

# 최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <p>주 의 (편집순서 8)</p> <p>(15 포인트 고딕계열)</p> <p>↑ 6cm ↓</p>	<p>110020</p> <p>성 감 별</p> <p>정 자 와</p> <p>O P U 기 술 을</p> <p>이 용 한</p> <p>고 능 력</p> <p>젖 소</p> <p>개 량 기 술</p> <p>개 발</p> <p>농 림 축 산 식 품 부</p> <p>↑ 3cm ↓</p>	<p>(앞면)</p> <p>발간등록번호</p> <p>11-1543000-000946-01</p> <p>성감별 정자와 OPU기술을 이용한 고능력 젖소 개량기술 개발</p> <p>Development of Improvement Technology of Dairy Cow using Sorted Sex Sperm and OPU Technology</p> <p>경상대학교</p> <p>농림축산식품부</p>
---	---	--

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “성감별 정자와 OPU기술을 이용한 고능력 젖소 개량기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 8월 14일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 공 일 근

연 구 원 : 이 정 규

연 구 원 : 조 규 완

연 구 원 : 진 중 인

협동연구기관명 : 젖소개량사업소

협동연구책임자 : 김 흥 톨

협동연구기관명 : 한국색성바이오텍

협동연구책임자 : 서 태 광

협동연구기관명 : 사천축협

협동연구책임자 : 정 중 기

## 요 약 문

### I. 제 목

성 감별 정자와 OPU기술을 이용한 고능력 젖소 개량기술 개발

### II. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술 이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
			SCI						비 SCI								
최종목표	2	2	1	1					8	10		5		2	3	10	
연구기간 내 달성실적	1	1	1	2					8	6	33	5	7	0	4	10	
달성율(%)	50	50	100	200					100	60		100		0	133	100	

### III. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 고능력 젖소 밀소 대량생산을 위한 젖소 OPU유래 수정란 생산체계 확립
- OPU기술과 고능력 성감별 정자를 통해 우수한 품질의 우유와 유량을 대량 생산하는 우수 핵군 조성으로 개량의 다양성 추구
- 고능력 젖소 밀소의 균일화와 차별화로 생산비 절감을 통한 경쟁력 확보
- 경제형질별 중빈우 집단의 계통화로 일괄 육종체계완성
- 궁극적으로 수정란이식 체계 구축으로 가칭 '사천축산업협동조합 고능력핵군조성' 구축사업 확립
- 젖소 OPU유래 수정란 생산기술 체계화 확립으로 가칭 '경남수정란이식센터' 설립하여 고능력 젖소수정란 공급센터로 육성

### IV. 연구개발 내용 및 범위(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

#### ○ 고능력 공란우 · 고능력 종모우의 선정 및 선발기준 정립

- 고능력 공란우 선정 : 연간우유생산량(kg)이 우수한 공란우를 우선적으로 선정하여 체형 심사, 초음파검사, 번식기 질병감염 여부 및 예방접종 등에 문제가 없는 개체를 공란우로

선정함. 선정된 공란우를 2회의 예비 난자채취를 통해서 난포생성 수, 난자등급, 난자회수 수, 수정란 생산효율 등을 점검하여 최종적으로 공란우를 선정 활용함

- 고능력 종모우의 선발기준 정립 : 우리나라 환경을 고려하고 생산(유량, 유지율) 능력, 체형 등을 동시에 고려하여 선발된 한국형 젓소 보증씨수소와 같이 능력이 우수하며 정확하고 신뢰성이 높으며 경제성이 우수한 고능력 씨수소의 선발기준 정립
- 젓소정액 선택 : 씨수소의 유량, 유지율, 단백질, 체형의 유전능력이 모두 상위 50% 이상 이고 신뢰도가 높으며 체형이 우수한 캐나다 젓소 품평회 챔피언 정액을 선택

#### ○ 고능력 씨수소의 채취기술 개발 및 공급

- 고능력 씨수소의 정액상태를 양호하게 유지하기 위해서 사양관리 및 채취기술을 개발하고 기간별 정액 채취횟수를 정립하여 정확한 공급일정을 구축

#### ○ OPU유래 젓소 수정란 생산체계 확립

- 공란우의 사용기간 : 종래의 2회/주 채란할 수 있는 protocol을 이용하여 난자를 채취하여 OPU유래 수정란을 생산할 때 공란우의 효율적인 사용을 위해서 공란우의 채란기간에 따른 수정란생산 효율을 분석하고자 함
- OPU유래 수정란 생산 : 종래의 과배란처리에 의한 관류법이 가지고 있던 많은 문제점을 개선하고 난소에서 직접 난자를 채취하여 OPU유래 수정란의 생산효율 및 이식 후 수태율을 개선하고자 함. 이를 위해 OPU 체계를 구축하고 채란된 난자를 체외에서 성숙, 수정 및 배양으로 이식 가능한 배반포기 배까지의 발달을 유도하고자 함. 이렇게 생산된 난자와 수정란의 질적 평가를 위해 도축장유래 난자로부터 생산된 난자 및 수정란과의 유전자발현 비교분석 및 체외배양체계의 구축을 완성시키고자 함
- OPU유래 수정란 생산을 위한 배양체계 구축 : OPU유래 난자의 체외성숙, 수정, 배양에 의한 수정란 생산기술 개발은 궁극적으로 수정란이식 후 산자생산에 매우 큰 영향을 미친다. 배양과정에서 혈청을 사용한 배지에서 높은 태아 손실율과 낮은 분만율, 과체중 및 기형 송아지 생산 등 문제점이 존재한다. 이러한 견지에서 저혈청배지와 무혈청배지를 이용한 수정란 생산체계를 구축 함
- OPU유래 암컷 수정란 생산 : Flow cytometer를 이용하여 분리된 정액은 기존의 정액보다 활력, 수정률, 배발달율 등이 떨어진다. 이러한 견지에서 Heparin 농도와 수정 시 정액 농도를 조절하여 성감별정자를 이용한 수정란 생산체계를 구축하고자 함
- OPU유래 암컷 수정란의 성비조사 : Flow cytometer를 이용하여 분리된 정자의 성비에 대한 정확도는 통상적으로 약 92%이다. OPU유래 난자의 체외성숙, 수정, 배양에 의한 수정란 생산기술 과정에서 체외수정 시 이러한 암컷 정자만을 이용해 암컷 수정란을 생산하고자 함. 이렇게 생산된 수정란의 성비에 대한 정확성 비교를 위해 분리되지 않은 정액을 이용하여 생산된 수정란과의 성비분석으로 암컷수정란 생산체계의 구축을 완성시키고자 함
- 수정란 동결기술 개발 : OPU유래 수정란의 생산과 이식 등에 활용 후 잉여 수정란을 차후 사용하기 위해서는 완벽한 동결보존기술이 요구된다. 이를 위해 vitrification 동결방법을 이용하기 위해 droplet vitrification 방법을 개발 정립하여 OPU유래 수정란의 동결보존에 활용하여 실용화시키고자 한다. 실용화 방법으로 droplet vitrification 방법으로 동

결시킨 수정란을 최종적으로 straw에 장착하여 농가에 보급하는 방법을 개발하고자 함

○ 공급되는 젖소 수정란의 검증체계 확립

- 유전자 검사 : 사용되는 정액 (보증씨수소), 씨암소 및 분만 송아지 등의 모근으로부터 유전자를 추출하여 13개의 MS markers를 이용한 친자감별을 실시함. 수정란의 생산 및 산자생산 시 이들 친자감별을 실시하여 정확한 검정을 실시함으로써 산자들의 등록 및 향후 관리측면에서 신뢰도를 높일 수 있을 것임
- 공급 수정란 혈통증명서 발급 : 보증 씨수소, 씨암소의 유전자형이 포함된 혈통증명서를 수정란과 함께 발급하여 시술자 및 수정란이식 농가에서 수정란의 혈통증명서를 확보한 후 향후 생산되는 산자의 혈통증명을 원활하게 수행함
- 분만 송아지의 혈통 검정 : 공급된 수정란에 의하여 분만된 송아지에 대한 유전자검사를 실시함으로써 정확한 수정란 생산체계를 검증함. 이러한 수정란이식에 의해 생산된 송아지의 혈통증명과 검증으로 신뢰도의 향상뿐만 아니라 궁극적으로 혈통등록을 원활하게 할 수 있음

○ 수정란이식 및 고능력 젖소 송아지 생산기지 구축

- 체내유래 수정란이식의 효율향상을 위해 대리모의 발정동기화 및 자연발정우 등을 활용함. 또한 수정란과의 발정동기화에 관련된 OPU유래 수정란의 적합한 시기 등을 규명함
- 대리모의 수태율, 분만을 향상에 적합한 사양관리 및 농가별 비교분석을 함으로써 가장 효율적인 사양관리 및 사육환경을 정립하고자 함
- 1세대 관리 및 평가 : 사육단계별 육성관리 및 능력평가를 실시하여 공란우 및 씨수소의 후보축을 확보하고 또한 우수한 산자생산을 위해 후보 밀소로 활용함
- 1세대 젖소에서 2차 씨암소 선발 평가 : 제1세대에서 생산된 씨암소로서의 활용 가치 등을 평가하고자 함
- 고능력 젖소의 지역 생산기지 구축 및 경제성 연구 : 균일한 유량을 생산하는 고능력 젖소의 안정적인 생산기반을 확보함으로써 대량의 고능력 젖소 밀소의 생산기지를 구축하고자 함

V. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

○ 체내유래 암컷수정란 생산기술 개발

- 연간 우유생산량(kg)이 우수한 공란우를 우선적으로 선정하였으며, 선정된 공란우를 2회/주 예비 난자채취를 통해 수정란 생산효율이 우수한 공란우 선정
- OPU 유래 체내난자 채취를 위해서는 초음파채취기를 이용하여 난자를 채취함으로써 기자재의 효율적인 활용이 중요하여 보정틀의 설치 시 초음파 기자재를 활용할 수 있는 공간을 확보하여 효율적인 사용이 가능하도록 함
- 한우와 젖소에서 수정란의 채란율과 난자의 등급을 통하여 비교하여 난자의 생산효율을 증대시키고 최종적으로 수정란 생산율을 향상시키기 위하여 실시
- 성감별 정자 염색을 일반정자와 비교하여 체외수정 및 ICSI를 이용한 성감별 수정란 생산에 활용 여부를 검사

- 현재까지 실시되고 있는 수정란 생산 방법 중 가장 효율적이고 생산 효율이 높은 체외수정방법에 성감별 정자를 이용하고자 실시
- IVF용 성감별 정액을 의뢰 및 생산하여 체외수정 방법을 정립하여 192개의 수정란이 생산되었으며, A,B,C의 3등급으로 분류하여 생산율을 확인
- 성감별 정자와 일반정자의 Acrosome 손상도를 측정하여 수정란 생산효율을 올리고자 Acrosome 염색을 실시하여 차이점을 확인
- ICSI 기술을 이용한 수정란 생산을 위하여 도축장 유래 남자 중 제 1극체가 확인된 203개의 남자를 공시하여 73.3%(149개)의 분할율을 확인하였으며, 39개(19.2%)의 배반포를 생산
- 총 95두에 대한 수정란 이식을 실시하였으며 임신감정 결과 42두(43.75%)에서 수태가 확인 되었으며 36두가 분만되었다. 성비는 수컷 3두, 암컷 33두로 암컷의 성비가 91.6%로 확인
- 분만된 36두 중 20두를 대상으로 친자감별을 실시한 결과 100% 친자임을 확인
- 성감별 정자에 따른 수정란 생산 효율을 조사한 결과 수정란 생산율을 조사하고 FITC/PI staining을 통하여 Unsorted sperm과 Sorted sperm의 두 그룹 간의 Acrosome의 정상성에서의 차이를 확인
- 전년도 수정란 이식은 8농가를 대상으로 115두를 이식하였다. 수태율은 50두(43.47%)로 확인되었으며, 성감별 수정란 유래 산자의 성비는 분만두수 43두에 암컷 39두(90.6%), 수컷 3두(6.9%)로 확인

○ 고능력 종모우 선발기준 정립 및 효율적인 채취기술 개발과 공급

- 성감별 정액 생산을 위한 고능력 종모우를 선정하기 위하여 기초연구로 유량, 유지방, 유단백, 체형형질이 우수한 한국형(2두), 캐나다형(1두)종모우를 선정하였으며, 정액 채취 후 성감별 액상 및 동결정액의 성상이 우수하여 OPU 유래 성감별 체외수정란 생산이 가능한 종모우 선정
- 년차별 보유 씨수소 능력을 비교분석하여 최상의 씨수소를 주기적으로 선정하여 성감별 동결정액을 생산할 수 있도록 공시
- 성감별 동결정액의 번식 효율성을 검증하고자 성감별 동결정액을 이용한 인공수정 실증 실험을 수행
- 고능력 씨수소의 정액을 이용한 인공수정 및 OPU 기술을 이용한 수정란 생산을 위하여 성감별 동결정액을 생산함
- 성감별 동결정액을 이용한 인공수정 실증실험과 연계하여 성감별 정액의 성분리 정확도 판정을 위한 수정란 성판정 및 분만 송아지 성별 조사
- 우수한 종모우를 선발하여 인공수정용 성감별 동결정액을 낙농가에 공급하였으나 현재 국내 우유생산량 증가로 성감별정액 생산 중단

○ 성감별정자의 분리효율 향상기술 개발

- 젖소개량사업소에서 채취된 원정액을 빠른 시간 내에 정자의 성을 분리하는 연구실로 이송하는 방법과 운송도중 정자의 손상을 최소화 할 수 있는 희석액 및 이송 온도 등을 최적화

- 3두의 젖소 종모우 정액을 이용하여 각 개체별 정자 성분리 가능성과 분리효율, 분리속도, 냉동/융해 후 정자의P 활력도와 성분리 과정에서의 손상정도를 확인하였음
- 성분리 자체가 세포분리기를 이용하기에 분리된 정자집단이 고순도를 유지하면서도 분리 속도는 최고로 높일 수 있는 즉 분리효율을 최적화하는 시스템의 확립이 필요하며 이에 대한 연구 실시
- 원정액 및 성분리된 정액에 catalase를 농도별로 첨가 후 정자의 생존성을 시간별로 조사
- Catalase가 정자의 성분리 단계별 생존성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 catalase를 Talp 정자염색용액, catch fluid, 냉동희석제 AB에 첨가 후 냉동하고 융해 후 활력도를 조사
- 정자염색용액에 난황을 첨가 후 성분리도 및 냉동융해 후 정자의 생존율을 조사하였다. 또한 catalase 첨가효과와 난황의 첨가에 따른 관계를 규명

○ OPU 유래 수정란 이식효율 향상기술 개발

- 수란우의 선정 조건, 수정란 이식에 대한 설명과 수태율을 향상하기 위한 수란우에 사료 첨가제를 급여하는 방법에 대한 농가교육을 철저하게 실시
- 공란우에 급여되어진 비타민 E 사료첨가제를 사용하였으며 농가를 투여군과 비투여군으로 분류하여 수정란이식을 실시
- 2012년 12월부터 2013년 5월까지 총 95두에 대한 수정란 이식을 실시하였으며 이식 후 약 2-3개월에 직장축진에 의한 임신감정을 실시한 결과 42두(43.75%)에서 수태가 확인되었다. 정상 분만한 송아지들의 성비를 조사한 결과 암컷의 생산비율은 33두로 91.6%로 확인

VI. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

○ 체내유래 젖소수정란 생산체계 확립

- 성감별된 정자를 이용한 암컷수정란 생산과 이식으로 젖소의 개량효율 극대화
- 고비용/저효율의 기존 과배란처리에서 벗어나 저비용으로 현장 젖소사육농가 보급 가능
- 우수한 암컷송아지 생산으로 암컷 젖소수정란의 신뢰도 향상
- 대량의 수정란 생산으로 고능력 젖소 대량 생산체계 구축
- 대량의 암컷수정란 생산으로 고능력 젖소 대량생산의 효율 극대화
- 잉여 수정란의 동결보존으로 고능력 젖소의 유전자원 보존 및 확대가능
- OPU유래 난자의 배양기술 개발로 OPU수정란 생산 및 이식효율 극대화
- 향후 각종 동물의 복제 및 형질전환 등의 각종 BT산업의 기반기술로 적용 가능
- OPU유래 고능력 젖소 생산기지 및 수정란 공급기지 구축 가능
- 씨수소, 씨암소 및 분만 송아지 검증체계 구축을 통한 농가 신뢰도 향상

