높았으며, 4446 공란우는 투여여부에 관계없이 유의적으로 낮은 것을 알 수 있었다. 난자 회수율에서는 4446, 2956 공란우가 비타민 E를 비투여 하였을 때 42.5%, 54.0% 보다 투여를 하였을 때 45.5%, 60.9%로 회수율이 높아졌으며, 4533 공란우에서는 오히려 비투여 50.8% 보다 투여 하였을 때 43.5%로 유의적으로 낮아진 것을 알 수 있었다(그림 7).

표 3. 개체별 회수 난자 등급 및 회수된 총 난자

	개체번호	난자 회수개수 (mean±SEM)	난자 회수율
비타민 E 비투여	4446	102 (6.4±3.6)	42.5
	2956	79 (11.3±3.9)	54.0
	4533	156 (9.2±4.4)	50.8
비타민 E 투여	4446	56 (5.6±3.3)	45.5
	2956	145 (14.5±5.6)	60.9
	4533	85 (8.5±4.6)	43.5

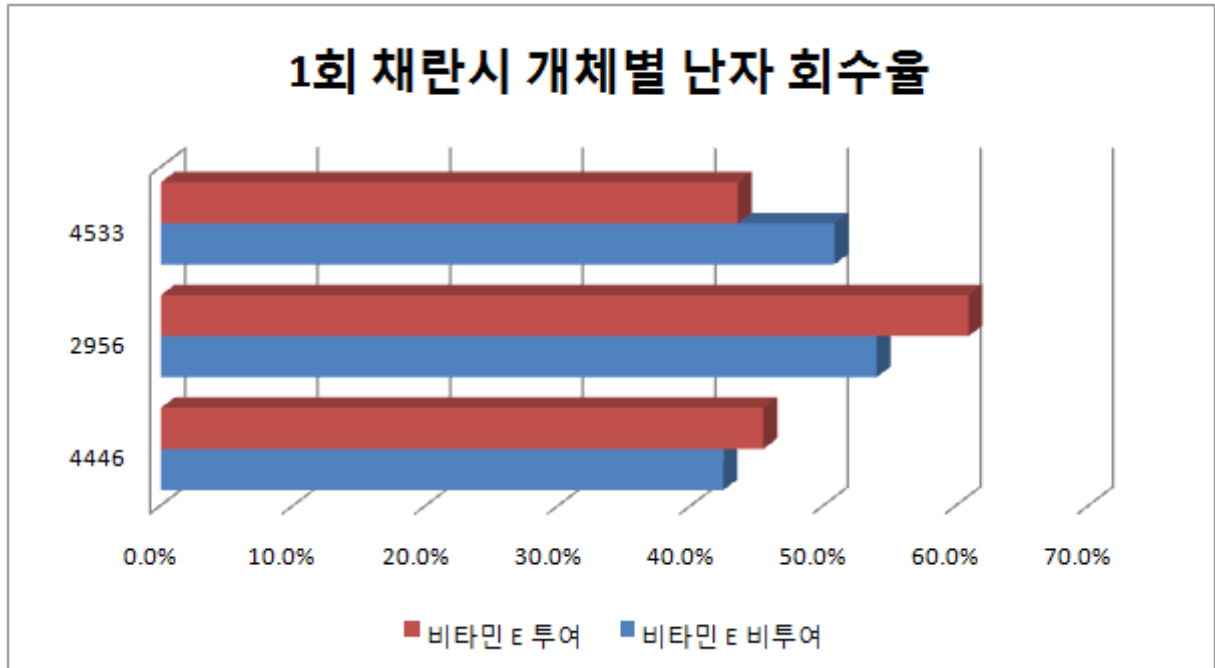


그림 7. 1회 채란 시 개체별 남자 회수율

(2) 지속형 비타민 E 투여 전후 수정란 생산율

개체에 따른 배발달율은 표 4에 나타내었다. 개체에 따른 배 발달율은 비타민을 투여하지 않은 처리구에서 4446, 2956, 4533 공란우가 각각 29.4%, 24.0%, 25.6% 를 나타내었으며, 비타민을 투여한 처리구에서는 각각 50.0%, 31.0%, 41.1%로 나타나 비타민을 투여하였을 경우 유의적으로 높게 나타났다. 2956 공란우는 비타민을 투여하였을 때 배 발달율이 다른 개체에 비하여 낮은 면이었으나, 1회 채란시 수정란 생산 수는 투여하지 않은 처리구 보다 약 2배의 생산효율을 보였다. 4533 공란우의 경우 수정율은 비타민을 투여하지 않은 처리구가 높았으나, 배발달율에서 비타민을 투여하여 채란 하였을 경우 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$).

표 4. 개체별 수정정율 및 배발달율

	개체번호	난자 수	수정율 (%)	배발달율 (%)	1회 채란시 수정란 생산 수
비타민 E 비투여	4446	102	66 (64.7)	30 (29.4)	1.9±1.6
	2956	79	47 (59.4)	19 (24.0)	2.7±1.8
	4533	156	115 (73.7)	40 (25.6)	2.4±3.6
비타민 E 투여	4446	56	42 (75.0)	28 (50.0)	3.1±2.0
	2956	145	103 (71.0)	45 (31.0)	5.0±3.4
	4533	85	50 (58.8)	35 (41.1)	4.0±2.0

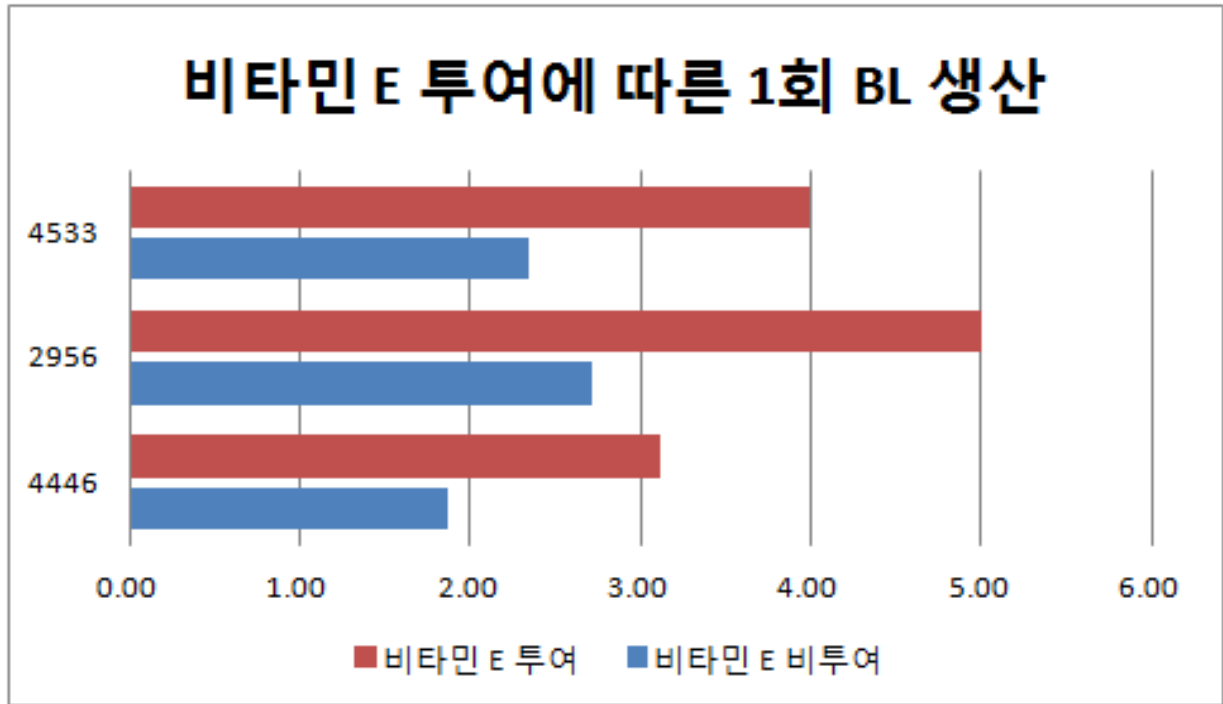


그림 8. 비타민 투여에 따른 1회 채란시 개체별 수정란 생산 수

OPU 유래 수정란의 개체별 등급은 다음의 표5와 같다. 수정란의 등급은 최상급을 A, 중간 등급을 B, 최하급을 C 등급으로 나누어 조사하였으며, 비타민 E를 투여하지 않았을 경우 B,C 등급의 수정란이 소량 생산 되었으나(그림 9), 비타민 E를 투여 하였을 경우 B,C 등급의 수정란이 생산(그림 10)되지 않았다. 특히 4533 개체의 경우 C등급의 수정란이 소량 생산되었으나, 비타민 E를 투여한 후 생산된 수정란에서는 A등급 수정란의 생산량이 늘고 B,C 등급의 수정란이 생산되지 않은 것으로 조사되었다.