○ 고능력 암소 선정 및 우수 젖소정액 선택

- 종래의 수소 위주의 개량에서 벗어나 우수한 암소를 선발하여 선발강도를 극대화 추구
- 공란우의 효율적인 선정으로 수정란생산 효율의 극대화
- 씨수소의 효율적인 활용으로 성감별 정액 생산 및 정액공급의 다양성과 효율 향상

- 씨수소의 선발기준정립으로 정액의 안정성, 신뢰도 향상
- 값비싼 챔피언 정액의 효율적인 활용을 통한 생산비 절감
- 고능력 젖소 대량 공급체계 구축 가능

○ 공급되는 젖소수정란의 검증체계 확립

- 수정란의 인식체계를 확립하여 생산되는 모든 송아지의 등록 수월성 재고
- 새로운 개체인식체계의 구축으로 전 밀소의 인식체계 확립
- 생산된 송아지의 13종의 MS markers로 친자검증을 통하여 수정란의 신뢰성 재고

○ 수정란이식 및 고능력 젖소 송아지 생산체계 구축

- 적합한 이식시기 규명으로 수태율 향상
- 수태율, 분만율 향상으로 OPU유래 암컷수정란 생산효과 극대화
- 고능력 젖소 송아지 생산기지 구축
- 차후 고능력 씨암소의 선발강도 극대화
- FTA 대비 고부가가치의 축산경영으로 축산농가의 경쟁력 제고
- 암컷 수정란이식에 의한 원하는 성의 산자생산으로 경영합리화 추구



## SUMMARY

### (영문요약문)

This study was carried out to produce elite dairy cow by combination ovum pick-up (OPU) technology with preselected female semen. Now dairy cow had been worked on artificial insemination with selected female semen in my country, but not developed on in vitro embryo production with preselected female semen, and so there needed to develop new system for embryo transfer by preselected female embryo with its semen. To produce elite Hanwoo offspring, embryo transfer system has been developed in Hanwoo by super-ovulation of FSH injection of which has limited to apply in domestic animal production industry, because of low number of transferable embryo production after uterus flushing, that is, approx. 5 transferable blastocyst per one super-ovulation treatment and so should be got total approx. 20 transferable per donor per year. However, OPU system can produce elite donor cow and preselected female semen and then can be produced approx. 64 transferable embryo per donor per 4 month that is estimated approx. 200 transferable embryo per donor per year that could be better increased genetic improvement by production of elite preselected female dairy cow. And so OPU derived embryo production system need to produce elite dairy cow as well as preselected female elite dairy cow that could be developed embryo transfer technology and also elite dairy cow group. Production of preselected female dairy cow embryo and transfer with preselected female semen could be contributed to increase the dairy cow industry's competitiveness and the dairy farm's income by decrease of production costs. In the preselect of dairy cow's semen, several factors should be affected on selective speed and survivability of selected semen and so this study was focused on develop of establishment of bull individual's preselect protocol, settlement of flowcytometer for optimizing of preselect efficiency, survivability of preselected semen to increase AI efficiency and development of efficiency improvement technology of preselect female semen. In this study, elite donor dairy cows were selected by milk production ability and then they were do OPU session 2 time per donor per week to produce transferable embryo. Semen were selected 2 and 1 dairy bull from Korean and Canada type by high milk production amount, milk fat, milk protein, body transformation. In the 4<sup>th</sup> years, total 95 preselected female embryos were transferred into recipient and produced 42 (44.2%) offspring that were 33 female (91.6%) and 3 male (8.4%) offspring. In the 5<sup>th</sup> years, total 115 preselected embryo were transferred into recipient and produced 50 (43.47%) offspring that were 39 female (90.6%) and 3 male (9.4%) offspring.

In conclusion, OPU derived elite dairy female embryo production and transfer system can produce and establish effectively the elite dairy candidate female group and so complete dairy group's genetic improvement within just one generation.

## CONTENTS (영 문 목 차)

Chapter I - Overview of Research projects

Chapter II - Current research activities in domestic or foreign countries

Chapter III - Research activities and Result

Chapter IV - Achievements and Contribution to related era

Chapter V - Research outcomes and applications

Chapter VI - Scientific information in the middle of research project

Chapter VII - Current state of research facilities and equipments

Chapter VIII - Current State of Laboratory Safety Management

Chapter IX - References

## 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표
- 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 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적
- 제 9 장 참고문헌

# 제 1장 연구개발과제의 개요

## 1 절. 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 국내에서는 젖소에서 성감별 정자를 이용한 인공수정을 실시하고 있으나 체내, 체외 수정란을 생산하는 기술은 이루어 지지 않았으며 고능력 젖소의 수정란이식기술에서는 성감별 정자를 이용한 수정란이식의 체계 구축이 필요한 실정이다. 한우의 경우 우수한 개체를 생산하기 위하여 FSH를 이용하여 과배란처리 후 생산된 체내수정란을 이식하여 우수한 형질의 개체를 생산하고자 하는 수정란이식을 하고 있으나 과배란처리 후 생산된 체내수정란의 회수와 이를 대리모에 이식하는 체계는 공란우 1두로부터 1회 약 5개 전후의 생산량과 연간 4회 정도의 과배란 처리가 가능하기에 연간 총 20개 전후의 이식 가능한 수정란을 생산함으로써 산업화에 적용하기 위해서는 한계점을 지니고 있다. 따라서 체계적이고 효과적인 고능력 젖소 수정란을 생산하고 공급하여 진정한 고능력 젖소 개량을 위한 방법으로 정립되고 산업화를 위해서는 OPU 유래 난자를 이용한 수정란을 생산하는 과정에서 성감별 정자를 이용하여 암컷 수정란을 생산 후 이식하는 체계구축이 필요한 실정이다
- OPU system은 공란우의 높은 선발강도와 선별된 정액을 이용하여 고능력 공란우로부터 4개월 동안 64개, 산술적으로 연간 200여개 이상의 이식 가능한 수정란을 생산, 이식함으로써 암/수의 유전능력을 동시에 활용함으로써 개량효율의 극대화를 이룰 수 있다. 또한, 호르몬 처리를 하지 않고 난자를 채란함으로써 수정란의 생산비가 과배란처리와 비교하여 절감하여 수정란의 생산 단가를 낮출 수 있으므로 산업화에 적합하다고 할 수 있다.
- 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, 융해 기술은 미흡한 실정이다.
- 젖소에서 성감별된 정자를 이용한 암컷수정란의 선택적 생산과 이식은 젖소의 개량효율을 극대화 하고, 농가의 효율적 경영 및 생산비 절감으로 농가소득 증대와 경쟁력 향상에 크게 이바지 할 수 있다. 소 정자의 성분리는 여러 가지 요인들이 그 분리속도와 성 분리 후 정자의 생존율에 영향을 미치는 바, 본 연구에서는 각각의 종모우에 적합한 개체별 성 분리 프로토콜의 확립, 성분리 효율의 최적화를 위한 세포분리기의 설정, 성분리 정자의 인공수정 성공률을 높이기 위한 정자의 생존율 및 성 분리효율의 향상 기술을 개발하고자 하였다.

또한 본 연구를 통하여 확립된 프로토콜에 따라 성분리 정액을 생산하고 체내/외 수정란의 생산 및 인공수정을 통하여 성분리 정액의 효용성에 대한 농가 실증시험 후 농가에 대한 정액보급 및 OPU 유래 수정란생산에 직접 활용할 수 있는 기술을 정리하는 것을 본 연구의 최종적 목표로 하였다.

○ 고능력 공란우·고능력 종모우의 선정 및 선발기준 정립

- 고능력 공란우 선정: 연간 우유 생산량(kg)이 우수한 공란우를 우선적으로 선정하여 체형심사, 초음파검사, 번식기 질병 감염 여부 및 예방접종 등에 문제가 없는 개체를 공란우로 선정하였다. 선정된 공란우를 주 2회의 미성숙난자 채취를 통해서 난포생성 수, 난자등급, 난자회수, 수정란 생산효율을 점검하여 최종적으로 공란우를 선정 활용함
- 고능력 종모우의 선발기준 정립: 우리나라 환경을 고려하고 생산능력(유량, 유지율), 체형 등을 동시에 고려하여 선발된 한국형 젖소 보증씨수소와 같이 능력이 우수하며 정확하고 신뢰성이 높으며 경제성이 우수한 고능력 씨수소의 선발 기준 정립
- 젖소정액 선택: 씨수소의 유량, 유지율, 단백질, 체형의 유전능력이 모두 상위 50% 이상이고 신뢰도가 높으며 체형이 우수한 캐나다 젖소 품평회 챔피언 정액을 선택

○ 고능력 씨수소의 채취기술 개발 및 공급

- 고능력 씨수소의 정액상태를 양호하게 유지하기 위해서 사양관리 및 채취기술을 개발하고 기간별 정액 채취횟수를 정립하여 정확한 공급일정을 구축

○ 본 연구에서는 위와 같이 경제적이며 산업화에 적합한 OPU system을 도입하여 수정란을 생산하고 이식함으로써 우수한 형질의 송아지를 생산하는 방법을 개발하여 목장 내 전 우군을 최단기간 내에 고능력 군으로 개량할 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.

## 2. 경제·산업적 측면

### 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 현재 국내의 체외 수정란이식은 한우에서 활발히 진행되고 있으나 젖소의 경우 많은 투자비용에 비하여 효율성을 보지 못하고 있으며, 특히 수정란 이식 후 수소가 태어날 경우 막대한 손실이 야기되고 있다.
- 성감별된 정액을 이용하여 인공수정 시 수태율이 현저히 떨어지며 구입비용 또한 매우 높다. 이러한 문제점을 극복하고자 고능력 젖소 공란우를 FSH 호르몬을 이용하여 과배란 처리 후 생산된 체내 수정란을 이식은 몇몇 연구실과 기관에서 이루어지고 있으나 효율성과 비용 문제가 심각한 하다. 특히 많은 수정란의 회수를 위하여 일반정액을 이용하는데, 수소가 태어날 경우 농가의 피해는 막심한 실정이다.

- 과배란처리 후 생산된 체내수정란의 회수와 이를 대리모에 이식하는 체계는 고등등록 공란우 1두로부터 1회 약 5개 전후의 생산량과 연간 4회 정도의 과배란 처리가 가능하기에 연간 총 20개 전후의 이식 가능한 수정란을 생산함으로써 산업화에 적용하기 위해서 수정란의 생산효율적인 측면에서 한계점을 가지고 있으나, OPU 유래 수정란 이식기술은 4개월 동안 약 40개, 산술적으로 연간 120여개 이상의 이식 가능한 수정란의 생산이 가능하며 성감별된 정액을 사용하기 때문에 산자생산 시 막대한 경제적 이익이 창출 가능하다.
- 체계적이고 효과적인 고능력 성감별 젖소 수정란을 생산하고 공급하여 진정한 고능력 젖소 개량을 위한 방법으로 정립되고 산업화를 위해서는 OPU유래 난자를 이용한 수정란을 생산 후 이식하는 체계 구축이 필요한 실정이다.
- 수정란을 이식받을 공란우의 선발 또한 수정란이식 시 수태율 향상에 크게 도움이 되는 건 많이 알려져 있는 사실이다. 또한 선발과정을 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 성감별된 동결정액을 이용한 OPU 유래 수정란이식 기술을 개발함으로써 양질의 수정란 활용한다면 경제적으로 필요한 암소 개량이 극대화 될 것으로 판단된다.

## 제 2장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 국내기술개발현황

- 초음파유도 난포란 채취를 위한 기본 기술개발: 소의 마취방법과 채란기구의 개발 (1997년)
- 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구: 1. 발정주기, 계절 및 bST 처치 영향에 관하여 조사 (1997년)
- 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 (1997년)
- 초음파 유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 2. 임신우 유래 난포란으로 부터 산자생산에 관한 연구 (1998년)
- 한우에서 초음파 유래와 도축장 유래 난포란을 이용한 체외 수정란 생산에 관한 연구 (1998년)
- 핵이식 기법을 이용한 한우 쌍태생산에 관한 연구: II. Ovum pick-up (OPU) 유래 공여핵 및 활성화 유도 수핵난자의 핵이식 (1998년)
- 핵이식 기법을 이용한 한우 쌍태생산에 관한 연구: I. Ovum pick-up (OPU), 전기적 세포 융합 및 체외배양 기법을 이용한 복제수정란 생산 (1998년)
- 젖소에서 초음파기기를 이용한 난자 채취에 있어서 손가락 촉지를 이용한 난포란의 채란 방법에 관한 연구 (2000년)
- OPU 채란기간이 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향에 관한 연구 (2010년)
- 한우에 있어서 초음파기기를 이용한 생체 내 개체별 난자 채취 빈도 및 수정란 생산효율에 관한 연구 (2000년)
- 유전자 분석을 통하여 선발된 한우로부터 초음파 유래 체외수정란 이식에 의한 고품질 한우 생산기술의 실용화 II. DNA 검정우로부터 초음파 유래 체외수정란의 생산에 관한 연구 (2001년)
- 젖소 생체로부터 초음파기기와 간이 난자채취기를 이용한 미성숙 난포란의 채란에 관한 연구 (2001년)
- 공란우 개체와 채란기간이 Ovum Pick-Up 유래 수정란 생산 효율에 미치는 영향에 관한 연구 (2010년)
- 초기 임신우의 공란우 활용이 초음파 유도 난자 채취 및 수정란 생산에 미치는 영향에 관한 연구 (2011년)
- 국외에서는 Flow cytometry 개발 (Kamentsky 등, 1967) 이후 미국 XY Inc.와 Sexing Technologies가 주축이 되어 성감별된 정액의 효율적인 생산과 활용방법에 대한 연구가 이루어지고 있으며, 고객이 원하는 종모우의 정액을 성 분리하여 맞춤형 성감별 정액도 생산하고 있다. 아직까지 성감별된 정액을 사용한 체내유래 수정란 생산효율은 극히 미비하여 현재 개발단계이나, 성감별된 정액을 사용한 체외유래 수정란의 생산기술 개발은 매우 활발하며 이미 상용화 되어있다.
- 현재 국내에서의 정자 성분리 기술은 한국섹싱바이오텍이 주로 개발하고 있으며, 젖소뿐만 아니라 한우, 칩소, 백우, 흑우 정자의 성분리 기술도 개발되어있다. 성감별 정액을 이용한 수정란 생산은 경상대학교가 중심으로 진행되고 있으며, 특히 OPU 난자를 이용한 성감별



수정란의 생산에 대한 기술은 상용화 수준으로 개발되어 있다.

## 2절. 국외기술개발현황

- 비수술적 OPU기술을 이용하여 최초 송아지 생산 성공 (1981년).
- 소 난포 발육과 난자 회복에 있어 반복적인 gonadotropin stimulation과 난포채취의 상관관계에 관한 연구 (1993년)
- 소 난자로부터 난포와 체외수정란 생산을 위한 Gonadotrophin을 이용한 식이요법 (1994년)
- 일회용 주사바늘을 이용한 초음파유도 체내 소 난포란 채취 방법 개발 (1995년)
- 이탈리아 mediterranean buffalo cow에서 반복적인 OPU에 관한 연구 (1996년)
- 대리모 연령에 따른 난포의 상태 및 체외수정란 생산에 미치는 영향에 대한 보고 (1997년)
- 소의 난구세포-난자 복합체의 형태학적/발달능력에 대한 주사바늘 끝의 비스듬한 각도와 흡입과정의 영향에 관한 연구 (1997년)
- FSH 처리/ FSH 비처리에 따른 말의 반복적인 transvaginal oocyte aspiration에 관한 연구 (1997)
- 임신한 어린 암소에서 과배란처리가 반복적인 체내유래 난자 회수와 체외수정란 생산에 미치는 영향에 관한 연구 (1997년)
- GnRH 처리 유/무에 따른 난자의 회복에 관한 연구 (1998년)
- 반복적인 체내유래난자의 채란이 소 난자의회복과 난포발달에 미치는 영향에 관한 연구 (1998년)

# 제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 1. 1차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
공란우 선발과 정액의 선택	젓소 공란우의 연간 우유생산량 체형 등이 우수하여도 번식기의 상태와 난소의 상태, 채취된 난자의 상태, 최종 수정란의 생산 효율이 낮으면 공란우로 활용할 수 없음. 따라서, 번식기에 문제가 없는 개체 중 연간 우유생산량이 우수한 공란우를 선정하되 OPU 작업을 통해 수정란의 1-2회 생산 후 최종 선정하여야 할 것임. 정액은 유량, 유지율, 단백질, 체형의 유전능력이 모두 우수하며 신뢰도가 높으며 체형이 우수한 정액을 우선 선정하고 선정된 공란우와의 근친도를 고려해야 할 것으로 사료됨	부산우유협동조합 소속의 조합원 목장에서 연간 우유생산량과 체형이 우수한 젓소의 미경산우 7두를 직장검사를 통해서 난소, 번식기 점검 후 평가하여 최종 선정함. 공란우에 사용되는 정액은 선정된 공란우와의 근친도를 1차적으로 고려하였고 2차적으로 유량, 유지율, 단백질, 체형의 유전능력이 모두 우수하며 신뢰도가 높은 한국형 종모우와 캐나다산 종모우를 선정하였음.
체내유래 난자를 채취하기 위한 최적의 환경 및 수정란을 생산하기 위한 실험환경의 조성	OPU 유래 체내난자 채취를 위해서는 초음파채취기를 이용하여 난자를 채취함으로써 기자재의 효율적인 활용이 중요함. 또한, 채취된 난자는 외부의 온도에 매우 민감하여 채란하는 공간의 온도의 유지에도 신경써야 함. 따라서, 채란실의 내부온도를 조절할 수 있는 환경의 조성과 채취된 수정란을 오염이 되지 않게 하는 청결함도 최우선 시 고려되어야 할 것임.	초음파 채취기를 이용한 OPU 유래 체내난자의 채취과정은 기존의 연구에서 이미 정립되어있는 방법을 준용하였으나 본 연구실의 작업공간에 맞게 보정틀을 설치하였으며 보정틀의 설치 시 초음파기구의 효율적인 활용이 가능한 공간을 두었으며 이때 설치된 보정틀은 공란우의 입식이 용이하게 특수제작하여 활용하였음. 외부온도 조절 시스템으로 냉난방기를 설치하여 항상 30℃ 이상이 되도록 하였으며, 채취된 난자의 온도를 항상 35℃ 이상으로 유지하기 위해서 water bath를 설치하여 체내유래 난자를 채취하기 위한 최적의 환경을 조성하였음.
OPU 유래 체내 수정란 생산과정에서 저혈청 및 무혈청배지의 효율적 배양체계 구축	체외 수정란의 생산시스템 과정 중 배양과정에서 과다한 혈청의 첨가로 수정란 이식 후 유산율과 기율율의 증가가 우려되어 이 문제점을 해결하고자 저혈청이 첨가된 배지와 무혈청배지를 제조하여 활용하고자 함. 1차적으로 저혈청	체외수정란의 생산 과정 중에 후기배양의 과정에서 기존의 10% 혈청을 첨가한 배지를 5%를 첨가하여 10% 배지와 5% 배지와 수정란의 생산효율과 생산된 수정란의 세포수를 측정하여 품질을 비교하였음.

	<p>이 첨가된 배지를 이용하여 체외 수정란의 생산효율을 확인하고 OPU 시스템에 적용하고자 함.</p>	
<p>씨수소의 효율적인 관리 및 채취기술 개발과 공급</p>	<p>성감별 정액 생산을 위한 종모우의 유량, 유지방, 유단백, 체형 유전능력을 고려한 우수 종모우중 성감별 정액 생산이 용이한 개체간의 특성과 차이를 고려하여 최상의 종모우를 확보하는데 있으며 1차년도는 3두(한국형 2두, 캐나다형 1두)를 공시하여 체계를 정립했고 2차년도는 8두(미국형 6두, 캐나다형 2두)를 공시하여 최상의 종모우 선정하고 고능력의 성감별 OPU 유래 체외수정란 생산이 가능하도록 고려해야 함.</p>	<p>성감별 정액의 생산을 위해 선정된 종모우는 농협 젓소개량사업소에서 사육되고 있는 종모우 중에서 유량, 유지방, 유단백, 체형 유전능력이 우수한 3두(한국형 2두, 캐나다형 1두)를 우선적으로 선정하여, 성감별 정액 생산을 위한 공시를 하였으며, 공시된 종모우의 채취원정액의 성상과 성감별을 한 이후의 액상 및 동결정액의 성상을 살펴 본 결과 활력, 생존율, 침체정상율, 기형율 등이 우수하여 성감별 정액 생산을 위한 체계와 운영 관리시스템이 정립되었음.</p>
<p>선발된 고능력 젓소의 정액을 Flow cytometer 이용하여 정자성분리 및 동결정액 제조체계 정립</p>	<p>정자를 형광염색제로 염색할 때 염색제의 적정 농도 및 염색시간을 결정하는 것이 정자의 성분리에 절대적으로 필요하다. 적정한 정자염색이 이루어지지 않으면 플로우 사이토미G터로 성분리를 할 때 암수 정자의 구분이 어렵고 그에 따라 분리속도와 순도가 저하되기 때문이다.</p>	<p>젓소개량 사업소에서 채취된 원정액을 빠른 시간 내에 정자의 성을 분리하는 연구실로 이송하는 방법과 정자의 손상을 최소화 할 수 있는 희석액 및 이송 온도 등을 최적화하였음. 또한, 정자 성분리를 더욱 효율적으로 하기 위해서 형광염색제의 농도를 조절하는 방법을 시도하였음. 각 개체별 정액을 형광염색제의 농도 5, 5.5, 6, 6.5, 7 ul/ml의 농도에서 각각 45분 및 60분간 염색하여 암수 정자간 구분이 가장 잘되는 분리도 조건을 확립하였음.</p>
<p>개체별 정자 성분리 체계 및 정액냉동 기술의 확립</p>	<p>개체별 적정 형광염색제의 농도가 확립이 되어도 성분리 속도 및 분리된 정자를 냉동했을 때 개체간 차이가 있을수 있으며 이를 최소화 하는 것이 중요하다. 따라서 개체간의 차이를 먼저 확인하는 것이 차후 그 차이를 줄이는 방법개발에 중요하다.</p>	<p>6두의 종모우 정액을 이용하여 정자를 형광염색제로 염색 후 성분리를 실시하였다. 성분리는 같은 EPS (event per second, 초당 정자 인지속도)와 암정자 gate (25%)로 세팅하여 개체간 비교를 실시하였다.</p>

## 2. 1차년도 세부연구수행 결과

### [제 1세부과제] 체내유래 암컷수정란 생산기술 개발

#### ○ 공란우의 선발과 정액의 선택

본 연구에서는 총 7두의 공란우(관리번호:2571, 2568, 7888, 7887, 2021, 0589, 6474)를 활용하였다. 이들의 선발을 위해서 공란우는 기본적으로 정상적인 번식능력을 가지고 있으며 특히 감염성 질병이 없으며 번식기관의 능력에 문제가 없는 개체를 선발하도록 하였으며, 이들 개체 중에서 부산우유협동조합에서 연간 우유생산량(kg)이 우수한 공란우를 우선적으로 8두를 선정하였으며, 직장검사와 초음파기기를 통해 2회/주 난자채취를 통해 수정란 생산효율이 우수한 공란우를 최종적으로 7두를 선정하였다. 모든 공란우는 미경산우를 선정하였다.

공란우에서 채취한 난자와 체외수정을 유도할 정액은 선정된 공란우와의 근친도를 1차적으로 고려하였고 2차적으로 유량, 유지율, 단백질, 체형의 유전능력이 모두 우수하며 신뢰도가 높은 한국형 종모우와 캐나다산 종모우를 선정하였다.

[개체정보]		[개체정보]		[개체정보]		[개체정보]	
등록번호	성년월일	등록번호	성년월일	등록번호	성년월일	등록번호	성년월일
500712771	2009-11-25	500626192	2008-12-06	500722193	2006-01-10	500731932	2009-06-12
이름	성별	이름	성별	이름	성별	이름	성별
명품 암컷 600호	암컷	명품 암컷 65호	암컷	명품 암컷 192호	암컷	명품 암컷 12호	암컷
산자	양분기	산자	양분기	산자	양분기	산자	양분기
암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷
성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적
30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적
연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적
비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호
20091348617	2009013822	20091348643	20090223196	20090803250	2009041822	20090804009	2009022977
이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름
스마트 암컷 001호 (2009030044)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	영드-문드 마브레코 블러버-이태(29410124)	제인-조크 코이스 아틀-이태(790485)	그림날 캐나다모(200901182)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)
산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자
암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷
성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적
30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적
연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적
비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호
20091348617	20091348643	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617
이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름
스마트 암컷 001호 (2009030044)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	영드-문드 마브레코 블러버-이태(29410124)	제인-조크 코이스 아틀-이태(790485)	그림날 캐나다모(200901182)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)
산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자
암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷
성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적
30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적
연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적
비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호
20091348617	20091348643	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617
이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름
스마트 암컷 001호 (2009030044)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	영드-문드 마브레코 블러버-이태(29410124)	제인-조크 코이스 아틀-이태(790485)	그림날 캐나다모(200901182)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)
산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자
암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷
성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적
30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적
연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적
비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호
20091348617	20091348643	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617
이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름
스마트 암컷 001호 (2009030044)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	영드-문드 마브레코 블러버-이태(29410124)	제인-조크 코이스 아틀-이태(790485)	그림날 캐나다모(200901182)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)
산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자
암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷
성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적
30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적
연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적
비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호
20091348617	20091348643	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617
이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름
스마트 암컷 001호 (2009030044)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	영드-문드 마브레코 블러버-이태(29410124)	제인-조크 코이스 아틀-이태(790485)	그림날 캐나다모(200901182)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)
산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자
암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷
성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적
30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적
연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적
비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호
20091348617	20091348643	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617
이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름
스마트 암컷 001호 (2009030044)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	영드-문드 마브레코 블러버-이태(29410124)	제인-조크 코이스 아틀-이태(790485)	그림날 캐나다모(200901182)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)
산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자
암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷
성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적
30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적
연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적
비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호
20091348617	20091348643	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617
이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름
스마트 암컷 001호 (2009030044)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	영드-문드 마브레코 블러버-이태(29410124)	제인-조크 코이스 아틀-이태(790485)	그림날 캐나다모(200901182)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)
산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자
암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷
성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적
30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적
연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적
비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호
20091348617	20091348643	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617	20091348617
이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름	이름
스마트 암컷 001호 (2009030044)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	영드-문드 마브레코 블러버-이태(29410124)	제인-조크 코이스 아틀-이태(790485)	그림날 캐나다모(200901182)	제인-울 번뇌의 열매 코헤어안-이태(118582)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)	리안-타 브리틀리 마냥-이태(7906375)
산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자	산자
암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷	암컷
성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적	성적
30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적	30일 성적
연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적	연년형 성적
비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호	비밀번호

그림 1. 최종 선정된 공란우 7두의 등록증.

#### ○ OPU 유래 난자채취 환경 및 실험환경 조성

##### 1. OPU 유래 난자의 효율적인 채취방법 정립

생체 내 미성숙난자 채란을 위한 난포란의 초음파 관찰은 MyLab™ 30 VET GOLD(Esaote, Genova ITALY) 및 탐촉자(EC123; Micro-Convex 9-3 MHz)는 6.6 MHz convex scanner를 사용하였고, 미성숙 난자 흡인에는 일회용 주사침(18 G)을 사용하였으며,

난자 흡입용 10 IU/ml Heparin이 첨가된 기본배양액(HEPES + 10 IU Heparin)로 주사침 및 흡입관 내를 충전하였다. 공란우는 본 연구소에서 개조한 보정틀에 고정시켜 움직임의 최소화하였으며 직장 내의 분변을 제거 및 꼬리를 고정하고, 흐르는 물을 이용하여 회음부와 외음부의 오물을 세척한 다음 2%로 희석된 povidone iodine 및 70% alcohol으로 외음부를 소독하였다. 복부 및 질벽의 긴장을 완화시키기 위해서 lidocaine HCl(2% 염산리도카인, 광명제약, 화성) 마취제를 약 3~7 ml를 미근부의 제 1, 2미추간에 주사하여 부분마취를 유도하였다. 초음파 탐촉자는 condom으로 보호하여 질을 통해 삽입하였으며 자궁경부의 좌측 또는 우측에 밀착 위치하도록 하였다. 난소는 다른 손으로 직장벽을 통해서 상태, 위치를 확인 및 견인하여 질내에 있는 탐촉자 선단부에 위치하여 초음파의 모니터 상으로 난포의 상태가 뚜렷한 흑점이 나타나도록 조정 및 고정 후 난포의 개수를 확인하였으며, 채란 가능한 난포를 monitor 상의 biopsy line이 난포를 횡절단할 수 있도록 위치시켜 난포외벽선이 뚜렷하도록 난소를 조작하여 채란준비를 하였다. 난소의 천자는 일회용 long 주사침(18 G)으로 질벽을 관통하여 복강 내로 들어가고 monitor image의 난소에서 확인된 2~6 mm 크기의 난포내 및 시술자 감각에 주사침이 난소 및 난포강으로 진입되는 것이 감각적으로 전달됨과 동시에 regulated vacuum pump의 foot switch를 작동시켰다. 즉 needle의 끝이 난포강으로 진입하는 것을 감각과 monitor image상으로 확인할 수 있다. 흡입은 검게 나타난 난포강의 부위가 monitor 상에서 완전히 사라지고 주사침의 끝이 난포벽에 닿아 음압이 차단될 때까지 계속하여 실시하였다. 또한 흡입시 주사침을 회전 및 압을 유지하여 잔존 난포액 및 난포란이 모두 흡입되도록 하였다(그림 1). 채란으로 유입되는 혈액의 응고방지를 위해 2~3개의 난포 흡입 후에 배지로 주사침 내강을 세척하였으며, 이러한 과정으로 모든 난포의 흡입이 끝날 때까지 반복하였다. 이때 60~70 mm Hg(10~15 ml/min)의 음압을 유지하였다. 채취기술에서의 핵심은 주 2회에 소량의 미성숙 난자를 채취함에 있어서 한 개의 유실없이 채취하는 것이다. 이를 위해서 유입된 혈액과 유착현상을 방지하기 위해 배지에 10 IU Heparin을 첨가하였고 반복적으로 배지로 세척하였다. 채란은 가능한 정확하고 신속하게 작업을 완료하도록 하였다. 이와 같은 방법으로 연속하여 난포란을 흡입하여 모니터상에서 난포가 완전히 흡입되는 것을 확인하고 needle을 후진한 다음 난소를 조작 및 이동시켜 동일하고 반복적인 방법으로 채란하였다. 개체의 모든 난포를 천자 후 잔류된 난포액 회수를 위해 주사침과 연결튜브를 흡입용 10 IU/ml Heparin이 첨가된 기본배양액(HEPES + 10 IU Heparin)로 세척하였다. 흡입한 난포액 및 란은 채란 시 외기온도에 의한 충격 최소화를 위해 온도가 일정한 가운데 보관 및 보온병에 보관하여 실험실로 옮겼다.