이상의 결과를 보면 비타민 E를 투여하여 체내에서 난자를 생산 할 때 난포의 생성, 수정란의 회수, 난자의 등급에는 큰 영향이 없었으나, 배발달율에 있어서 난자의 등급향상이 있는 것으로 조사되었다. 또한 생산되는 수정란의 양이 증가하고, A등급의 질적 수준이 높은 난자가 많이 생산되므로 현재 진행되고 있는 체내유래 난자를 이용한 수정란의 생산에 큰 도움이 될 것으로 기대되며 이를 이용하여 우수한 개체에 투여, 수정란의 질적 향상 및 대량생산에 도움이 될 것으로 판단된다(그림 8-10).

표 5. 생산된 수정란의 개체별 등급

	개체번호	수정란 등급			
		A등급	B등급	C등급	총계
비타민 E 비투여	4446	28	2	0	30
	2956	18	1	0	19
	4533	35	2	3	40
비타민 E 투여	4446	28	0	0	28
	2956	45	0	0	45
	4533	28	0	0	28

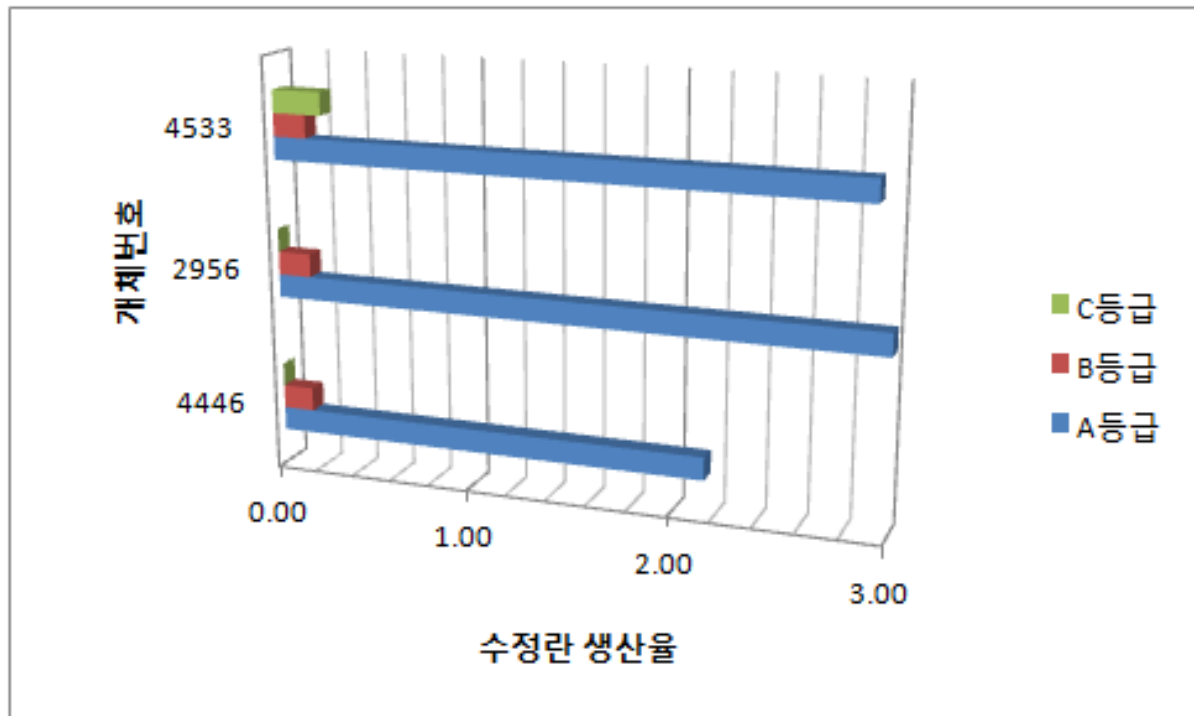


그림 9. 비타민 E 비투여 시 1회 생산된 수정란의 등급

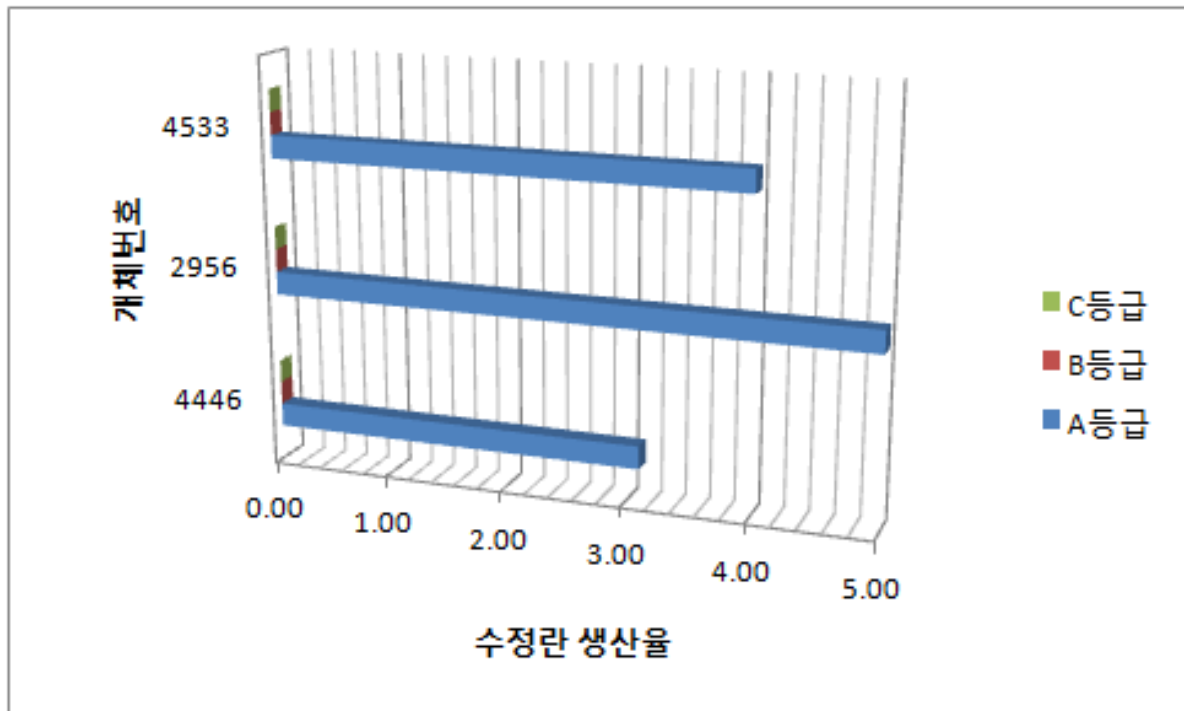


그림 10. 비타민 E 투여 시 1회 생산된 수정란의 등급

○ 체내유래 수정란의 산업화를 위한 동결방법 연구 및 액체질소로부터 오염방지를 위한 방안기술 개발

수정란이식기술의 산업화를 위해서는 반드시 해결되어야 할 부분이 있다. 수정란의 동결기술은 신선란 이식 후 잉여 수정란을 보존하는 방법으로 액체질소에 의한 동결기술이 보편적이며, 이는 수정란이식의 시간적 공간적 제약을 해결할 수 있는 방안으로 대두되고 있다. 수정란 동결이 동결정액을 이용하듯 활용하게 되면 발정 온 개체에 언제라도 이식이 가능하며 이에 본 연구실에서는 2차년도에 연구한 유리화동결보존기술(Vitrification method)을 이용하여 잉여수정란을 보관하였다. 하지만 동결수정란이 액체질소에 그대로 넣어두게 되면 저장된 수정란 안으로 액체질소가 침투할 수 있고 액체질소 오염 시에는 바이러스나 병원균에 의해 수정란이 전염될 수 있어 문제로 지적돼 왔다. 이에 액체질소로부터 오염방지를 위한 방안기술을 연구하였다.

동결튜브를 이용한 수정란 저장방법은 액체질소와의 직접적인 접촉을 피함으로 오염된 액체질소의 바이러스나 병원균을 완벽히 격리함으로 이식 후 수태율이 높을 것으로 기대된다.

[제2세부과제] 개체선발과 수정란인식체계 구축

○경제형질의 유전력 기준으로 공란우 선발기준 확립

경상남도 김해축협산하 고등등록우 중 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대로 선발기준 확립

- 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대로 선발기준 확립
- 선발기준에 적합한 공란우 개체 후보 선발

○개체별 수정란인식 및 증명서 발급기준 확립

- 제1세부과제에서 선발한 수소 2두와 암소 5두에 대해 한우 생산이력제 DNA 검사에 사용되는 초위성체(Microsatellite, MS)마커와 2쌍의 성감별용 마커를 사용하여 유전자지문검사를 실시해 한우 고급육생산을 위한 개체식별용 DNA 검사를 실시하여 개체별 수정란 인식 마커를 제작하고 산자 생산시 제작된 마커를 이용하여 DNA 검사후 증명서 발급이 필요하다. 표 1은 본 연구에서 개체식별을 위해 사용된 쇠고기 이력추적용 초위성체(Microsatellite, MS)마커와 성감별용 마커의 종류를 나타내었다. 그리고 표 2는 11종의 초위성체(Microsatellite, MS)마커를 이용할 경우 개체식별력과 친자확인률을 추정하여 나타내었다(그림 1-10).