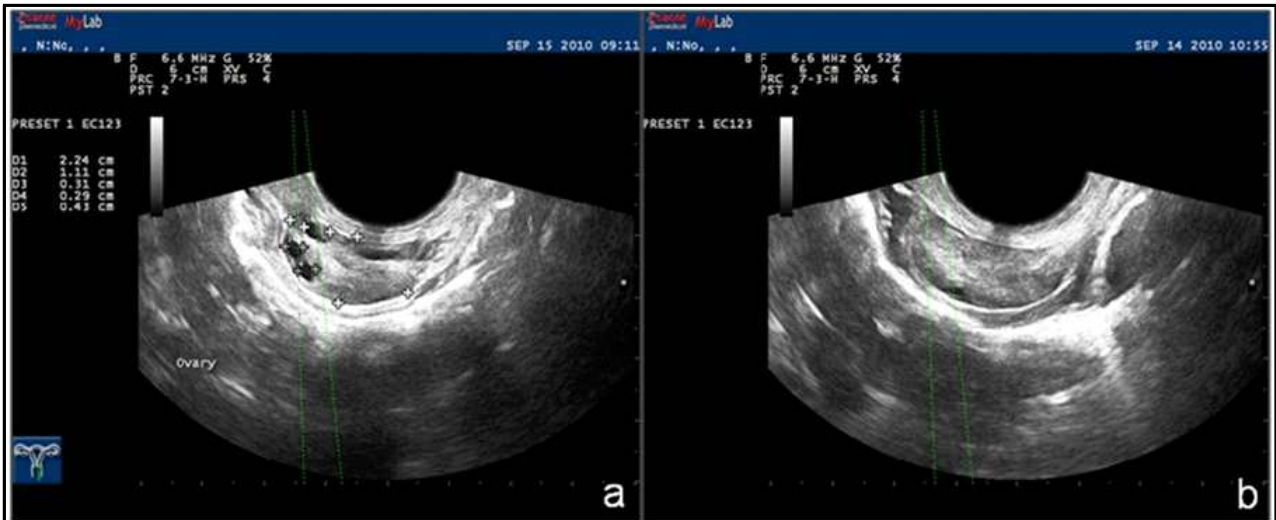


그림 2. 초음파기기를 이용한 난포란의 채취모습.

Emcon Embryo filter(Agtec, USA)를 이용하여 혈액 등을 여과시켜 실체현미경으로 난자를 회수하였고 난포란의 등급분류는 세포질의 색깔과 난구세포 부착정도에 따라 평가기준 Grade 1~4까지 설정하여 분류하였다. 회수된 모든 난자를 체외성숙에 제공하였다. 본 실험에 공시된 임신초기 공란우의 임신황체가 존재하는 난소의 OPU는 황체조직외의 난소 조직부분에 존재하는 난포를 puncture하여 난포란을 흡입하였다.

위와 같은 방법으로 난자 채란을 실시하였으며 최종적으로 채취간격, 회수액의 조성, 채란 과정이 적절하였으며 난포란의 효율적인 채란이 가능하였다.

표 1. 공란우 7두의 난포란의 채란과 난자의 회수

채란횟수	개체번호	난포수	난자수	Grade			
				G1	G2	G3	G4
19	2571	222	130	34	42	34	20
19	2568	267	161	59	50	28	24
19	7888	199	93	32	26	16	19
19	7887	169	81	32	26	21	2
16	2021	88	23	10	6	6	1
19	0589	269	148	27	73	25	23
19	6474	177	85	26	37	10	12
130	합계	1391	721	220	260	140	101

표 1을 보면 본 연구실에서 정립한 OPU 채란방법으로 젓소 7두에서 총 130회 채란하여 721개의 난자를 회수하였다. 이는 1회 채취 시 1두당 약 5.5개의 난자를 채취한 것으로써 기존의 보고된 연구와 비교하여 많은 난자를 채취한 것으로 사료된다. 따라서 본 연구팀에서 정립한 OPU 채란과정 및 채란 방법을 이용하면 효율적으로 난자를 채취할 수 있을 것이다.

## 2. OPU 유래 난자채취 환경 및 실험환경 조성

### - 공란우의 입식이 용이한 시스템 설치

OPU를 통해 공란우에서 난자를 채취하기 전 보정틀에 공란우의 입식이 용이함에 따라 채란 작업의 시간을 줄일 수 있다. 채란작업이 빨라짐에 따라 먼저 채란한 공란우의 보관시간이 줄어들게 되면 난자의 등급에 지대한 영향을 미치고 수정란의 생산효율에 큰 영향을 미칠 것으로 판단된다. 때문에 본 연구실에서는 기존에 공란우의 입식이 어려웠던 보정틀을 개조하여 손쉽게 공란우의 입식이 가능하게 보정틀을 특수 제작하여 채란시간을 단축하였다(그림 3).



그림 3. 입식이 용이하게 제작한 특수 보정틀에 공란우를 입식한 모습.

### - 난자채취 후 난자의 온도조절장치 설치

채란 중에 난소의 난포로부터 흡입되는 난자는 배지(HEPES + 10 IU Heparin)에 유입되는데, 이때 배지는 난포의 유입 중에도 적정온도(37°C)를 유지할 수 있도록 온도조절장치를 이용한 항온수조에 담겨져 있게 하였다. 항온수저는 채란과정 중에 생기는 움직임에 같이 움직일 수 있도록 이동식 선반위에 설치하였다 (그림 4).



그림 4. OPU 유래 체내난자의 채취과정에서 회수된 난자의 온도유지 장치.

○ OPU 유래 체내 수정란 생산과정에서 성감별 정자를 이용하여 압컷수정란 생산기술 개발

1. 성감별정자의 정상성 분석과 체외수정란의 생산 효율

성감별 정자는 정자를 성감별하는 과정 중에 DNA 손상, 희석, 원심분리, 고압, 레이저 빛 등과 같은 많은 종류의 잠재적인 위험에 노출된다. 이와 같은 위험에 의해 정자 무결성, 막구조, morphology 등에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 이 상황은 동결과정에서도 악화될 수 있다. 따라서, 본 연구에서 2종류의 정액을 성감별 되지 않은 정액, 성감별 후 동결하지 않은 정액, 성감별 후 동결한 정액으로 처리구를 나누어 정자 침체의 정상성을 조사하였다. 결과는 표 2에 나타내었으며 성감별되지 않은 정액 > 성감별 후 동결하지 않은 액상정액 > 성감별 후 동결한 정액 순으로 정상적인 정자의 수가 많았다.

표 2. 2종류 정액의 보통, 액상, 성감별 정자의 침체의 정상성 조사

	N-1007	액상 S-1007	S-1007	N-1009	액상 S-1009	S-1009
<b>Intact</b>	37.3	27.5	14.5	48.8	27	19.2
<b>Damage</b>	50.2	48.5	30.3	43.2	48	45.8
<b>Missing</b>	12.5	24	55.2	13	25	35

\* N(normal sperm), S(sexing sperm).

표 3은 보통, 성감별 정자에 따른 수정란 생산 효율을 조사하였다. 표 2에서 성감별정자보다 보통 정자가 정상적인 정자의 수가 월등히 많았다. 때문에 체외 수정시 성감별정자의 수정률이 현저히 낮았으며 배아 발달율 또한 매우 낮았다.

표 3. 일반동결정액, 성감별 정자에 따른 수정란 생산효율 조사

	난자수	수정률	배아발달율
N-1007	210	148(77.1)	51(26.6)
S-1007	190	88(49.4)	15(8.4)
N-1009	210	151(76.3)	56(28.3)
S-1009	180	78(46.2)	14(8.30)

\* N (Normal sperm), S (Sexing sperm)

성감별 정자의 체외수정 효율의 증가와 수정란배양시스템의 향상 등에 대해 많은 연구는 이루어 지고 있으나 산업적으로 적용될 만큼 효율을 보고된 바는 없다. 당해연도 연구에서는 성감별 정자의 침체이상에 의해 수정과 배아생산효율이 낮다는 것을 규명하였고, 차년도 연구에서 효율적인 수정방법과 수정란배양시스템에 대한 연구를 시작할 것이다.



2. OPU 유래 체내 수정란 생산과정에서 저혈청 및 무혈청배지의 효율적 배양체계 구축  
 본 연구에서는 후기배양 과정에서 혈청의 첨가농도를 조절하여 수정란의 생산율을 비교분석함으로써 적절한 혈청의 첨가 농도를 규명하여 가장 효율적인 저혈청 농도의 체외수정란의 배양시스템을 제시하고자 한다.

표 4. 혈청농도에 따른 체외수정란의 생산효율

처리구	난자수	수정률 (%)	배발달율 (%)
1%	273	215 (78.8)	44 (16.1) <sup>a</sup>
5%	272	213 (78.3)	62 (22.8) <sup>b</sup>
10%	273	221 (81)	85 (31.1) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Values with different superscript were denoted significantly different ( $P < 0.05$ ).

표 4.는 혈청농도에 따른 체외수정란의 생산효율을 나타내었다. 1% 혈청이 첨가된 처리구에서는 수정란의 생산효율이 5%, 10% 처리구에 비해 낮았다. 하지만, 5%의 처리구에서는 기존의 배지인 10%의 처리구보다 조금 낮은 생산효율을 나타내고 있으나 유의적으로 차이는 없었다.

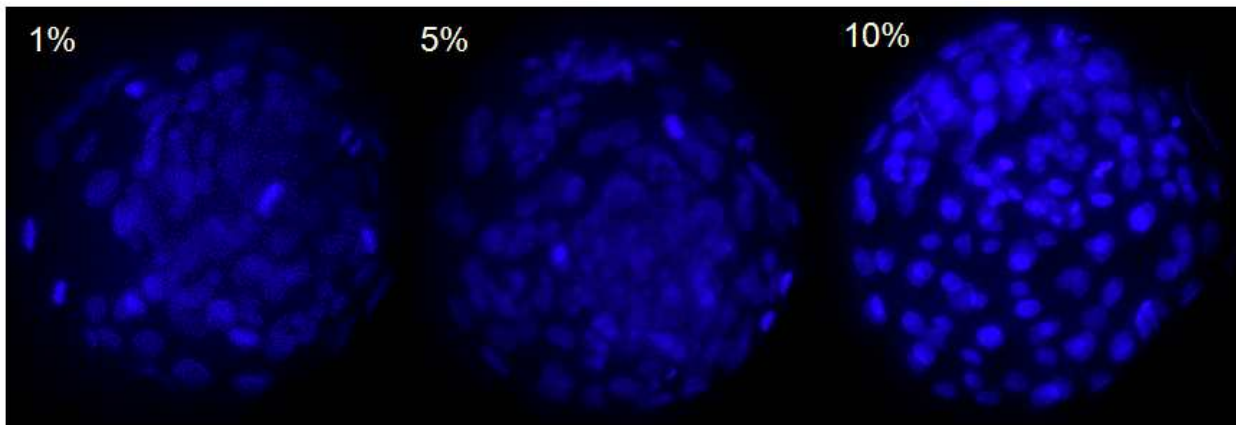


그림 5. 혈청농도에 따라 생산된 체외수정란의 염색.

표 5.는 혈청농도에 따라 생산된 체외수정란의 등급을 조사한 결과이다. 1% FBS 를 첨가한 그룹에서  $97.8 \pm 32.2$ 개로 10% FBS를 첨가한 그룹  $139.1 \pm 32.9$ 개보다 유의적으로 작았으나, 5% FBS를 첨가한 그룹은  $111.4 \pm 31.7$ 개로 10% FBS를 첨가한 그룹과 유의적인 차이가 없었다( $P < 0.05$ ). 본 연구에서는 후기배양 과정에서 혈청의 첨가농도를 조절하여 수정란의 생산율을 비교분석함으로써 적절한 혈청의 첨가 농도를 규명하여 가장 효율적인 저혈청 농도의 체외수정란의 배양시스템을 제시하고자 하였으며 연구 결과 5%혈청이 첨가된 배지에서 효율이 기존의 10%혈청이 첨가된 배지와 비슷한 효율을 보였다. 따라서, 1차적으로 5%혈청이 첨가된 저혈청 배지를 이용하여 수정란을 생산하여야 할 것이며, 지속적인 연구를 실시하여 무혈청배지에 대한 연구를 진행할 것이다.

표 5. 혈청농도에 따라 생산된 체외수정란의 등급조사

처리구	공시 수정란	세포 수
1%	10	97.8 ± 32.2 <sup>a</sup>
5%	10	111.4 ± 31.7 <sup>b</sup>
10%	10	139.1 ± 32.9 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Values with different superscript were denoted significantly different ( $P<0.05$ ).

○ 젖소 공란우의 효율적인 활용방안 조사(임신된 공란우와 임신하지 않는 공란우의 OPU효율 비교조사)

본 연구의 목적은 공란우로서 고능력의 임신우를 상정하여 볼 때 생식생리학적으로 임신 중에는 수정란의 채취가 불가능하나 OPU 기법을 이용하여 임신 초기 개체에서 일정기간 미성숙 난자의 반복채취, 회수율, 등급을 분석하고, 이를 체외성숙 및 체외수정으로 임신된 공란우의 임신초기에서 반복적이면서 효율적인 수정란 생산 방안에 대하여 알아보하고자 하였다.

표 6. 임신한 공란우와 임신하지 않은 공란우의 채란효율 비교

처리구	채란횟수	난포개수	회수된 난자개수
비 임신우	68	721 <sup>a</sup> (10.6±3.9)	364 <sup>a</sup> (5.4±3.4)
임신우	34	441 <sup>b</sup> (13.0±4.3)	261 <sup>b</sup> (7.7±3.6)

<sup>a,b</sup> Values with different superscript were denoted significantly different ( $P<0.05$ ).

임신된 개체는 인공수정 후 30일에 직장 및 초음파 진단기를 이용하여 임신을 확인하고 3~4일 간격으로 주 2회 채란으로 흡입된 난포 및 난자의 회수율은 표 6과 같다. 초음파유도 Holstein 미경산우 생체 내에서 주기적으로 4두로부터 채란한 결과는 주 2회 총 68회 반복채란으로 monitor image에 관찰된 가시난포 721개(회당 10.6±3.9)를 흡입하여 364개(회당 5.4±3.4)의 난자가 회수되어 50.5%의 채란율을 보였으나, 임신된 미경산 임신초기 우 2두에서 34회 채란으로 441개(회당 13.0±4.3)의 가시난포 흡입으로 261개(회당 7.7±3.6)의 난자가 회수되어 59.2%의 채란효율로 임신우가 유의적으로 높게 나타나는 것은 임신된 개체의 초기에 가시난포가 발생하고, 채란 가능하다는 결과가 나타나므로 이로써 임신초기에 주 2회 연속적 반복적으로 임신초기 고능력우로부터 생체 내 난포란의 채란이 가능하며 그 활용의 가치가 높을 것으로 사료된다.

**표 7. 임신우와 비임신우의 회수된 난자의 등급조사**

처리구	채란횟수	채란된 난자수	난자등급				
			G 1	G 2	G 3	G 4	G1 + G2
비 임신우	68	364 <sup>a</sup> (5.4±3.4)	107 <sup>a</sup> (1.6±1.2)	143 (2.1±2.1)	63 <sup>a</sup> (0.9±1.4)	51 (0.8±1.3)	250 <sup>a</sup> (3.7±2.7)
임신우	34	261 <sup>b</sup> (7.7±3.6)	83 <sup>b</sup> (2.4±1.3)	82 (2.4±2.2)	56 <sup>b</sup> (1.6±1.9)	40 (1.2±1.5)	165 <sup>b</sup> (4.9±2.6)

임신초기의 임신우와 비임신우에서 회수된 난자의 등급은 Table 7과 같다. 난자등급은 비 임신우 및 임신우에서 평균 5.4±3.4개 및 7.7±3.6개, 회수된 난자의 Grade 2(평균 2.1±2.1개 및 2.4±2.2개) 와 Grade 4(평균 0.8±1.3 및 1.2±1.5개)에서는 유의적인 차이가 없었으나, Grade 1(평균 1.6±1.2 및 2.4±1.3개)과 Grade 3(평균 0.9±1.4 및 1.6±1.9개)으로 회수된 난자의 등급은 유의차가 있었으며, Grade 1, 2등급의 출현율은 각각 평균 3.7±2.7개 및 평균 4.9±2.6개로 임신우에서 유의적으로 높게 나타났다. Garcia 등(1998)이 Holstein 육성우를 이용하여 주 1회 및 2회 반복적 채란의 효과에서 주당 2회 채란이 효과적이며, 또한 회수된 1, 2 등급 난자의 평균 수 및 품질이 3, 4등급보다 높은 결과는 본 연구의 주당 2회 채란으로 회수된 난자의 등급비율과 유사하였다.

**표 8. 임신우와 비 임신우의 배아발달효율 조사**

처리구	채란횟수	난자수	수정율 (%)	배아 발달율 (%)
비 임신우	68	364	221 <sup>a</sup> (3.3±2.4)	93(25.5)
임신우	34	261	158 <sup>b</sup> (4.8±2.3)	58(22.2)

<sup>a,b</sup> Values with different superscript were denoted significantly different ( $P<0.05$ ).

임신초기 및 비 임신우로부터 채취한 난포란을 각 개체별 체외성숙 및 체외수정 후 배반포의 발생율을 표 8.에서 나타낸 결과와 같다. 비 임신우의 수정 및 분할율에서 221개 (3.3±2.4), 임신우는 158개(4.8±2.3)로 유의적으로 높게 나타났으나, 이식가능한 배반포 발달이 93개 및 58개, 발달율은 25.5% 및 22.2%로 임신초기개체에서 낮은 비율을 보였으나 유의차는 없었으며, 평균 배반포발달은 평균 1.4±1.1개 및 1.7±0.9개로 채란 회수당 비 임신우보다 임신우의 평균수가 높았으나 유의차는 없었다.

[제 1협동과제] 고능력 종모우 선발기준 정립 및 효율적인 채취기술 개발과 공급

○ 고능력 종모우 선발기준 정립 및 효율적인 채취기술 개발과 공급

정책은 농협 젖소개량사업소에서 사육되고 있는 종모우중에서 유량, 유지방, 유단백, 체형 유전능력이 우수한 3두(한국형 2두, 캐나다형 1두)를 우선적으로 선정하여(표 9), 성감별 정액 생산을 위한 공시를 하였으며, 공시된 종모우의 채취 원정책의 성상과 성감별을 한 이후의 액상 및 동결정액의 성상을 살펴 본 결과(표 10) 활력, 생존율, 침체정상을, 기형을 등이 우수하여 성감별 정액 생산을 위한 체계와 운영 관리시스템이 정립되었으며, OPU 유래 성감별 체외수정란 생산을 위한 후속 연구의 공시 및 추진이 가능하다고 판단되었다.

표 9. 성감별 정액 생산을 위하여 공시된 종모우의 유전능력 및 내역

구 분	종모우명 (정액번호)	종합지수	유전전달능력				중점개량형질	
			유 량	유지방	유단백	체 형		
한국형	베타비아 (H-1007)	(KTPI) 1,031	666	12.2	15.2	-0.7	0.6	유량, 지방, 단 백
	포비든 (H-1009)	(KTPI) 945	-54	3.8	1.5	1.6	2.7	체형, 유방
	리틀락 (H-304)	(LPI) 1,075	1,507	8	48	3	4	유량, 유단백

표 10. 공시 종모우 원정책 및 성감별 정액의 성상검사 결과

종모우명 (정액번호)	원정책 (활 력)	성감별 액상정액		성감별 동결정액			비 고	
		활 력	침체정상을	활 력	생존율	침체정상을		기형율
베타비아 (H-1007)	72.5	67.5	80.5	45.0	61.0	77.0	8.0	2회
포비든 (H-1009)	76.5	66.0	82.4	50.0	70.0	77.7	7.3	6회
리틀락 (H-304)	77.5	72.5	84.5	46.7	71.0	78.0	6.7	6회

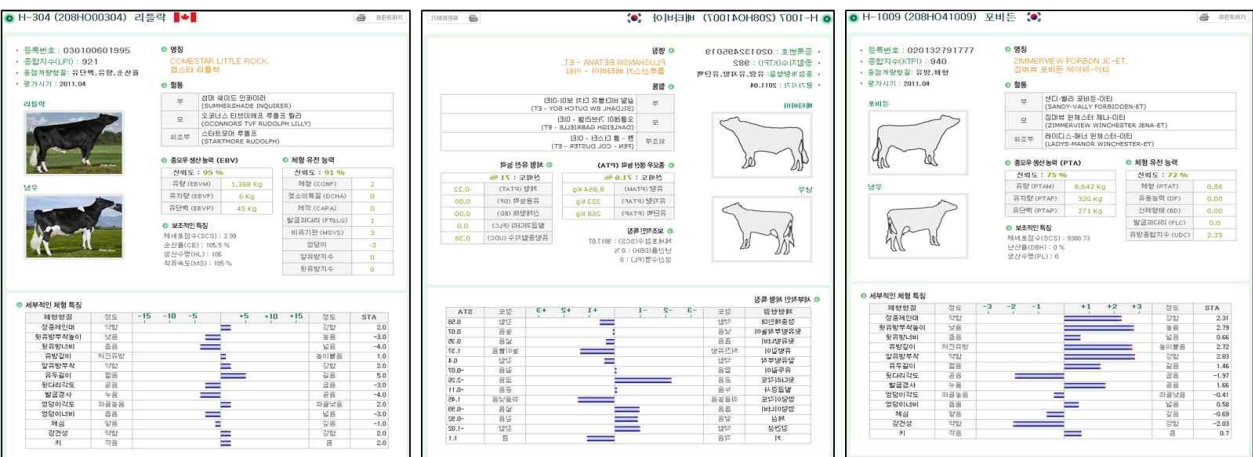


그림 6. 공시 종모우의 등록증.

**[제 2협동과제] 성감별정자의 분리효율 향상기술 개발**

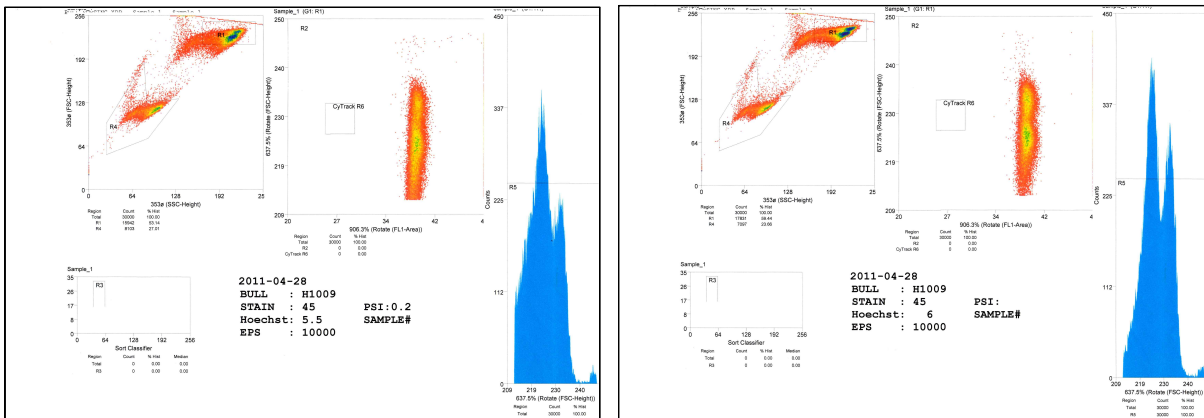
**○ 종모우 개체별 형광염색제의 최적화**

연구실로 이송된 원정액은 3 ul를 Sheath fluid에서 300배로 희석 후 혈구계산기를 이용하여 정액농도를 계산하였다. 형광염색제에 의한 정자 염색을 위해 1 ml의 Talp WS (XY001®)에 정자를 200 x 10<sup>6</sup>/ml 농도로 넣고 5 mg/ml로 조정된 형광염색제 (Hoechst 33342)를 5, 5.5, 6, 6.5, 7 ul/ml의 농도로 넣은후 34oC의 항온수조에서 각각 45 분 및 60분간 염색하였다. 염색된 샘플은 4%의 난황과 5% FD&C #40이 함유된 1 ml의 Talp WS (XY001®)를 첨가 후 상하로 뒤집어 섞고 40 um의 나일론망을 이용하여 덩어리진 정자들을 제거하였다.

**표 11. 종모우 개체별 형광 염색 후 정자 분리도의 차이.**

종모우 번호	분리도
304	7
1007	5
1009	6

염색된 정자 샘플은 MoFlo XDP (XY, Inc)를 이용하여 EPS를 10,000/sec, gate를 25%로 지정 후 가장 좋은 분리도를 나타내는 적정 형광염색제의 농도를 비교 하였다.



**그림 7. 형광염색제의 농도에 따른 정자 분리도.**

최적 형광염색제의 농도에서 종모우에 따른 정자 분리도는 표 1에서와 같다. 분리도는 숫자가 낮을수록 그림 1에서 보는바와 같이 그래프의 골이 깊은 것을 의미하며, 이는 암수 정자의 분리가 더 명확하게 되는 것을 의미한다.

**○ 개체별 정자 성분리 체계 및 정액냉동 기술의 확립**

종모우 개체별 최적의 형광 염색제에서 정자를 염색 후 MoFlo XDP를 이용하여 EPS를 30000/second, gate를 25%로 지정한 후 암정자를 분리하여 20%의 난황이 함유된 3 ml의 Tris WS 300 (XY005®)에 12 ml을 수집하였다. 암정자의 수집에는 50 ml 튜브를 이용하였으며, 수집된 정자는 5°C의 냉장실에서 90분간 냉장 후 15 ml의 CRE12G (XY004®)를 넣고 900 Pg의 속도로 20분간 원심분리 하였다. 그후 상층액은 제거하고 남은 정자 펠렛을 균일하게 섞은후 3 ul를 30배로 희석하여 혈구계산기로 정자 농도를 계산하였다. 정자농도는 10 x

10<sup>6</sup> sperm/ml 농도로 조정 후 0.25 ml 스트로에 충전하고 PVA분말로 밀봉하였으며, 액체질소 vapor에서 20분간 정지 후 액체질소에 바로 침지하여 냉동하였다. 냉동된 정자의 용해후 활력도 검사는 200배의 현미경하에서 실시하였다. 종모우 개체에 따른 암정자의 분리속도와 분리된 정자의 냉동 용해 후 활력도는 표 2와 같다.

표 12. 종모우 개체에 따른 암정자의 분리속도와 분리된 정자의 냉동 용해 후 활력도

종모우 번호	암정자 분리속도 (k/sec)	냉동용해 후 활력도 (%)
304	3.1	27
1007	3.1	45
1009	3.8	48

암정자의 분리 동일한 기계 셀팅 하에서 정자를 분리하더라도 종모우에 따라 초당 1600 - 4800으로 큰 차이가 있으며, 분리된 정자의 냉동 용해 후 활력도 에서도 10 - 50%로 큰 차이를 나타내었다. 따라서 정자의 성분리에 있어서 종모우에 따른 차이가 있기에 종모우 선정이 중요함을 알 수 있었다.

[제 3협동과제] OPU 유래 수정란 이식효율 향상기술 개발

○ 수란우의 선발 및 관리

OPU에 의해 생산된 수정란 이식을 성공하기 위해서 생존성이 높은 정상적인 발달능력을 가진 수정란이 자궁 내에서 정상적인 착상을 위한 수란우를 선정을 철저하게 실시하였다. 즉 수태율 향상을 위해 이식 가능한 농가를 선정하여 수란우 선정 조건, 수정란 이식에 대한 설명과 수태율을 향상하기 위한 수란우 관리에 대한 교육실시하였다. 즉, 수태율 향상을 위한 사료첨가제(베타케로틴, 케로플, 비타민, 미네랄등)급여, 발정동기화(자연발정, 호르몬을 이용하는 방법 등)에 대한 발정관찰, 배란확인, 황체형성 등을 확인 후 최종적으로 수란우로 선발 활용함으로써 수태율을 향상시키기 위한 최선의 방법을 찾고자 노력하였다.

가. 수란우의 선정 조건

수란우는 자궁내에 이식된 수정란을 태아까지 발육시키고 정상적으로 분만할 수 있는 번식 한 주기를 정상적으로 유지, 이용할 수 있는 암소, 즉 이식하는 수정란에 대해 유전적인 영향을 주지 않으므로 수태가 잘되고 분만시 문제가 발생하지 않고 생산한 자축포유를 잘하고, 분만사고가 없는 개체등을 고려해야 한다.

따라서 본 연구에서 OPU에 의해 생산된 고능력 수정란 수태율 향상을 위한 수란우 선정은 번식관련 자궁내의 위생 등을 고려해서 경산우보다 미경산우 위주로 선정하여 번식기능이 정상적인 것을 선발하였다.

- ① 정상적인 성주기를 가진 개체
- ② 2회 이상 인공수정을 실시하여 수태하지 않은 소를 사용하지 말 것.

- ③ 강건성 및 내병성이 있고 임신을 장해하는 질병이 없는 개체.
- ④ 포유능력이 높은 개체.
- ⑤ 체격이 큰 개체.
- ⑥ 공태기간이 짧은 개체 등의 기준으로 미경산우를 선정하였다.

이러한 조건에 해당되는 개체는 우군 분리시켜 수태율 향상을 위한 번식관련 미네랄 블록, 비타민, 케로플, 베타케로틴 등의 사료첨가제를 급식사료에 혼합하여 이식개체군에게 이식전 1~2개월 동안 급여토록 낙농가에 교육하였으며, 수란우가 수정란이식으로 수태가 될 수 있는 건강 및 생식기관의 상태가 최대가 될 수 있도록 하였다. 그리고 이러한 과정에서 수정란의 발달단계와 이식할 수란우에 이식시간의 동기화가 진행되는 개체의 생식기관을 점검하였다.

## 2. 생식기관 점검

발정동기화 개체의 초기 기초적인 점검사항은 다음과 같이 난소 및 자궁을 점검하였다.

- ① 발정상태,
- ② 난포형성, 배란시간 및 위치,
- ③ 난소의 탄력정도,
- ④ 점액등의 질 분비물 상태,
- ⑤ 자궁 및 자궁각의 상태,
- ⑥ 황체형성, 탄력 및 발달 상태와 건강상태

등을 고려해서 최종적으로 수란우로 선발 활용함으로써 수태율을 향상시키기 위한 최선의 방법을 찾고자 하였다. 또한 이식 전 1~2일전 생식기관의 전반적인 점검에서 황체형성의 미 발달 또는 이식에 부족한 사항이거나, 난소 및 자궁의 상태가 건강하지 못하는 등의 전반적인 생식기관을 점검하여 이식 여부를 판단하였다. 이식 불가능한 개체는 수정란 공급을 중단하고, 생산된 수정란은 동결 보존하는 방법으로 수정란을 비축 및 그 활용도를 높였다. 이러한 방법은 최소의 수정란으로 최대의 수태율이 향상될 수 있는 이식체계가 구축될 것으로 판단하였고 또한 수란우의 번식기관(난소, 황체, 자궁 등)의 상태를 사전에 충분한 점검으로 수태 가능한 개체만을 선발하여 이식에 활용하고자 노력 하였다.

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



그림 8. 수란우 점검 모습.

**표 13. 발정동기화에 의한 대리모 선발을**

처리 방법	두수	비고
처리두수	100	
배란확인 두수	90	발정발현 2일째 확인
황체형성 확인 두수	83	발정발현 6일째 확인
황체형성 부적합 두수	7	
이식 가능 두수	80	발정발현 7일째 이식함

**○ 발정동기화 및 자연발정우 등을 이용한 수정란이식 후 수태율 비교분석**

OPU유래 체내수정란의 생산 일정이 매주 4회씩 화, 수, 금, 토요일에 공급이 확정됨으로써 수정란 공급일정과 동일시되는 개체는 자연발정우를 활용하고 그 외의 개체는 일률적으로 발정동기화를 유도하여 수란우를 확보하는 것으로 결정되었다. 그리하여 본 연구 사업에 활용된 발정동기화방법으로 동기화를 유도하여 수란우를 확보하여 이식에 활용하였다. OPU유래 체내수정란의 생산기술은 OPU유래 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 PGF<sub>2α</sub> + 300 ug/ml GnRH를 처리하여 발정동기화를 유도하였다.