표 1. 초위성체(Microsatellite, MS) 마커 및 성 감별용 마커 리스트

MS name	Label	Size (bp)	비 고
TGLA227	B(FAM)	76 ~ 104	
BM2113	B(FAM)	123 ~ 143	
TGLA53	B(FAM)	154 ~ 188	
ETH10	B(FAM)	212 ~ 224	
SPS115	B(FAM)	246 ~ 260	
TGLA126	G(VIC)	116 ~ 122	
TGLA122	G(VIC)	137 ~ 181	
INRA23	G(VIC)	196 ~ 222	
ETH3	Y(NED)	105 ~ 125	
ETH225	Y(NED)	141 ~ 159	
BM1824	Y(NED)	178 ~ 192	
BOV_X	R(PET)	118	
BOV_Y	R(PET)	242	

표 2. 11종 초위성체(Microsatellite, MS) 마커의 개체식별 및 친자확인률 예측치

Selected by	PI	$PI_{half-sibs}$	PE_{pu}	PE
11 MS	1.78×10^{-19}	1.04×10^{-12}	0.998165	0.999968

- 수정란 이식을 통해 생산된 10두의 송아지 모근을 이용해 Genomic DNA를 추출하였으며 추출된 Genomic DNA를 이용하여 쇠고기 이력추적에 사용되는 11종의 초위성체 (Microsatellite, MS)마커와 2쌍의 성감별용 마커를 이용하여 Multiplex PCR 방법을 이용해 한번에 대립유전자형을 증폭하여 염기서열 분석장치 (ABI3130x)를 이용하여 대립유전자형 분석을 위한 전기영동을 실시하였으며, 분석된 대립유전자형은 GeneMapper v4.0 프로그램을 이용하여 Allelic Ladder를 적용해 데이터를 보정하여 표준화 데이터 생성하였다(표 3).

표 3. 수정란 이식을 통해 생산된 송아지에 대한 13종의 DNA 마커 분석 결과(디지털 데이터)

개체번호	BM 1824		BM 2113		ETH10		ETH 225		ETH3		INRA 23		SPS 115		TGLA 122		TGLA 126		TGL A227		TGLA 53		Ch. X	Ch. Y
061187850	14	17	19	19	21	22	23	23	23	26	16	20	24	24	21	25	17	17	19	20	23	33	X	-
061187876	13	13	14	20	19	19	23	25	22	24	20	25	25	27	21	29	17	18	12	20	27	27	X	-
060371816	13	14	20	21	18	22	23	23	26	28	21	24	21	23	25	29	18	21	14	19	28	30	X	-
060371912	13	13	20	21	18	19	23	23	22	23	20	24	25	27	26	40	17	17	14	22	23	23	X	-
058860206	13	17	19	20	18	18	23	26	26	27	20	25	21	23	26	26	18	21	14	22	23	30	X	-
060371824	13	17	20	20	18	18	23	30	22	26	18	24	21	24	21	29	17	17	19	22	30	33	X	-
058806142	14	14	19	21	19	19	25	25	26	27	24	24	25	25	21	30	17	18	12	21	27	33	X	-
058806191	13	14	20	21	18	18	23	23	26	26	18	24	21	25	26	29	18	21	14	22	27	30	X	-
060371929	14	15	19	20	18	19	21	23	22	23	21	23	21	25	25	25	21	21	14	20	23	27	X	-
057024994	13	14	14	19	20	22	23	25	24	26	24	24	25	27	29	30	17	18	19	21	27	31	X	-

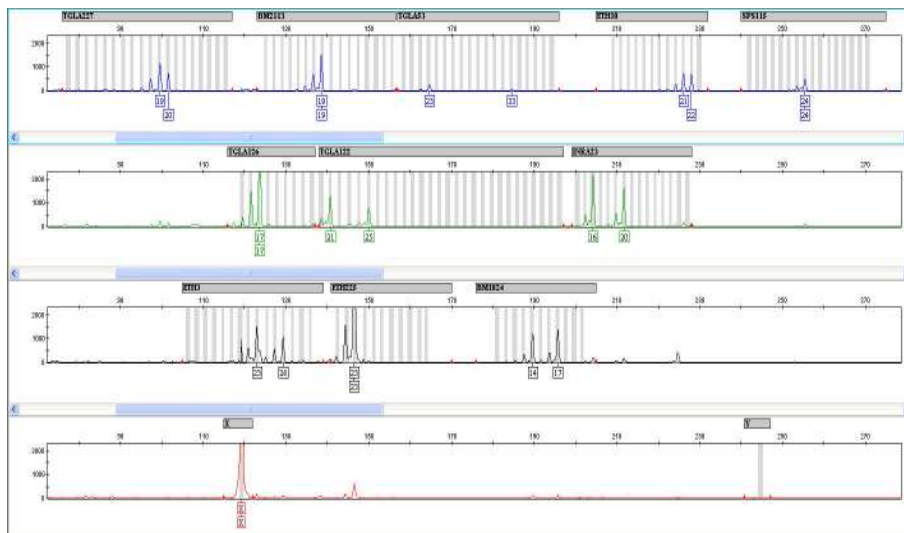


그림 1. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(061187850, 아날로그 데이터).

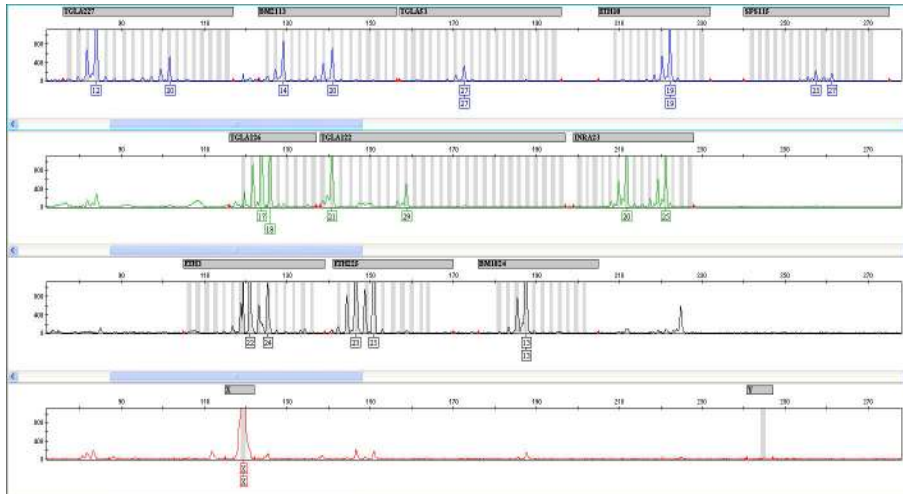


그림 2. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(061187876, 아날로그 데이터).

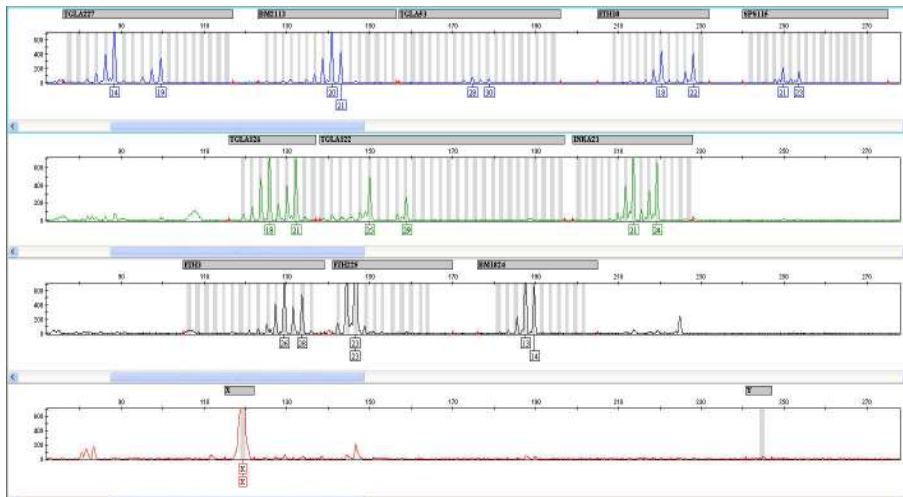


그림 3. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(060371816, 아날로그 데이터).

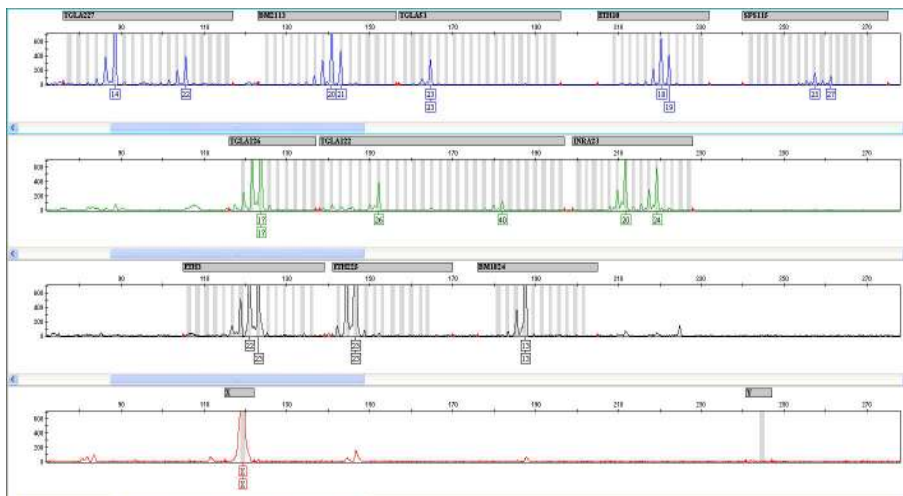


그림 4. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(060371912, 아날로그 데이터).