**○ 1차년도 수정란 이식현황**

젖소 OPU 유래 수정란을 이식을 한 두수와 임신두수는 다음과 같다.  
 총 80두를 이식하였고 수정란 이식 후 2개월 후 직장검사를 통해 임신감정을 시도하였고, 총 38두를 임신 감정하여 수태율은 47.5%였다.

**표 14. 젖소 OPU 유래 수정란 이식에 의한 수태율**

이식두수	임신두수 (%)	비고
80	38 (47.5)	수정란 이식 후 2개월차에 임신감정 실시



### 3. 2차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
한우와 젃소에서 OPU 기법을 이용한 난자의 생산을 비교	OPU 유래 난자를 생산 시 한우와 젃소에서 수정란의 체란율과 난자의 등급을 통하여 비교하여 난자의 생산효율을 증대시키고 최종적으로 수정란 생산율을 향상시키기 위하여 실시	한우와 젃소의 Grade IV에서 평균 $0.3 \pm 0.1$ 개와 $0.9 \pm 0.1$ 개로 젃소가 유의적으로 높게 나타나는 것은 상대적으로 Grade I (평균 $3.0 \pm 0.15$ 개 및 평균 $1.8 \pm 0.14$ 개), Grade II (평균 $2.9 \pm 0.20$ 개 및 평균 $2.2 \pm 0.20$ 개), Graded I+II (평균 $5.9 \pm 0.28$ 개 및 평균 $4.1 \pm 0.27$ 개)에서 한우가 젃소에 비해 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 높게 나타났다. 또한 한우 및 젃소에서 주 2회 체란에 의한 Grade I+II 등급의 평균수량이 높은 것으로 나타났다.
성감별 정자의 활용을 위하여 생사염색을 통한 생존율을 조사	성감별 정자를 이용한 수정란 생산에 앞서 성감별 정자의 생사 염색을 함. 성감별 정자 염색을 일반 정자와 비교하여 체외수정 및 ICSI를 이용한 성감별 수정란 생산에 활용 여부를 검사	성감별 정액인 SS 315의 정자 생존율은 37.50% 이었으며 일반 동결정액인 NS 650의 정자 생존율은 39.10% 이었다. 이는 전년도 연구결과와 같이 일반정액에서 정자수가 많았으나 정자의 생존율은 동결정액과 성감별 정액에서 차이를 보이지 않았다.
성감별 정자의 체외수정을 통한 수정란 생산 시스템 구축을 위한 배양체계 연구	성감별 정자의 체외수정을 통하여 수정란 생산효율을 극대화시키고자 실시. 현재까지 실시되고 있는 수정란 생산 방법 중 가장 효율적이고 생산 효율이 높은 체외수정 방법에 성감별 정자를 이용하고자 실시	성감별 정자의 수는 전년도 연구결과와 같이 일반정액에 비하여 낮음으로 한우와 젃소 성감별 정액을 비교하여 운동성을 확인하다. 한우와 젃소 정액의 농도는 각각 1450만, 3150만으로 젃소 정액의 농도가 높았으며 두 정액 모두 운동성은 일반정액에 현저하게 떨어지는 것을 확인되어 pecoll처리를 하여 운동성과 수정란 생산율 향상을 높이려 하였으나, 운동성은 한우와 젃소 정액 모두 높아진 것으로 확인되었으나 수정란의 생산율은 모두 저조한 것으로 확인되었다.
ICSI 기술을 이용한 성감별 수정란 생산 효율의 극대화 연구	ICSI 기술을 이용하여 성감별 수정란의 생산효율을 극대화 시키고 수정란 생산의 효율성을 위하여	ICSI를 통한 일반정액과 성감별정액의 수정란 생산율은 각각 42.80%와 42.70%로 차이가 없었으며 세포 수에서도 차

	<p>실시, 차후 성감별 수정란 생산에 이용하고자 함</p>	<p>이가 없었다. 그러나 세포사의 비율은 성감별정액이 높았으며 이 결과로 볼 때 체외 수정에서의 수정란 생산율에 비하여 수정란 생산의 효율성이 극대화되는 것을 확인되었다.</p>
<p>고능력 씨수소 정액의 선정</p>	<p>젖소개량을 위해서는 유전적으로 우수한 유전자원이 공시되어야 하며, 씨수소 정액의 선정은 매우 중요한 수단으로 씨수소의 유전능력 평가 자료를 근거한 선발과 각각의 형질별 우수성을 고려한 유량, 유지방, 유단백, 체형 등의 예상유전전달능력이 탁월해야 함.</p>	<p>1차년도는 3두(한국형 2두, 캐나다형 1두)를 공시하여 성감별된 신선 및 동결정액 정상검사 등으로 성감별 정액을 생산할 수 있는 체계를 정립했고, 2차년도는 고능력 성감별정액 생산을 위한 씨수소의 유량, 유지방, 유단백, 체형 유전능력을 고려한 우수 씨수소중 성감별정액 생산이 용이한 개체간의 특성과 차이를 고려하여 최상의 씨수소를 확보하는데 있으며. 2차년도는 4두(미국형 3두, 캐나다형 1두)를 공시하여 최상의 성감별정액 생산과 성감별 OPU 수정란 생산이 가능하도록 선정하였음. 또한 매년 보유 씨수소의 능력을 비교 분석하여 최상의 씨수소를 선정하여 성감별 동결정액 생산에 공시할 계획임</p>
<p>성감별 동결정액 제조기술 정립을 위한 인공수정 번식 효율성 검토</p>	<p>공시된 성감별동결정액 성상이 우수하였으나 성감별정액의 번식효율성을 검증해야만 OPU유래 수정란 생산 및 송아지 생산의 가능성을 높일 수 있으므로, 공시 성감별 동결정액을 이용한 인공수정으로 수태율을 분석하고 관련 요인별로 분석하여 효율을 높이고자 함</p>	<p>1차년도 공시된 성감별 동결정액을 이용한 인공수정 현장 실증실험을 지역별로 분산하여 6명의 수정사를 통해서 수행하였으며 성감별 동결정액의 수태율 향상을 고려한 스트로 내 충전 정자 수, 인공수정 부위에 따른 수태율을 조사함으로써, 성감별 동결정액이 번식에 공여가 실질적으로 가능한지 타당성을 검토하고자 수행하였음</p>
<p>고능력 씨수소의 성감별 동결정액 생산</p>	<p>OPU 유래 성감별수정란 생산을 위해서 고능력 씨수소의 성감별 동결정액의 생산 및 공여는 매우 중요하므로 보유 고능력 씨수소 유전능력을 분석하여 공시하였으며 성감별 동결정액을 생산함</p>	<p>보유 씨수소 중 유전능력 및 형질별 예상유전전달능력이 우수한 씨수소를 성감별 정액을 생산하기 위하여 공여하고 성감별 동결정액 성상을 조사하여 우수한 씨수소 성감별 동결정액을 생산하여 젖소개량에 활용할 수 있도록 추진함.</p>
<p>세포분리기에 의한 정자 성분리 효율의 최적화 설정</p>	<p>최적 염색조건에서 만들어진 정액 샘플들은 세포분리기의 설정에 따라 그 분리속도 및 분리된 정자의 순도에 큰 영향을 받는다. 즉, 분리구간을 작게 설정하고 초당 분석수를 낮추면 더욱 고순도의 정자를 분리할 수 있으나 이는 분리효율이 저하되기에 적절한 수준에</p>	<p>각 개체별 종모우 정액의 최적 염색조건에서 만들어진 샘플을 초당 분석수를 20000, 30000, 40000의 속도에서 각각 분리구간을 20, 25, 30, 35, 40%로 설정한 후 최적의 분리속도와 순도간의 상관관계를 규명하여 최적 분리효율에 대한 시스템 설정을 하였다.</p>

	<p>서 설정이 되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 정자의 성분리 효율을 최적화 할 수 있는 세포분리기 시스템을 확립하고자 하였다.</p>	
<p>성감별수정란 이식 후 수태율 향상방안 모색</p>	<p>수태율 향상을 위하여 가장 많이 사용되고 있는 비타민 E를 급여하였다. 사용되어진 비타민 E 사료첨가제는 케로폴을 사용하였으며 농가를 선정 투여군과 비투여군으로 분류하여 수정란 이식을 실시하였다.</p>	<p>급여 방법은 농가를 선정하여 2 처리군으로 분류하여 1두당 100 mg/일을 급여한 후 수정란 이식 후 수태율을 조사하였으며, 임신율을 투여군 53.3%, 비투여군 50%로 유의적인 차이를 보이지 않았다.</p>

#### 4. 2차년도 세부연구수행 결과

##### [제 1세부과제]

##### ○ 한우와 젃소에서 OPU 기법을 이용한 난자의 생산을 비교

본 연구에서는 한우와 젃소에서 수정란의 채란율과 난자의 등급을 통하여 비교 하였다. 한우 및 젃소의 두 품종에서 관찰된 난포의 흡입은 3 ~ 4일 간격으로 주 2회 채란에서 흡입된 난포 및 난자의 회수율은 표 1과 같다.

표 1. 한우와 젃소의 OPU 채란에 따른 난자회수율

Breeds	No. of donors	No. of sessions	Total No. of follicle aspirated (Mean ± SE) <sup>†</sup>	No. of oocytes (Mean ± SE) <sup>†</sup>	% of oocyted/total follicles aspirated
Hanwoo	6	106	1,099 (10.4 ± 0.42)	800 <sup>a</sup> (7.5 ± 0.38)	72.8 <sup>a</sup>
Holstein	6	114	1,303 (11.4 ± 0.41)	698 <sup>b</sup> (6.1 ± 0.37)	53.6 <sup>b</sup>

한우 및 젃소 공란우에서 각각 6두로부터 매주 2회 반복적으로 한우는 총 106회 반복 채란으로 monitor image에 관찰된 가시난포 1,099개(회당 평균 10.4 ± 0.42)를 흡입하여 총 800개(회당 평균 7.5 ± 0.38)의 난포란이 회수되어 72.8%의 회수율을 보였으며, 젃소에서는 총 114회 채란으로 1,303개(회당 평균 11.4 ± 0.41)의 가시난포를 관찰 및 흡입으로 총 698개(회당 평균 6.1 ± 0.37)의 난포란이 회수되어 53.6%의 채란 효율로 한우에서 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 높게 나타났다.

이는 공여된 공란우간 및 품종간에 육성된 각각의 사육지역 및 환경 등에 따라 난포의 발생 수량에 영향 미치는 것으로 판단된다. 또한 주사침으로 난포란을 흡입 시 puncture로 발생된 상처조직의 회복으로 난자가 없는 공난포의 발생, 채란 시 흡입기구(초음파 monitor 화질, 진공압력, needle 구경의 크기 등), 시술자의 채란 방식(난포의 천자 각도, 주사침의 각도) 등에 따라 회수율에 차이가 발생하는 것으로 사료된다.

한우 및 젃소에서 회수된 난자의 등급은 Table 2와 같다.

표 2. 한우와 젃소에서 채란된 난자의 등급

Breeds	No. of session	Total no. of oocytes collected (Mean±SE) <sup>†</sup>	Grade of oocytes collected (Mean ± SE)				
			G I	G II	G III	G IV	G I + II
Hanwoo	106	800 <sup>a</sup> (7.5 ± 0.38)	314 <sup>a</sup> (3.0±0.15)	308 <sup>a</sup> (2.9±0.20)	144 (1.4±0.15)	35 <sup>b</sup> (0.3±0.11)	622 <sup>a</sup> (5.9±0.28)
Holstein	114	698 <sup>b</sup> (6.1 ± 0.37)	210 <sup>b</sup> (1.8±0.14)	254 <sup>b</sup> (2.2±0.20)	134 (1.2±0.15)	100 <sup>a</sup> (0.9±0.11)	464 <sup>b</sup> (4.1±0.27)

한우에서 총 106회 채란으로 난자의 등급은 Grade III에서 총 144개(평균  $1.4 \pm 0.15$ 개), 젖소 114회 채란으로 134개(평균  $1.2 \pm 0.15$ 개)의 난자를 회수하여 유의적인 차이가 없었으나, 한우와 젖소의 Grade IV에서 평균  $0.3 \pm 0.1$ 개와  $0.9 \pm 0.1$ 개로 젖소가 유의적으로 높게 나타나는 것은 상대적으로 Grade I (평균  $3.0 \pm 0.15$ 개 및 평균  $1.8 \pm 0.14$ 개), Grade II(평균  $2.9 \pm 0.20$ 개 및 평균  $2.2 \pm 0.20$ 개), Graded I+ II(평균  $5.9 \pm 0.28$ 개 및 평균  $4.1 \pm 0.27$ 개)에서 한우가 젖소에 비해 유의적( $p < 0.05$ )으로 높게 나타났다. 또한 한우 및 젖소에서 주 2회 채란에 의한 Grade I+ II등급의 평균수량이 높은 것으로 나타났다. 따라서 차년도에는 한우와 젖소에서 난자 생산율 및 난자의 등급의 차이를 초래한 요인을 분석하여 젖소에서 생산율을 높일 수 있는 방법에 대하여 연구를 진행 할 것이다.

○ 성감별 정자의 활용을 위하여 생사염색을 통한 생존율을 조사

본 연구실에서는 성감별 정자를 이용한 수정란 생산에 앞서 성감별 정자의 생사 염색을 하였다. 일반 정액을 이용하여 성감별 정자를 생산하는 과정에서 정자는 DNA 손상, 고압, 레이저 빛 등과 같이 많은 위험에 노출되며 이는 전년도 결과와 같이 정액의 수에 많은 차이를 보인다. 따라서 본 연구에서는 일반정자와 성감별 정자의 생사염색을 통하여 정자의 생존율을 조사하였다. 결과는 표 3에 나타내었다.

표 3. 성 감별 정액의 종류에 따른 생존율

Sperm	Live	Dead	Total	Live rate (%)
SS 316	141	235	376	37.50
NS 650	216	336	552	39.10

성감별 정액인 SS 315의 정자 생존율은 37.50% 이었으며 일반 동결정액인 NS 650의 정자 생존율은 39.10% 이었다. 이는 전년도 연구결과와 같이 일반정액에서 정자수가 많았으나 정자의 생존율은 동결정액과 성감별 정액에서 차이를 보이지 않았다.

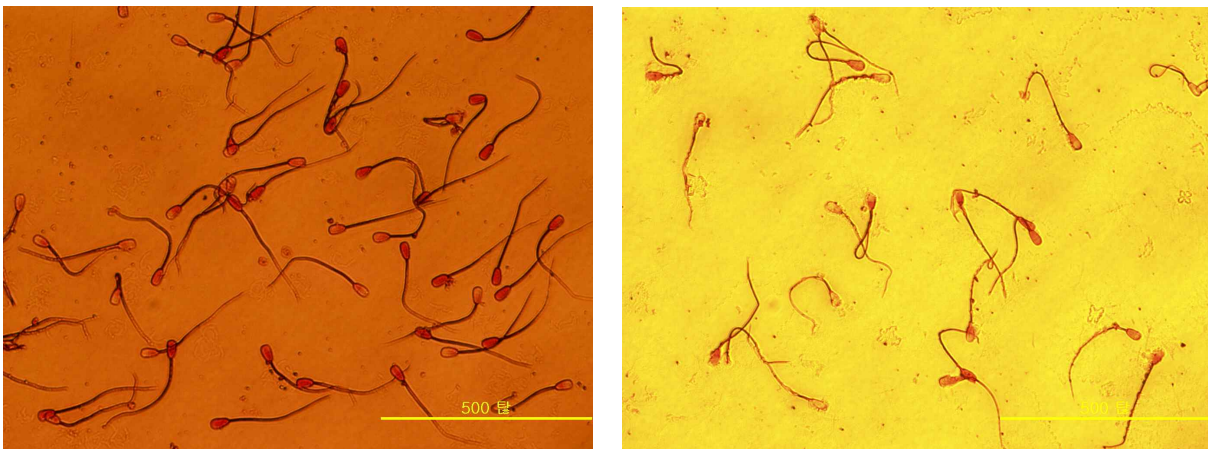


그림 1. 정자의 생존율 확인을 위한 정자의 생사염색(왼쪽 NS650, 오른쪽 SS315).