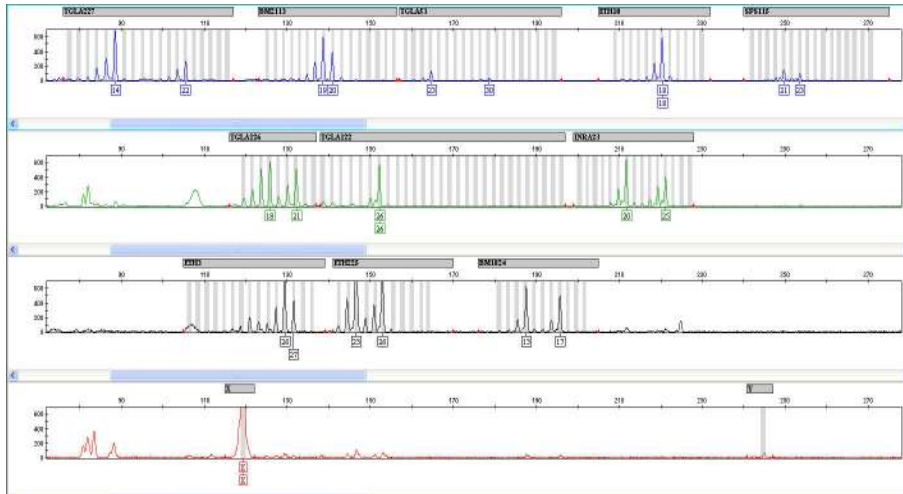


그림 5. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(058860206, 아날로그 데이터).

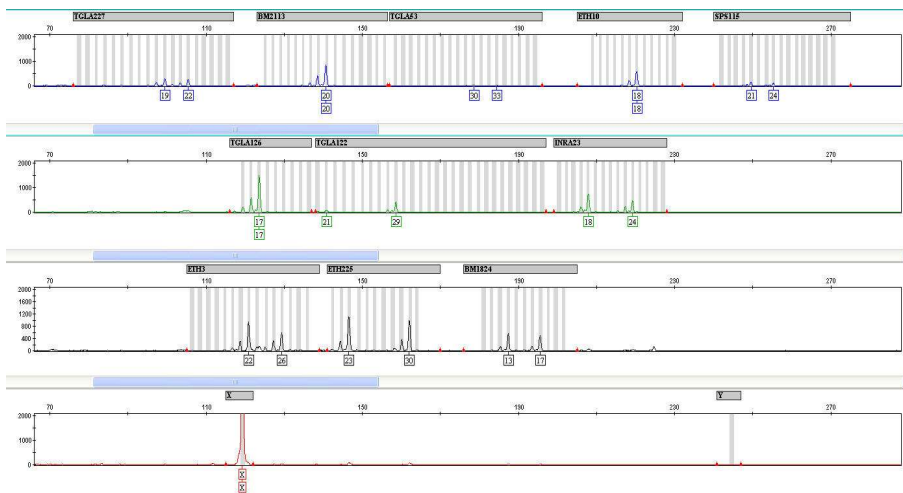


그림 6. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(060371824, 아날로그 데이터)

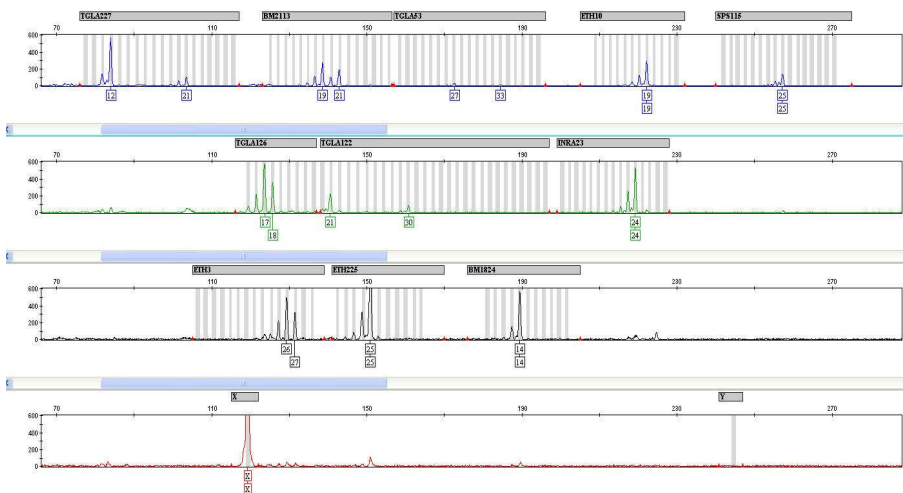


그림 7. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(058806142, 아날로그 데이터)

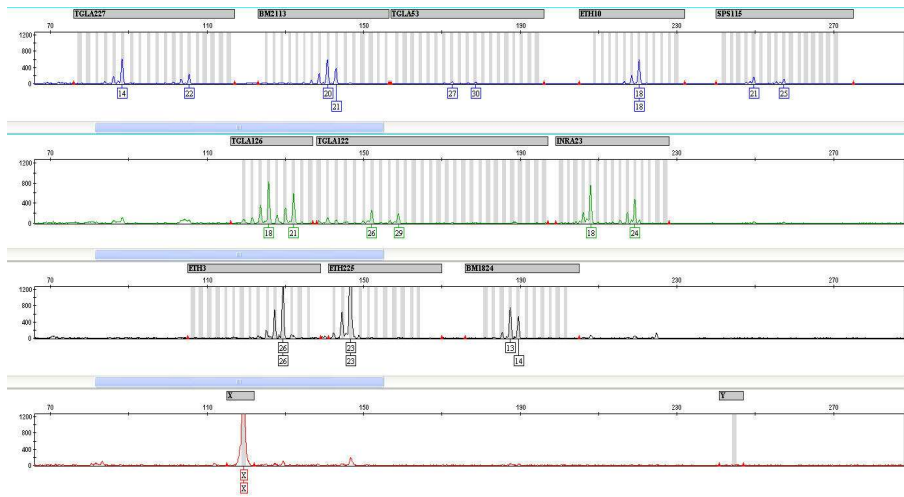


그림 8. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(058806191, 아날로그 데이터)

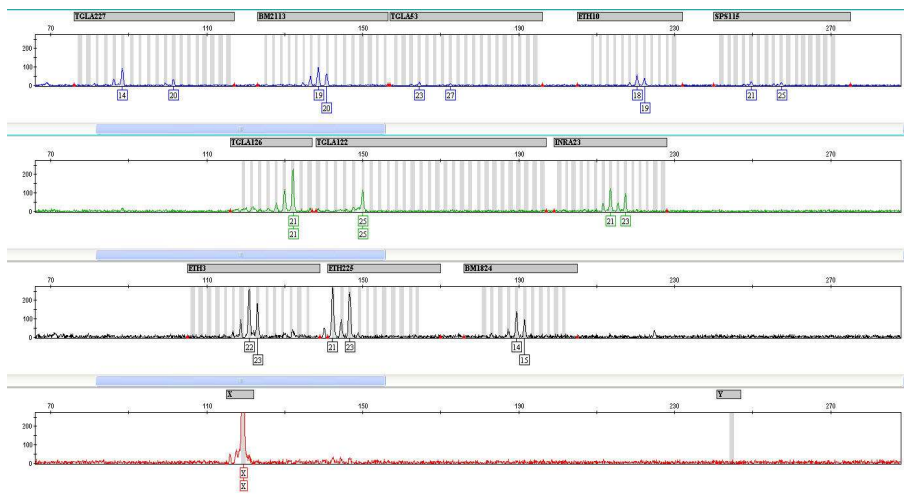


그림 9. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(060371929, 아날로그 데이터)

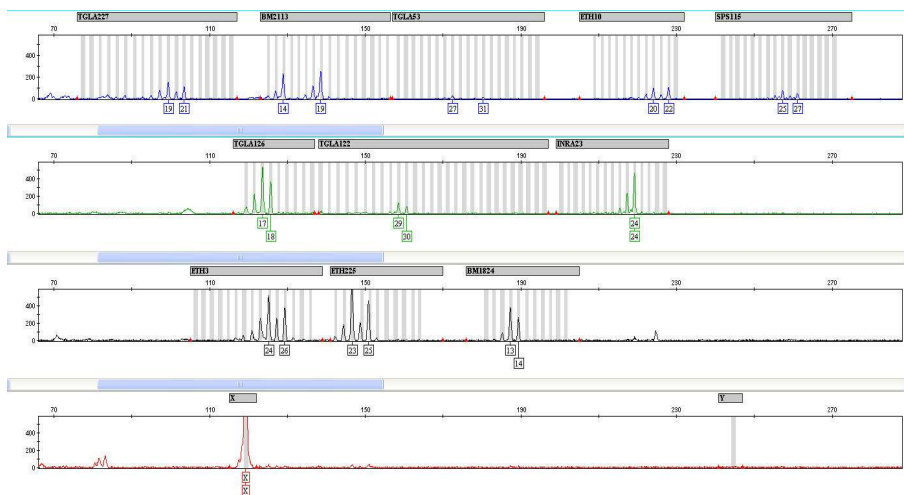


그림 10. 수정란 이식 송아지 대립유전자형 분석결과(057024994, 아날로그 데이터)

[제3세부과제] 체내유래 수정란이식효율 향상기술 개발 (김해축협)

○ 농가별 수정란이식 수태율을 조사하여 차이점 비교 및 사료보조제 투여 여부에 따른 수태율 향상방안 연구


농가별 수정란이식에 따른 수태율을 조사하기 위하여 2농가를 선정, 이식 후 임신감정을 실시할 예정이었다. 그러나 2010~2011년 사이 구제역으로 인하여 수정란 생산이 늦어짐에 따라 이식 후 임신감정은 실시하지 못하였다. 농가는 A농가와 B농가로 나누어 실시하였으며, 683 정액을 이용하여 수정란을 생산 A농가에 50두, B농가에 30두에 각각 이식하였다(표 1). 결과는 다음과 같다.





표 1. 수정란이식 후 농가에 따른 수태율 조사

농 가	대 리 모	이식두수	정액번호	임신감정*
A농가	50	50	683	2012년 2월 이후 예정
B농가	30	30	683	

* 임신감정은 구제역으로 인하여 이식시기가 늦어짐에 따라 2012년 2월 이후 예정

KPN 683



○ 생 산 지 : 한우개량사업소

○ 생년월일 : 2004-09-13

○ 등록번호 : 221996110

○ 혈 통

부 KPN482

조부 KPN244

모 221391127

조모 221043572

외조부 KPN186

외조모 221154446

○ 특 장 : 육질형

생산형질 유전능력

	냉도체중 (kg)	배최장근 단면적 (cm ²)	등지방 두께 (mm)	근내 지방도
EPD	-1.29	1.13	-1.9	1.03
Acc	70	75	75	78

체형 유전능력

	-4	-2	0	2	4	수치
체고			■			0.48
십자			■			0.54
체장			■			0.49
흉심			■			0.21
흉폭			■			-0.04
요각			■			-0.14
곤폭			■			0.22
좌골			■			-0.08
고장			■			0.27
흉위			■			0.09

그림 1. 씨수소 능력정보

또한 사료첨가제 투여여부에 따른 수태율을 보기 위하여, 이식 할 대리모를 투여군과 비 투여 군으로 나누어 이식을 실시하였다.

표 2. 사료첨가제 투여여부에 따른 각 농가별 수태율

농가	이식두수	사료첨가제 투여 여부	임신감정*
A농가	30	투여	2012년 2월 이후 예정
	20	비투여	
B농가	15	투여	
	15	비투여	

* 임신감정은 구제역으로 인하여 이식시기가 늦어짐에 따라 2012년 2월 이후 예정

사료첨가제 투여군과 비투여군 모두 이식을 실시하였으며, 이식시기가 늦어짐에 따라 임신감정은 실시하지 못하였다. 차후 2012년 2월 이후 임신감정을 실시하여 농가에 따른 수태율과 사료첨가제의 효율성을 검증할 예정이다.

○ 1세대 산자의 능력검증

1차년도에 53두에 대하여 이식한 결과 총 33두의 산자가 생산되었으며, 그 중 암송아지는 13두, 숫송아지는 20두가 생산되었다. OPU 유래 수정란을 이식한 산자의 능력 검정을 위하여 체형, 육종가, 초음파검사 자료를 구축하려 하였으나, 분만후 17개월 이전에는 예측이 어렵다. 본 연구에서 생산된 산자는 17개월이 되지 않았으므로 측정하지 못하였고 차후 2012년 2월 이후에 능력검정을 하여 실시하여 OPU 기법의 효율성을 검증할 예정이다.

표. 1차년도 이식결과 및 생산된 산자의 능력검정

이식두수	산자생산 두수			능력검증*
	숫송아지	암송아지	총 두수	
53두	20두	13두	33두	2012년 2월 이후 실시 예정

* 후대 산자의 능력검정은 2012년 2월 이후 실시예정

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

가. [1세부]

구분 (연도)	세부 과제 명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	체내 유래 수정 란 생산 체계 확립	지속적인 공란우 선발 이용	100	1차년도에 김해축협 문유상조합장의 목장에서 고등 등록우로 등록된 개체 중에서 육질등급(후대검증에 의한 자료), 전염성 질병 및 번식기 계통의 질병 등을 종합 검토하여 도나로 선발 활용하였음. 대상우 10두 를 선정하고 항시 5두를 시험목장인 경상대학교 목장 에서 사육관리하면서 연구에 활용하고 있었음. 난자 의 채취 효율이 급격히 낮아져서 새로운 공란우를 5 두 선정하여 본 연구실의 OPU장에서 난자 채취 효율 과 수정란 생산 효율이 높은 공란우를 최종 4두 선정 하였음.
		생산된 1세대 암소로부터 공란우 조기선발 가능성 조사	80	생산된 암송아지를 공란우로의 활용은 특수한 목적 을 가진 소가 아닌 이상 그 의미가 없는 것으로 판단 되어 성성숙 후 선발 활용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었음. 실제 예비 연구에서 성성숙에 도달한 처 녀우 일지라도 형성되는 난포수가 제한적이어서 수정 란의 생산 효율이 낮았음. 그리하여 경산우를 공란우 로 선발 활용하는 것이 수정란의 대량 생산에 보다 더 합리적인 것으로 판단됨.
		호르몬투여와 비 호르몬투여가 난자생산 효율 비교분석	100	호르몬 처리구와 비 처리구간의 체내난자의 체외 발 달율을 조사하여 효율적인 방법을 찾고자 실시하였 음. 호르몬 처리구에서는 난포의 발육은 문제가 없으 나 채취과정에서 실제 난자의 회수율이 저조하여 조 기에 이 부분을 포기하고 비 호르몬 처리에 의한 주 2회 난자를 채취하는 방법으로 수행하고 있음. 호르 몬을 처리하지 않는 것은 난소의 follicle wave에서 항상 growing 중인 난포로부터 난자를 채취함으로써 질적 수준이 높은 난자를 채취하여 사용한다는 장점 과 그들 난자를 이용한 체외수정란을 생산함으로써 체외수정란의 발달율 또한 높아서 이식 가능한 수정 란을 대량 생산할 수 있는 기술을 정립하였음.
		체내유래 수정란	100	체내유래 수정란의 대량생산 체계를 확립하기 위해

		대량생산 체계 개발		서 공란우의 지속적인 채취기간을 조사하기 위해서 6개월간 채취하여 난포의 생성률과 난자 회수율, 난자 등급율, 수정란 생성수를 조사하였으며 개체에 따른 난포 생성수, 난자 회수율, 난자 등급율, 수정란 생성수를 조사하였음. 주 2회 난자를 채취하였으며 난자를 보다 효율적으로 채취할 수 있는 방법을 조사하였으며 채취된 난자에서 보다 많은 수정란을 생산할 수 있는 배양체계를 정립하였음.
		체내유래 수정란의 품질향상 연구	100	체내난자의 경우 회수되는 난자의 개수가 제한적이기 때문에 최적의 배양조건 확립과 수정란이 생존할 수 있는 유전자의 발현 또한 중요하다. 따라서 본 연구에서는 OPU유래 체내난자에서 생산된 수정란과 도축장 유래 수정란에서의 유전자 발현 차이를 조사하고 이를 수정란의 질적평가에 반영하고자 조사하였음. 체내난자의 여러가지 배양기술을 통해 생성된 수정란의 질적평가를 하였음. 여러 배양기술을 통해 생성되는 수정란을 이용하여 유전자 발현 패턴을 확인 조사하였음.
		체내유래 수정란의 동결방법 연구	100	본 연구실에서는 유리화동결보존기술(Vitrification method)을 이용하여 수정란을 동결, 용해 후에 생존율을 조사하였음. 수정란을 동결 시에 포배강에 의한 결정형성으로 인해서 데미지를 줄이기 위해서 동결하는 과정에서 미세조작으로 수정란에 구멍을 뚫어 포배강을 제거한 후에 동결, 용해 후 생존율을 비교 분석 하였음.
2차 연도 (2010)	체내 유래 수정란 생산 체계 확립	지속적인 공란우 선발 이용	100	1차년도에 김해축협 문유상조합장의 목장에서 고등 등록우로 등록된 개체 중에서 육질등급(후대검증에 의한 자료), 전염성 질병 및 번식기 계통의 질병 등을 종합 검토하여 도나로 선발 활용하였음. 대상우 10두를 선정하고 항시 5두를 시험목장인 경상대학교 목장에서 사육관리하면서 연구에 활용하고 있었음. 난자의 채취 효율이 급격히 낮아져서 새로운 공란우를 5두 선정하여 본 연구실의 OPU장에서 난자 채취 효율과 수정란 생산 효율이 높은 공란우를 최종 4두 선정하였음.
		생산된 1세대	80	생산된 암송아지를 공란우로의 활용은 특수한 목적