**○ 성감별 정자의 체외수정을 통한 수정란 생산 시스템 구축을 위한 배양체계 연구**

일반적인 수정란을 생산하는 과정에서 가장 손쉬운 방법은 체외수정을 통하여 수정란을 생산하는 방법이 대중화 되었다. 본 연구실에서 수행하고 있는 OPU 기법을 이용한 수정란의 생산에도 체외수정을 통하여 생산되고 있으며 성 감별 정자 역시 정자의 생존율과 운동성이 보장된다면 편하게 대량생산 할 수 있는 방법이다. 이를 위하여 성 감별 정액을 이용하여 체외수정을 실시하였다. 체외수정에 사용된 성감별 정액은 표 4과 같다.

표 4. 성감별 정액의 농도와 운동성

정액번호	정액정보	농도 (No./ml)	Motility (%)
# 316	한우	1450만	15
# 1009	젓소	3150만	17

성감별 정자의 수는 전년도 연구결과와 같이 일반정액에 비하여 낮음으로 한우와 젓소 성 감별 정액을 비교하여 운동성을 확인하다. 한우와 젓소 정액의 농도는 각각 1450만, 3150만으로 젓소 정액의 농도가 높았으며 두 정액 모두 운동성은 일반정액에 현저하게 떨어지는 것을 확인하였다. 이에 정액의 운동성을 높이기 위하여 percoll 처리를 실시하여 체외수정에 사용하였다. 그 결과는 표 5와 같다.

표 5. Percoll 처리를 한 성감별 정액의 분할율과 수정란 생산율

정액번호	Motility	IVM	Cleavage (%)	Total BL (%)
# 316	70%	180	54 (13)	2 (1)
# 1009	30%	180	48 (27)	2 (1)

Percoll 처리를 한 후 운동성은 한우와 젓소 정액 모두 높아진 것으로 확인되었으나 수정란의 생산율은 모두 저조한 것으로 확인되었으며, 이는 정자의 운동성 및 성 감별 과정에서 정자에 손상을 초래한 것으로 사료된다.

**○ ICSI 기술을 이용한 성감별 수정란 생산 효율의 극대화 연구**

ICSI 기술은 난자에 정자를 직접 주입하여 수정하는 방법으로 정자의 운동성과 관계없이 사용할 수 있는 기술이다. 현재까지의 ICSI 기술은 고가의 장비를 이용해야 하고 고도로 숙련된 기술자의 기술이 필요하여 체외수정 방법이 많이 이용되어져 왔으나, 성감별 정액을 이용하여 수정란을 생산할 때 반드시 필요한 기술이다. 본 연구에서는 이를 통하여 성감별 수정란 생산의 효율을 극대화 시키고자 실시하였다. 그 결과는 표 6과 같다.

표 6. 일반정액과 성감별 정액의 수정란 생산율과 apoptosis율

정액구분	Blastocyst rate (%)	No. total cell	% of apoptosis
일반정액	42.80	122.6 ± 25.7	3.1 ± 2.7
성감별정액	42.70	122.8 ± 35.2	4.8 ± 2.4

ICSI를 통한 일반정액과 성감별정액의 수정란 생산율은 각각 42.80%와 42.70%로 차이가 없었으며 세포 수에서도 차이가 없었다. 그러나 세포사의 비율은 성감별정액이 높았으며 이 결과로 볼 때 체외 수정에서의 수정란 생산율에 비하여 수정란 생산의 효율성이 극대화 되는 것을 확인할 수 있었다. 차년도 연구에서는 ICSI를 이용한 수정란을 PCR을 이용하여 수정란의 성관별 연구를 진행할 예정이다.

[제 1협동과제]

○ 고능력 씨수소 정액의 선정

본 연구에서 정액은 농협 젖소개량사업소에서 사육되고 있는 씨수소중에서 성감별 정액의 성장검사 및 인공수정 실증실험 수행을 위하여 3두(한국형 2두, 캐나다형 1두)가 공시되었으며, 성감별 동결정액을 생산하여 OPU 유래 체외수정란 생산을 하기 위하여 선정된 씨수소 정액은 4두(캐나다형 1두, 미국형 3두)로 H-315, H-316, H-319, H-320번이며 표 1과 같다.

표 1. 성감별 정액 생산을 위하여 공시된 씨수소의 유전능력 및 내역

구 분	종모우명 (정액번호)	종합지수	유전전달능력					중점 개량형질
			유 량	유지방	유단백	체 형	유 방	
한국형	베타비아 (H-1007)	(KTPI) 850	519	6	11	-0.18	0.34	유량, 유단백
	포비든 (H-1009)	(KTPI) 1,075	46	10	5	0.68	2.6	지방, 체형, 유방
캐나다형	리틀락 (H-304)	(LPI) 861	1,384	4	43	1	3	유량, 유단백
	도 립 (H-315)	(LPI) 850	1,345	49	29	7	6	유량, 지방, 체형
미국형	페노쉬 (H-316)	(TPI) 1,724	169	0	10	2.16	2.07	체형, 유방
	디세오 (H-319)	(TPI) 1,950	539	17	15	1.87	2.06	유량, 유방
	에너지 (H-320)	(TPI) 1,961	444	24	14	2.23	1.77	유지방, 체형

참고로 H-1007, H-1009, H-304번 씨수소 정액은 1차년도 성감별 신선 및 동결정액의 성상 검사 및 2차년도 성감별정액을 이용한 인공수정 실증실험에 공시된 정액임을 밝히며 성감별 동결정액을 생산하기 위한 씨수소 선정은 젓소개량사업소 보유 씨수소중 유전능력이 우수하며 형질별 예상유전전달능력이 탁월한 개체중에서 성감별 동결정액 성상에 영향이 없는 씨수소를 최종적으로 선정하여 실험에 공시될 수 있도록 준비하였다.

최종적으로 4두가 선정되어 성감별 동결정액을 생산하였는데, 유량형질이 우수한 H-315, H-319번, 유지방형질이 우수한 H-315, H-320번, 체형형질이 우수한 H-316, H-320번, 유방형질이 우수한 H-316, H-319번 정액이 탁월하여 공시할 수 있었다.

○ 성감별 정액의 번식 효율성 검토를 위한 인공수정 실증실험

성감별 정액의 번식 효율성을 검토하기 위하여 실증실험으로 인공수정을 '11년 5월부터 10월말까지 전국 6개 지역을 선정하고 6명의 수정사를 동원하여 실시하였으며, 임신감정은 '12년 2월 추진한 바 그 결과는 표 2와 같다.

표 2. 성감별 정액을 이용한 인공수정 결과

구 분	A	B	C	D	E	F	계
수정두수	80두	80두	62두	80두	80두	80두	462두
임신두수	25두	35두	9두	47두	39두	21두	176두
수태율	31.3%	43.8%	14.5%	58.8%	48.8%	26.3%	38.1%
순 위	(4)	(3)	(6)	(1)	(2)	(5)	

총 462두 인공수정을 하였고, 임신두수는 176두로 수태율이 38.1%였으며 지역 및 인공수정사를 고려한 수태율 분포는 14.5%-58.8% 였다. 수태율 분석 결과 수정사간 수태율이 유의적으로 차이가 있었는데 특정 수태율 저조지역의 인공수정은 공시 육성우 집단이 자가인공수정 및 수정란이식이 만연하던 지역으로 추후 수정사에게 성감별 정액의 인공수정을 의뢰한 상황이 많았던 관계로 수태율이 낮았던 결과를 확인할 수 있었다. 따라서 수태율이 극히 저조하였던 지역 및 수정사인 C, F 지역을 제외하고 수태율을 분석하면 45.6%(146두/320두) 수준으로 타국의 성감별정액 인공수정 수태율과 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 인공수정을 실시하면서 보다 효과적인 방법을 찾고자 요인별로 수태율을 분석한 결과는 표 3과 같다.



표 3. 성감별 정액의 요인별 인공수정 수태율 분석

구 분	씨수소		충진정자수		수정부위별		계
	H-1009	H-304	400만	200만	자궁각	자궁체	
수정두수	230두	232두	232두	230두	249두	213두	462두
임신두수	98두	80두	97두	79두	102두	74두	176두
수태율	42.6%	34.5%	41.8%	34.3%	41.0%	34.7%	38.1%

요인별 분석은 크게 3가지로 씨수소별, 스트로내 충진정자수, 인공수정 주입부위에 따른 수태율 차이를 살펴보았는데 유의적인 차이는 인정되지 않았으나, 씨수소간에 수태율이 다소 차이가 있었고, 스트로내 충진정자수는 400만이, 수정부위는 자궁각 주입에서 다소 좋은 결과를 얻어 공히 40% 이상의 수태율을 나타냈다. 따라서 성감별 정액을 이용한 번식 수행의 모든 기술을 활용하는데 큰 문제가 없다는 판단과 특히 성감별 정액의 인공수정 산업에 공급도 가능하다고 결론을 얻었다.

차기년도에는 계속적인 연구 분석으로 성감별 정액의 성판정 정확도를 조사하기 위하여 성감별 정액으로 생산된 수정란을 활용한 성판정 정확도 측정과 인공수정 실증실험으로 분만된 송아지들의 성을 조사하여 성판정 정확도를 조사할 계획이다.

○ 고능력 씨수소의 성감별 동결정액 생산

2차년도에는 성감별 동결정액을 활용한 OPU 유래 수정란 생산을 위하여 고능력 씨수소를 선정하였고, 대상 고능력 씨수소를 활용한 성감별 동결정액 생산 결과는 표 4와 같다.

표 4. 고능력 씨수소 성감별 동결정액 성상 및 생산 결과

구 분	정액 성상		성감별정액 생산			비 고
	활 력	기형율	생산기간	충진정자수	총생산량	
HS-315	53.3%	3.5%	‘11.07.08 -‘11.12.30	400만	2,201개	정액성상 기준 활력 40%이상 기형 15%이하
HS-316	60.0%	9.5%	‘11.07.07 -‘12.04.04	400만	4,807개	
HS-319	66.1%	4.9%	‘11.12.01 -‘12.04.12	400만	4,261개	총생산량 16,053개 생산
HS-320	68.3%	4.6%	‘11.12.02 -‘12.04.13	400만	4,784개	

성감별 동결정액을 생산하기 위한 고능력 씨수소는 4두였으며 생산된 성감별 동결정액의 성상은 정액 공급 기준이상의 매우 우수한 상태였고, OPU 유래 체외수정란 생산을 위하여 공시될 수 있는 성감별정액 생산 체계는 확립되었다고 판단됩니다. 또한 1차적으로 젖소개량을 위한 성감별정액의 활용을 위한 인공수정 사업에도 충분히 산업적 접근이 가능하다는 결론을 얻었다.

[ 제 2협동과제 ]

○ 성분리효율의 최적화를 위한 세포분리기 설정

종모우 개체별 최적의 조건에서 염색된 정자는 MoFlo XDP를 이용하여 분석속도(EPS)를 각각 초당 20000, 30000, 40000으로 설정 후 분석구간(gate)을 20, 25, 30, 35, 40%로 지정하여 암정자를 분리하고 20%의 난황이 함유된 3 ml의 Tris WS 300 (XY005®)에 12 ml을 수집하였다. 암정자의 수집에는 50 ml 튜브를 이용하였으며, 수집된 정자는 5°C의 냉장실에서 90분간 냉장 후 15 ml의 CRE12G (XY004®)를 넣고 900 x g의 속도로 20분간 원심분리 하였다. 그 후 상층액은 제거하고 남은 정자 펠렛을 균일하게 섞은 후, 정자 200 ul에 10 ul의 형광염색제를 더 넣고 34°C의 항온수조에서 20분간 염색 후 MoFlo XDP 세포분리기를 이용하여 순도를 검사하였다.

표1. 초당 정자분석수와 분리구간의 설정에 따른 성분리 속도 및 순도

초당 분석수 (EPS)	분리구간 (%)	분리속도	폐기속도	순도 (%)
20000	20	1.7K	618	81
	25	1.9K	619	91
	30	2.3K	752	93
	35	3.1K	920	87
	40	3.3K	888	81
30000	20	2.0K	1.2K	85
	25	2.3K	1.2K	83
	30	2.9K	1.4K	87
	35	3.7K	1.6K	87
	40	4.3K	1.9K	84
40000	20	2.4K	1.8K	81
	25	2.6K	2.1K	88
	30	3.3K	2.2K	88
	35	4.2K	2.8K	83
	40	4.7K	2.9K	78

세포분리기에 의한 초당 정자 분석수가 증가할수록 분리 전 구간에 있어서 분리속도와 폐

기속도가 증가하였으나 분리된 정자의 순도는 분리구간 30% 이후에는 오히려 감소하였다. 초당 분석수 20,000에서는 분리구간을 30%, 30,000에서는 35%, 40,000에서는 30%가 가장 높은 순도를 유지 하였으며, 전체적으로는 분석수 30,000에서 분리구간을 35%로 설정하는 것이 분리속도 및 효율을 최적화 할 수 있는 설정으로 판단되었다. 그러나 이러한 최적 조건은 전년도의 연구에서 나타난 바와 같이 종모우의 정액 질에 의해 영향을 받기에 각 종모우 개체별 정액에 따른 최적의 세포분리기 설정이 필요하다.

**[제 3협동과제]**

○ 성감별수정란 이식 후 수태율 향상방안 모색

OPU에 의해 생산된 수정란 이식을 성공하기 위해서 생존성이 높은 정상적인 발달능력을 가진 수정란이 자궁 내에서 정상적인 착상을 위해서는 대리모의 상태, 즉 자궁의 상태 즉 최상의 수란우를 선정하여 수태율 향상을 높일 수 있다. 이를 위하여 사료첨가제(베타케로틴, 케로폴, 비타민, 미네랄 등)급여에 중점적으로 연구를 시행하였다. 이를 위하여 수태율 향상을 위하여 가장 많이 사용되고 있는 비타민 E를 급여하였다. 사용되어진 비타민 E 사료첨가제는 케로폴을 사용하였으며 정보는 다음과 같다.

**▶ 케로폴**

성분·함량 (1kg, L중)	효능 및 특징점	권장사항		포장단위
Beta-carotene (별규) 2,000 mg Vit. A, 350,000 IU Tocopherol acetate, 1,000 IU Sodium Selenite (별규, Se으로서)·15 mg Zinc methionine (별규, Zn으로서) 2,000 mg	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 로슈사의 원방처방된 5종 복합 수태율 향상제로 번식장애에 확실한 투약효과가 있는 비호르몬제</li> <li>• 젖소의 수태율 향상, 번식능력 향상, 번식장애(난소낭종, 난소기능부전, 난소위축)의 개선, 유방염 예방, 체세포수 감소, 후산정체 및 자궁내막염 예방</li> </ul>	목적	용법·용량	10 kg (1 Kg × 10 EA) 25 kg 통포
		수정률, 수태율향상	인공수정 전후 각 3주 동안 두당 1일 100 g씩 급여	
		번식장애 예방	분만 후-임신훈정까지 두당 1일 100 g 경구투여	
		후산정체, 자궁내막염 예방	분만 2주전-분만 시 까지 두당 1일 100 g 경구투여	

급여 방법은 농가를 선정하여 2 처리군으로 분류하여 1두당 100 mg/day을 급여한 후 수정란 이식 후 수태율을 조사하였다. 그 결과는 표 1과 같다.