<p>암소로부터 공란우 조기선발 가능성 조사</p>		<p>을 가진 소가 아닌 이상 그 의미가 없는 것으로 판단되어 성성숙 후 선발 활용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었음. 실제 예비 연구에서 성성숙에 도달한 처녀우 일지라도 형성되는 난포수가 제한적이어서 수정란의 생산 효율이 낮았음. 그리하여 경산우를 공란우로 선발 활용하는 것이 수정란의 대량 생산에 보다 더 합리적인 것으로 판단됨.</p>
<p>호르몬투여와 비 호르몬투여가 난자생산 효율 비교분석</p>	<p>100</p>	<p>호르몬 처리구와 비 처리구간의 체내난자의 체외 발달율을 조사하여 효율적인 방법을 찾고자 실시하였음. 호르몬 처리구에서는 난포의 발육은 문제가 없으나 채취과정에서 실제 난자의 회수율이 저조하여 조기에 이 부분을 포기하고 비 호르몬 처리에 의한 주 2회 난자를 채취하는 방법으로 수행하고 있음. 호르몬을 처리하지 않는 것은 난소의 follicle wave에서 항상 growing 중인 난포로부터 난자를 채취함으로써 질적 수준이 높은 난자를 채취하여 사용한다는 장점과 그들 난자를 이용한 체외수정란을 생산함으로써 체외수정란의 발달율 또한 높아서 이식 가능한 수정란을 대량 생산할 수 있는 기술을 정립하였음.</p>
<p>체내유래 수정란 대량생산 체계 개발</p>	<p>100</p>	<p>체내유래 수정란의 대량생산 체계를 확립하기 위해서 공란우의 지속적인 채취기간을 조사하기 위해서 6개월간 채취하여 난포의 생성률과 난자 회수율, 난자 등급율, 수정란 생성수를 조사하였으며 개체에 따른 난포 생성수, 난자 회수율, 난자 등급율, 수정란 생성수를 조사하였음. 주 2회 난자를 채취하였으며 난자를 보다 효율적으로 채취할 수 있는 방법을 조사하였으며 채취된 난자에서 보다 많은 수정란을 생산할 수 있는 배양체계를 정립하였음.</p>
<p>체내유래 수정란의 품질향상 연구</p>	<p>100</p>	<p>체내난자의 경우 회수되는 난자의 개수가 제한적이기 때문에 최적의 배양조건 확립과 수정란이 생존할 수 있는 유전자의 발현 또한 중요하다. 따라서 본 연구에서는 OPU유래 체내난자에서 생산된 수정란과 도축장 유래 수정란에서의 유전자 발현 차이를 조사하고 이를 수정란의 질적평가에 반영하고자 조사하였음. 체내난자의 여러가지 배양기술을 통해 생성된 수정란의 질적평가를 하였음. 여러 배양기술을 통해 생성되는 수정란을 이용하여 유전자 발현 패턴을 확인 조사하였음.</p>
<p>체내유래</p>	<p>100</p>	<p>본 연구실에서는 유리화동결보존기술(Vitrific</p>

		수정란의 동결방법 연구		ation method)을 이용하여 수정란을 동결, 용해 후에 생존율을 조사하였음. 수정란을 동결 시에 포배강에 의한 결정형성으로 인해서 데미지를 줄이기 위해서 동결하는 과정에서 미세조작으로 수정란에 구멍을 뚫어 포배강을 제거한 후에 동결, 용해 후 생존율을 비교 분석 하였음.
3차 연도 (2011)	체내 유래 수정란 생산 체계 확립	지속적인 공란우 선발 이용	70	3차년도에 김해축협 문유상조합장의 목장에서 고등 등록우로 등록된 개체 중에서 육질등급(후대검증에 의한 자료), 전염성 질병 및 번식기 계통의 질병 등을 종합 검토하여 도나로 선발 활용하였음. 대상우 10두를 선정하려고 하였으나 구제역의 여파로 인하여 3두를 시험목장인 경상대학교 목장에서 사육관리하면서 연구에 활용하고 있었음. 난자의 채취 효율이 급격히 낮아져서 새로운 공란우를 5두 선정하여 본 연구실의 OPU장에서 난자 채취 효율과 수정란 생산 효율이 높은 공란우를 최종 4두 선정하려 하였으나 전국적인 구제역 여파로 인하여 선발의 어려움이 있었음.
		생산된 1세대 암소로부터 공란우 조기선발 가능성 조사	70	생산된 암송아지를 공란우로의 활용은 특수한 목적을 가진 소가 아닌 이상 그 의미가 없는 것으로 판단되어 성성숙 후 선발 활용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었음. 생산된 1세대 산자는 1차년도에 이식한 53두에서 33두의 산자가 생산되었으며, 암송아지 13두에 대하여 공란우 조기선발 가능성을 조사하려 하였으나, 성성숙 기간까지 도달하지 못한관계로 조사하지 못하였다.
		OPU 방법을 통해 채취된 난자의 등급 향상 연구	100	체내유래 난자의 등급을 향상시키기 위하여 지속성 비타민을 이용하여 1,2등급 난자의 회수율을 높이기 위하여 연구하였음. 지속성 비타민을 주기적으로 투여하여 1,2등급의 비율을 높이고자 하였음. 또한 사료 첨가제를 지속적으로 급여하여 난자의 등급 향상을 연구하였다.
		체내유래 수정란 대량생산 체계 정립 및 체계화	100	체내유래 수정란의 대량생산 체계를 확립하고 발전시키고자 비타민 E의 투여 여부에 따른 난포의 생성률과 난자 회수율, 난자 등급율, 수정란 생성수를 조사하였다. 공란우의 상태에 따라 주 2회 난자를 채취 하였으며 채취된 난자에서 보다 많은 수정란을 생산

			할 수 있는 배양체계를 정립하고 실제 수정란 생산에 도입 하였음.
	체내유래 수정란 품질향상과 분자적 분석방법 개발	100	비타민 E 투여를 통하여 OPU 채란 시 난포의 형성과 난자의 회수 및 수정란의 등급향상시기고자 하였다. 비타민 E 투여 시 난포 형성과 회수된 수정란의 등급에는 개체에 따른 차이를 보였으나, 배발달율과 생산된 수정란의 등급은 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 차후 체내유래 수정란 생산 시 비타민 E를 이용하면 수정란의 품질이 향상될 것으로 기대된다.
	체내유래 수정란의 산업화를 위한 동결방법 연구 및 액체질소로부터 오염방지를 위한 방안 기술 개발		본 연구실에서는 유리화동결보존기술(Vitrification method)을 이용하여 잉여수정란을 동결보존 하였으며, 용해 후에 이식을 실시하였음. 액체질소에 의한 바이러스 및 병원균에 의한 오염으로부터 수정란을 보호하기 위한 방법을 연구하여 동결된 수정란을 액체질소와 완벽히 격리하는 방법을 개발하였음.

나. [2세부]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2008)	개체선발과 수정란이식 체계 구축	경제형질의 유전 력 기준으로 공란 우 선발기준 확립	100	경상남도 김해축협산하 고등등록우 중 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대 로 선발기준 확립
		개체별 수정란인 식 및 증명서 발 급기준 확립	100	생산이력제에 활용되는 초위성체 (Microsatellite, MS) 마커를 이용해 DNA 분석 을 통해 얻은 대립유전자형을 기준으로 증명서 발급
		제1세부과제에서 1차 선발된 공란 우중에서 경제형 질의 유전력 기준 으로 최종 공란우 선정	100	경제형질의 유전력 등을 기준으로 최종 5두의 공란우를 선정
		Data Base구축으 로 조기선발체계 구축	100	종모축 및 공란우에 대해 초위성체 (Microsatellite, MS) 마커를 이용해 대립유전 자형을 분석하여 D/B 구축
2차 연도 (2010)	개체선발과 수정란이식 체계 구축	개체별 인식기준 설정	100	경상남도 김해축협산하 고등등록우 중 체형, 육종가, 초음파검사 및 후대검증 자료를 토대 로 선발기준 확립
		각 수정란별 증명서 발급	100	생산이력제에 활용되는 초위성체(Microsatellit e, MS) 마커를 이용해 DNA 분석을 통해 얻은 대립유전자형을 기준으로 증명서 발급
3차 연도 (2011)	개체선발과 수정란이식 체계 구축	개체별 인식기준 설정	100	최고기 이력추적에 활용되는 초위성체 (Microsatellite, MS) 마커 11종과 성감별 마커 2종 총 13종의 DNA 마커를 활용해 개체별 인 식기준을 설정하여 각 수정란별 증명서 발급에 활용 및 수정란 검증에 활용
		각 수정란별 증명서 발급	100	최고기 이력추적에 활용되는 초위성체 (Microsatellite, MS) 마커 11종과 성감별 마커 2종 총 13종의 DNA 마커를 이용해 DNA 분 석을 통해 얻은 대립유전자형을 기준으로 증명 서 발급
		생산된 암송아지에서 조기 공란우 후보축 선발	100	경제형질의 유전력 등을 기준으로 공란우로 사 용될 후보 개체 선정

다. [3세부]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	체내유래 수정란이식 효율 향상기술 개발	초음파 및 직장 촉진법 등을 이용 한 난소와 자궁 상태별 이식시기 규명	90	발정동기화에 의한 수란우의 준비는 발정발현 우 2일째 배란확인, 이식전일, 즉 6일째 황체의 성장 등을 확인하여 정상적으로 발정발현과 황 체의 발육 정도 등을 확인하고 수란우로 선발 활용하였음. 이때 배란된 난소의 황체 기능은 수정란이식을 위한 대리모의 선발에 중요한 기 준으로 삼았음
		발정동기화 및 자 연발정우 등을 이 용한 수정란이식 후 수태율 비교분 석	80	본 연구를 위해 수란우의 준비는 발정동기화 를 유도하여 수행하였음. 발정동기화 방법은 기존의 개발된 GnRH + PGF2a + GnRH 방법 으로 유도하였음. 이렇게 발정동기화된 대리모 에 수정란이식은 매주 수, 토요일에 공급되는 수정란을 받아서 이식하기 위하여 발정동기화 를 유도하여 수란우를 준비하는 것이 보다 더 효과적으로 수정란이식을 실시할 수 있었음
		체내유래 수정란 의 이식시기별 수 태율 조사	70	체내유래 수정란의 이식은 일정한 발정동기화 에 의해 이식을 실시했기 때문에 이식 시기별 수태율에 대한 비교조사는 수행하지 않고 발정 후 7일째 이식을 수행하였음. 즉 수정 후 7일 째 배반포기 배를 1개씩 발정확인 및 동기화된 대리모의 자궁에 이식하였음
		체내유래 수정란 이식에 적합한 사 육환경 개발과 수 란우 상태별 수태 율 조사	80	수정란이식 시 수태율에 미치는 영향중에서 사육농가별 수태율의 변이를 최소화하기 위해 서 기존의 수태성적이 일정 수준 이상의 농가 에 한하여 수란우의 선발과 이식을 수행하고 있음. 그렇기 때문에 사육환경은 상당히 우수 한 농가에 한정되어 실시되었다고 판단됨. 또 한 수란우의 상태는 기존의 직장촉진에 의한 난소, 황체 및 자궁의 상태를 엄격하게 점검하 여 시술자의 판단에 의해 가능한 개체에 한하 여 수정란이식을 실시하였음
2차 연도 (2010)	체내유래 수정란이식 효율 향상기술 개발	유산예방 등 임신유지 위한 사육환경 연구	90	수정란 이식을 했을 경우 인공수정보다 유산 이 많이 되기 때문에 이식 전에 유산을 방지하 기 위한 방법을 조사 연구하였음. 감염성 유산 에 대한 질병관리를 위하여 예방약 접종, 수정 란이식기술, 위생관리수준 향상, 질병 발병시 신속한 조치 및 치료 등에 대해 조사하였음.

		호르몬투여 사료보조제 투여 등 임신유지 방안 연구	90	본 연구를 위해 이식 전에 사료보조제를 미리 급여하였음. 수정란 이식 시 수태율과 감정 이 후 임신유지에 효과가 보고된 사료보조제를 이 식 전에 2개월간 미리 사료와 함께 섭취 후 수 태율의 향상과 임신유지에 관하여 조사하였음.
		1세대 산자의 사육환경 조성	90	수정란이식에 의하여 생산된 송아지의 사육은 특별관리를 하여 설사 등의 질병으로부터 예방 차원의 관리에 주 안정을 두었음. 특히 설사에 방을 위하여 분만 후 1시간 이내에 초유를 받 드시 먹였으며 겨울철 분만을 위해 분만실의 바닥에 보일러 시설을 하여 송아지의 배를 따 뜻하게 해줄 뿐만 아니라 체온 유지 등에도 큰 효과를 볼 수 있었음.
3차 연도 (2011)	체내유래 수정란이식 효율 향상기술 개발	농가별 수정란이식 수태율을 조사하여 차이점 비교	50	2농가를 선정하여 각 농가의 수태율을 조사하 고 그에 따른 농가의 차이점을 분석 및 개선.
		사료보조제 투여, 대리모 사료비 등을 통한 수태율 향상 방안 연구	50	사료보조제 투여 여부에 따른 수태율을 조사 하고 사료첨가제의 효율성을 검증하여 수태율 향상을 연구
		1세대 산자의 능력검증	70	1차년도에 생산된 산자의 체형, 육종가, 초음 파검사 등을측정하여 능력을 검증

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발에 따른 기대성과

가. [1세부]

- 고능력 암소 선정 및 개량형질 선정
 - 종래의 수소위주의 개량에서 벗어나 우수한 암소를 선발하여 선발강도를 극대화 추구
 - 암소의 유전형질을 유전력에 포함시킬 수 있어 육종개량 소요시간 단축
 - 우량한우의 선발 및 육종체계 확립으로 한우 개량의 가속화
 - 경제형질별 계통구축과 고등 유전형질 개발가능
 - 고품질 한우 대량 공급체계구축 가능
- 체내유래 한우 수정란 생산체계 확립
 - 고비용/저효율의 기존 과배란 처리에서 벗어나 저비용으로 현장 한우사육농가 보급 가능
 - 대량의 수정란 생산으로 고품질 한우 대량 생산체계 구축
 - 잉여 수정란의 동결로 고능력 한우의 유전자원 보존 및 확대가능
 - 체내유래 난자의 배양기술 개발로 체내수정란 생산 효율 극대화
 - 향후 각종 동물의 복제 및 형질전환 등의 각종 BT산업에 기반기술로 적용가능
 - 체내유래 고품질 한우 생산기지 및 수정란 공급기지 구축 가능
 - 종모우, 종빈우 및 분만 송아지 검증체계 구축을 통한 농가 신뢰도 향상

나. [2세부]

- 공급되는 한우 수정란의 검증체계 확립
 - 유전자 검사 : 사용되는 정액 (보증종모우), 종빈우 및 분만 송아지 등의 모근으로부터 유전자를 추출하여 13개의 MS markers를 이용한 친자감별을 실시함. 수정란의 생산 및 산자생산 시 이들 친자감별을 실시하여 정확한 보증을 실시함으로써 산자들의 등록 및 향후 관리측면에서 신뢰도를 높일 수 있을 것임
 - 공급 수정란 혈통보증서 발급 : 보증 종모우, 종빈우의 유전자형이 포함된 혈통보증서를 수정란과 함께 발급하여 시술자 및 수정란이식 농가에서 수정란의 혈통보증서를 확보한 후 향후 생산되는 산자의 혈통증명을 원활하게 수행함
 - 분만 송아지의 혈통 검증 : 공급 수정란에 의하여 분만된 송아지에 대한 유전자 검사를 실시함으로써 정확한 수정란 생산체계 검증함. 이러한 수정란이식에 의해 생산된 송아지의 혈통증명과 검증으로 신뢰도의 향상뿐만 아니라 궁극적으로 혈통등록을 원활하게 할 수 있음

다. [3세부]

- 수정란 이식 및 고품질 송아지 생산기지 구축
 - 번식우 사육두수가 줄어드는 가운데 고품질 송아지의 안정적 생산기반 구축
 - 수태율 분만을 향상으로 체내유래 수정란 생산효과 극대화
 - 고품질 한우 송아지 생산기지 구축
 - 브랜드화에 근간이 되는 고급육의 안정적 공급가능
 - FTA 대비 고부가가치의 축산경영으로 축산농가의 자립화 가능

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 가. 여러세대에서 OPU 기술을 이용하여 소의 체외생산 (2005년).
- 나. OPU 기술을 이용하여 도너소로부터 평균 8~10개의 난자를 채란하고 수정가능한 수정란을 2개 생산 (2001년)
- 다. OPU기술과 sexed sperm을 이용하여 버팔로의 체외수정란 생산에 관한 연구 (2008년)
- 라. 도축장유래 난자와 OPU 유래 체내 난자를 이용하여 소와 버팔로의 체외수정란 발달의 차이의 비교 연구 (2003년)
- 마. 국외의 경우 유럽의 12개 국가에서 RFID (Radio Frequency Identification)와 DNA를 이용한 기술들에 대한 비교 분석을 통해 식품에 대한 이력추적 기술들을 점검 및 활용방안 제안 등 안전한 먹거리에 대한 검증방법에 관심이 높아지고 있다 (Chrysochou 등, 2009).

제 7 장 참고문헌

1. A.M. van Wagtenonk-de Leeuw. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology*. 2006;65:914-925
2. Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D, Seamark RF. Gonadotrophin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology* 194; 42: 1227-1 236.
3. Barker, J. S. F., Tan, S. G., Selvaraj, O. S. and Mukherjee, T.K. 1997. Genetic variation within and relationships among populations of Asian water buffalo(*Bubalus bualis*). *Anim. Genet.* 28:1-13.
4. Bjornstad, G., Nilsen, N. O. and Roed, K. H. 2003. Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses ?. *Anim. Genet.* 34:55-58
5. Blott, S. C., Williams, J. L. and Haley, C. S. 1999. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82:613-619
6. Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, de Kruif A. Transvaginal Ovum Pick Up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 1995; 43:1877-687.
7. Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A, de Kruif A. Effect of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 1997; 47: 1221-1 236.
8. Boni R, Roviello S, Zicarelli L. Repeated ovum pick up in Italian mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 1996; 46: 899-909.
9. Bruck I, Synnestvedt B and Greve T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology* 1997; 47: 1157-1 167.
10. Callesen H, Greve T, Christensen F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*. 1987;27:217.
11. Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. and Caskey, C.T. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16:11141-11156.
12. Chrysochou, P., Chrysochoidis, G. and Kehagia, O. 2009. Traceability information carriers. The technology backgrounds and consumers' perceptions of the technological solutions. *Appetite.* 53:322-331
13. DeMayo, F.J., Rawlins, R.G., Dokelow, W.R., 1985. Xenogenous and in vitro fertilization of frozen thawed primate oocytes and blastomere separation of embryos. *Fertil. Steril.* 43, 295-300.
14. Fry RC, Simpson TL, Squires TJ. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* 1998; 49: 1077-1 082.
151. Garcia A, Salaheddine M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development.

- Theriogenology 1998; 50: 575–585.
16. Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 2001 Apr 1;55(6):1341–57.
 17. Guyader Joly C, Ponchon S, Thuard JM, Durand M, Nibart M, Marquant–Le Guienne B, Humblot P. Effect of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and in vitro embryo production in pregnant heifers. *Theriogenology* 1997; 47:157.
 18. G. Neglia, B. Gasparrini, V. Caracciolo di Brienza, R. Di Palo, G. Campanile and G. Antonio Presicce, et al. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, 59 (2003), pp. 1123–1130.
 19. Kasai, M., Iritani, A., Chang, M.C., 1979. Fertilization in vitro of rat ovarian oocytes after freezing and thawing. *Biol. Reprod.* 21, 839–844.
 20. Tervit HR, McMillan WH, McGowan LT, Smith JF, Hall DRH, Donnison MJ. Effect of juvenile calf age on follicular dynamics and in vitro embryo production. *Theriogenology* 1997; 47: 300.
 21. Todorow, S.J., Siebzehnuebl, E.R., Koch, R., Wildt, L., Lang, N., 1989. Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze–thawing regimens. I. Mouse and hamster. *Hum. Reprod.* 4, 805–811.
 22. Trounson, A., 1986. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil. Steril.* 46, 1–12.
 23. Hotamisligil S, Toner M and power R. 1996. change in memgrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potential of murine oocytes after vitirification in ethylene gly–col. *Biol. Reprod.*, 55: 161–168
 24. Hochi, S., Fujimoto, T., Oguri, N., 1995. Viability of immature horse oocytes cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 43, 236.
 25. Irvine B, Armstrong DT, Earl C, McLean D, Seamark RF. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 1993;39: 237.
 26. Liang XW, Lu YQ, Chen MT, Zhang XF, Lu SS, Zhang M, Pang CY, Huang FX, Lu KH. In vitro embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. *Theriogenology*. 2008 Apr 15;69(7):822–6. Epub 2008 Mar 11.
 27. Lane M and Gardner DK. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol. Reprod. Dev.*, 58: 342–347
 28. Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes by ultra–rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54: 1059–1069.
 29. Quinn P, Kerin J, Stone B and Wilson L. 1986. successful cryopreservation of human oocyts In; 42nd Ann Mtg Am Fertil Cos and 18th Ann Mtg Candian Fertil Androl Soc Abstr, 72 (Abst).
 30. Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice–free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C by vitrification. *Natur*, 313: 573– 575

31. Rubinsky, B., Arav, A., Devries, A.L., 1992. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes. *Cryobiology* 29, 69-79.
22. Scehllander K, Peli J, Schmoll F and Brem G. 1994. Effects of cryopreservation and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. *Theriogenology*, 23: 909-915
23. Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science*, 178; 411-414.
34. Sathanathan, A.H., Ng, S.C., Trounson, A.C., Bongso, A., Ratnam, S.S., Ho, J., et al., 1988. The effect of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamate. Res.* 21, 385-401.
35. Vajta G, Booth PJ, Holm P, Grave T and callesen H. 1997. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-letters*, 18: 191-195.
36. Vincent, C., Garnier, V., Heyman, Y., Renard, J.P., 1989. Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 87, 809-820.
37. 권태현. 공란우 개체와 채란기간이 Ovum Pick-Up 유래 수정란 생산 효율에 미치는 영향. 경상대학교. 학위논문(석사); 660.6 -11-725.
38. 박희성, 이지삼, 진동인, 박준규, 홍승표, 이명열, 정장용. Practical Applications of DNA Marker-Assisted Selection and OPU-Derived IVF Embryo Transfer for the Production of High Quality Meat in Hanwoo II. Production of IVF Embryos Derived Transvaginal Ovum Pick-up from DNA Marker-Proved Hanwoo. *Korean J. Emb. Trans.*2001;16:193-201.
39. 박성재, 양보석, 임기순, 성환후, 양병철, 장원경, 정일정, 정기화, 심보웅, 양별철. Effect of Ovum Pick-up Frequency on In Vitro Production of Embryos in Hanwoo Cattle. *Korean J. Emb. Trans.*2000;15:1-8.
20. 박성재, 류일선, 이동원, 연성흠, 서국현, 허태영, 백광수, 안병석, 손동수, 배광수. Comparison of the Ultrasound-Guided vs Hand-Operated Vacuum Pump Transvaginal Ovum Pick-up in Holstein. *Korean J. Emb. Trans.*2001;16:145-152.
41. 손우진, 강태영, 조성근, 심보웅, 최민철, 최상용, 박충생, 이효종. Study on In Vitro Bovine Embryo Production with Follicular Oocytes Obtained via Ultrasound-guided Ovum Pick-up (OPU) and Slaughterhouse-derived(SHD) Ovary Aspiration in Korean Native Cows. *Korean J. Emb. Trans.*1998.
42. 이병천. Transvaginal Ultrasound-guided Ovum Pick-up(OPU) in Cattle 2. First OPU-IVF Derived Calves Born from Pregnant Cow in Korea. *Korean J. Emb. Trans.*1998.
43. 윤기영, 이병천, 황우석, 김현일, 노상호, 이강남. Transvaginal ultrasound - guided ovum pick - up in cattle. *대한수의학회지.* 1997;37:917-924.
44. 이병천, 윤기영, 김현일, 노상호, 이강남, 황우석. Clinics : Transvaginal ultrasound - guided ovum pick - up in cattle : 1. Effects of estrus cycle , season and bST

- treatment on ovum pick - up in cattle. 대한수의학회지.1997;37:917-919.
45. 진종인, 홍승표, 정장용, 이지삼, 박희성. Study on Ovum Pick-up(OPU) with Finger-Sensibility using Oocyte Recovery in Holstein Heifers. Korean J. Emb. Trans.2000;15:279-286.
 46. 진종인, 권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 공일근. Effect of OPU (Ovum Pick-Up) Duration on the Rate of Collected Ova and In Vitro Produced Blastocyst Formation. Korean J. Emb. Trans.2010;25:15-20.
 47. 진종인, 권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 방재일, 김삼철, 조규완, 이정규, 공일근. Effect of Early Pregnant Heifer as Donor on the Ovum Pick-Up Derived Oocyte Aspiration and Embryo Production. Korean J. Emb. Trans.2011;26:19-25
 48. 최민철, 조성근, 강태영, 박준규, 손우진, 이효종. Development of basic techniques for ultrasound-guided follicular aspiration; anesthetic methods and development of a disposable simplified needle guidance system for ovum pick-up. Korean J. Emb. Trans. 1997;12:211~218.
 49. 황우석. 핵이식 기법을 이용한 한우 쌍태생산에 관한 연구 : I.Ovum pick-up(OPU),전기적 세포융합 및 체외배양 기법을 이용한 복제수정란 생산. 대한수의학회.1998;38:209-216.
 50. 황우석, 신태영, 노상호, 박종임, 이병천. Clinics : Induction of twinning in Korean native cattle by transfer of nuclear transplanted embryos ; 2. Nuclear transfer using donor embryos originated from ovum pick - up (OPU) and activated recipient cytoplasts. 대한수의학회.1998;16:145-152.
 51. 농림수산식품부 고시 제2009-157호. 2009. 소 및 쇠고기의 개체식별을 위한 DNA동일성검사방법

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 체내유래 난자를 이용한 수정란생산으로 한우 고급육 대량생산 체계구축에 관한 연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 체내유래 난자를 이용한 수정란생산으로 한우 고급육 대량생산 체계구축에 관한 연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.