표 1. 비타민 E 사료첨가제 투여에 따른 임신여부

농가	이식두수	사료첨가제 투여 여부	임신여부	임신율 (%)
A농가	30	투여	16두	53.3
	10	비투여	5두	50

A농가에 수정란을 이식 위하여 대리모의 상태가 최상에 달하기까지 비타민 E 투여군은 수정란 이식 2달 전부터 급여하였다. 수정란 이식은 대리모의 자궁상태, 황체 여부 등을 확인하여 최종적으로 30두를 선정, 투여군 30두, 비투여군 10두에 이식을 실시하였다. 이식 후 수태율에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 임신 후 임신유지 시 많은 도움이 될 것으로 사료되며 차후 생산되는 산자에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

○ 2차년도 수정란 이식현황

젖소 OPU 유래 수정란을 이식을 한 두수와 임신두수는 다음과 같다. 11농가에 총 100개의 수정란을 이식하였고 이식 내용은 전반기에는 한우 수정란 43개와 후반기 젖소 수정란 57개를 각각 이식하였다. 현재까지의 연구결과에 의하면 수정란 이식 시 한우에 비하여 젖소의 수태율이 떨어짐으로 이것이 수정란의 Quality에 의한 차이인지 이식 방법에 문제인지 실시하였으며 임신 감정 및 수태율을 확인할 예정이다.

### 5. 3차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
젯소 공란우의 수정란 생산을 향상방안 연구	성감별 정자를 이용한 수정란 생산 효율을 높이고자 체외수정(IVF)용 정액을 이용하여 수정란 생산율을 확인하고 적용 하고자 함	현재 ICSI 기술은 성감별 수정란을 생산하는데 가장 신뢰도가 높은 기술이나 산업화를 위해서는 더욱 간단하고 생산 효율이 높은 방법에 대한 연구가 진행되어야 한다. 높은 선발강도를 통해 선발된 공란우 4두에서 채란된 난자를 IVF용 성감별 정액을 이용하여 수정란을 생산한 결과 22.5%의 생산율을 확인하였으며 이는 수정란 생산율에서 ICSI 기술을 이용한 수정란 생산(19.2%)과 차이가 없었다. 그러나 생산의 효율성, 간편성이 높은 것으로 판단되며, 제 1극체가 확인되어야 사용가능한 ICSI 기술보다 체외수정 기술을 사용하게 되면 공시난자의 수가 많아지므로 산업화에는 IVF용 성감별 정액을 사용하는 기술이 적합한 것으로 사료된다.
성감별 정자의 Acrosome 분석 및 생존율 향상방안 연구	성감별 정자의 수정란 생산율을 높이고자 Acrosome 손상도를 분석하고 생존율을 높이는 방안을 모색하고자 함	성감별 정자는 인위적인 분류로 인하여 일반 정액보다 수정란 생산비율이 낮은데 이러한 차이를 알아보기 위하여 Acrosome 손상도를 확인하고자 하였다. 결과는 일반정액과 성감별 정액의 손상되지 않은 정자의 비율이 81.5%, 76.8%로 손상도에 대한 차이를 보이지 않았다.
ICSI 기술을 이용한 수정란 생산	현재까지 성감별 수정란을 생산하는데 가장 신뢰할 수 있는 ICSI 기술을 이용하여 수정란의 생산 효율성을 확인하고자 함	ICSI를 통한 성감별 수정란 생산을 위하여 도축장유래 난자 중 제 1극체가 확인된 203개의 난자를 이용하여 수정란 생산을 실시하였다. 난자의 분할율은 73.3%(149개)였으며 생산된 수정란은 39개(19.2%)의 결과를 확인하였다.
성감별 동결정액 제조기술 정립을 위한 인공수정 번식 효율성 검토	공시 성감별 동결정액을 이용한 인공수정으로 수태율을 분석 후 임신한 개체를 지속적인 모니터링을 통하여 분만유무를 확인 산자의 성별을 조사하여 성감별 동결정액의 인공수정에서의 성분리 정확도를 확인하고자 함	2차년도의 성감별 정액의 인공수정을 통한 현장실증실험을 위해 지역별로 분산하여 6명의 수정사를 통해 수태율을 확인한바 있으며, 이와 연계하여 임신된 개체의 정상 분만 및 유·사산 등을 조사하고 산자의 성별을 조사, 성감별 정액의 인공수정에 의한 성분리 정확도를 검토함
성감별정자의 인공수정 성공률을 높이기위한 정자생	성감별정자의 동결융해 후 생존성	정액을 원정액과 형광염색제로 염색된

<p>존을 향상기술 개발</p>	<p>은 원정액내 정자의 생존성을 유지하는 환경에 의해 큰 영향을 받는다. catalase는 정액내 H2O2발생을 감소시켜 정자의 생존성과 활력을 높이는데 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서는 정자에 대한 catalase의 효과를 확인하고 적정농도를 확립하고자 하였다.</p>	<p>성 분리 정액 2그룹으로 분류 후, catch fluid에 catalase를 0, 0.37, 1.1, 3.3 ug/ml의 농도로 처리하여 정액을 동결하였다. 정액 용해 후 각각 30분 및 120분때 정자 활력도를 비교함으로써 catalase 농도와 정자 생존성간의 상관관계를 규명하여 성감별정자의 생존성을 높이고자 하였다.</p>
<p>OPU 유래 수정란 이식 및 수태율 조사</p>	<p>성감별 수정란의 이식 및 임신감정을 통한 수태율 조사</p>	<p>2012년 12월부터 2013년 5월까지 총 95두에 대한 수정란 이식을 실시하였으며 임신감정 대상우 46두에 대한 감정 결과 19두에서 수태가 확인되었다. 수태율은 41.3%의 결과를 확인하였다.</p>

## 6. 3차년도 세부연구수행 결과

### [제 1세부과제]

#### ○ ICSI 기술을 이용한 수정란 생산

본 연구에서는 성감별 수정란을 생산하기 위하여 ICSI 기술을 이용하고자 하였다. 공시난자는 도축장 유래난자 203개를 공시하였으며 H-320(Y)정액을 이용하여 실험을 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

표 1. 성감별 정액을 이용한 ICSI 기술에 의한 수정란 생산

No. of oocyte	No. of cleavage (%)	No. of blastocyst rate (%)
203	149 (73.3)	39 (19.2)

도축장 유래 난자를 24 h 체외성숙(IVM) 실시 후 제 1극체가 확인된 203개의 공시난자에서 149개(73.3%)의 분할율을 확인하였으며 39개(19.2%)의 수정란이 생산되었다. 수정란의 성감별은 정자를 암수 분리 또는 IVF에 의한 생산된 수정란의 할구를 분리하여 염색체 분석을 통한 성비를 구분하였으나, 할구분할에 따른 수정란 생산은 효율적인 측면에서 효과적이지 못하다. 따라서 ICSI 기술은 성감별 정자의 생산효율을 높이는데 현재까지 핵심적인 기술이며 가장 신뢰성이 높은 기술이다. ICSI는 정자를 난자에 직접 주입하는 기술로서 성감별 정액을 이용한 수정란 생산기술에서 보편적으로 많이 쓰이는 기술이며, 이를 이용하여 수정란을 생산을 연구는 핵심적인 기술이다. 그러나 ICSI의 단점은 제 1극체가 확인된 난자만 사용 가능하며 체외성숙 후 제 1극체가 확인되는 비율이 60~70% 이다. 이는 공시난자의 수를 저하시키는 요인이며 일반적인 체외수정(IVF)를 통한 수정란 생산량(공시난자의 수적 차이) 보다 낮으며 이를 보완하기 위해서 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

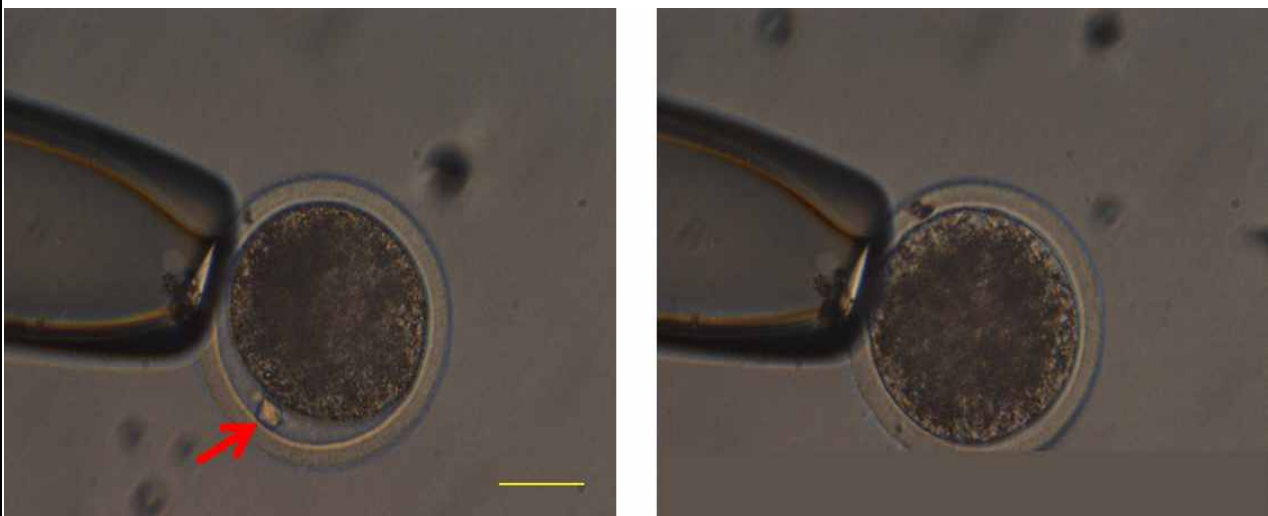


그림 1. 난자의 성숙(IVM) 후 제 1극체가 형성된 난자(좌)와 형성되지 않은 난자(우).

○ 젖소 공란우의 수정란 생산을 향상방안 연구

본 연구실에서는 현재 성감별 젖소수정란 생산의 효율을 위하여 다양한 연구를 실시하였으며, ICSI를 통한 수정란생산을 이용하였다. 그러나 ICSI를 이용한 생산은 제 1극체를 확인 후 핵을 피하여 정자를 삽입 하여야하는 단점이 있다. 현재까지 체외배양으로 제 1극체가 확인 되는 비율은 60~70%이며 이는 체외수정의 기법을 이용한 수정란 생산보다 수정란 생산 개수를 낮아지게 하는 요인이며, 생산 비용과 효율, 숙련된 기술자 등의 제약이 많아 산업화를 위한 생산성이 충족되지 않는다.

따라서 이러한 문제점을 극복하기 위하여 본 연구실에서는 체외수정(IVF) 용 성감별 정액을 제2협동연구팀인 한국색소에서 제조 공급받아서 체외수정 기법을 이용한 체외수정란의 생산성을 높이고자 하였다. 공란우는 총 4두를 선발하여 채란에 활용하였다. 이들의 선발을 위해서 공란우는 고등등록우로서 정상적인 번식능력을 가지고 있으면서 특히 감염성 질병이 없으며 번식기관의 능력에 문제가 없는 개체를 선발 활용하고 있다. 이들의 선정은 실제 이식 후 산자의 생산하였을 때 강건성, 고유량 등을 고려한 공란우를 선발하여 활용함으로써 생산된 송아지를 후보축으로 활용할 수 있도록 종축개량협회의 유우능력 검정자료에 준하여 연간 우유생산량(kg)이 우수한 공란우를 선정하였다. 공란우에서 채취한 난자와 체외수정을 유도할 정액은 선정한 공란우와의 근친도를 1차적으로 고려하였고 2차적으로 유량, 유지율, 단백질, 체형의 유전능력이 모두 우수하며 신뢰도가 높고 근친도가 없는 H-320 정액(그림 1)을 사용하였다.



그림 1. OPU 유래 수정란 생산에 사용된 종모우 정보.



OPU 유래 성감별된 수정란 생산을 위해 선발된 공란우 4두에서 난포의 흡입은 3 ~ 4일 간격으로 주 2회 채란하였으며 흡입된 난포 및 난자의 회수율은 표 2과 같다.

표 2. 개체별 OPU 채란에 따른 난자회수율

Donor	No. of sessions	Total No. of follicle aspirated (Mean ± SE) <sup>†</sup>	No. of oocytes (Mean ± SE) <sup>†</sup>	% of oocytes/total follicles aspirated
4929	50	798 (16.63 ± 3.04)	414 (8.35 ± 3.15)	51.8
9479	50	632 (13.17 ± 4.43)	250 (5.08 ± 2.79)	39.5
8217	34	506 (15.68 ± 2.76)	211 (6.03 ± 2.07)	41.6
9604	22	284 (12.9 ± 2.45)	150 (6.82 ± 2.61)	52.8

각 개체는 매주 2회 반복적으로 채란하였으며 4929와 9604 개체의 경우 가장 높은 난포 대비 난자 생산율(51.8%, 52.8%)이 확인되었다. 이는 공시된 공란우간의 개체 차이로 판단되며 개체에 따라 난자의 회수율에 차이를 보이는 것으로 사료된다.

채란 및 회수된 난자는 30분 이내의 경상대학교 동물발생공학 연구실에서 체외배양을 실시하였으며 체외배양 전 회수된 난자를 등급기준에 따라 분류하였다. 그 결과는 표 3과 같다.

표 3. 개체별 채란된 난자의 등급

Donor	Total no. of oocytes collected (Mean ± SE) <sup>†</sup>	Grade of oocytes collected (Mean ± SE)				
		G I	G II	G III	G IV	G I + II
4929	414 (8.35±3.15)	137 (2.74±1.76)	87 (1.74±1.73)	114 (2.23±1.73)	76 (1.52±1.68)	224 (2.24±1.78)
9479	250 (5.08±2.79)	47 (0.96±1.33)	45 (0.87±0.92)	82 (1.70±1.74)	76 (1.43±1.87)	92 (0.91±1.14)
8217	211 (6.03±2.07)	126 (3.80±1.97)	36 (1.10±1.52)	28 (0.80±0.92)	22 (0.57±0.94)	142 (2.45±2.21)
9604	150 (6.82±2.61)	91 (4.14±2.19)	24 (1.09±0.97)	25 (1.14±0.94)	10 (0.45±0.86)	115 (2.61±2.27)

각각의 등급으로 분류된 난자는 각 개체별로 나누어 체외수정 및 체외배양을 실시하였으며, 생산된 수정란의 결과는 표 4와 같다.

표 4. 각 개체별 및 전체 수정란 생산 현황

Donor	No. of oocytes	Cleavage (%)	Grade of blastocyst (%)			Blastocyst (%)
			Grade A	Grade B	Grade C	
4929	341	79 (23.1)	33	3	13	49 (14.3)
9479	212	88 (41.5)	42	5	12	59 (27.8)
8217	133	63 (47.3)	27	3	10	43 (32.3)
9604	165	82 (49.6)	27	6	7	41 (24.8)
Total	851	312 (36.6)	129	17	42	192 (22.5)

성감별 정액을 이용한 체외수정란 생산은 공시된 851개의 난자에서 192개의 수정란이 생산되었으며 수정란 생산율은 22.5%로 확인되었다. 이러한 결과는 성감별 정액을 이용한 수정란 생산 시 ICSI 기술을 이용한 생산율과 차이를 보이지 않았으며, 본 연구실에서 개발한 체외수정을 통하여 수정란을 생산하는 것이 수정란이식의 산업화와 효율성을 증대할 수 있으며 생산기술의 간소화까지 감안한다면 ICSI 기술을 이용한 수정란 생산보다 IVF용 성감별 정액을 이용하는 편이 더 효율적이라 사료된다.

○ 성감별 정자의 Acrosome 분석 및 생존율 향상방안 연구

성감별 정자는 일반 정자보다 생존율과 활력도가 떨어진다. 이는 생산 효율에 영향을 미치며 이를 극복하고자 정자의 Acrosome 분석을 통하여 정상적인 정자의 비율과 손상도를 분석하였다. Acrosome 손상도 분석결과는 표 5와 같다.

표 5. 침체염색을 통한 acrosome 손상도 분석

Treatment	No. of live and dead sperms counted (total sperm)	% of live sperms
Unsorted sperm	307/70 (377)	81.5
Sorted sperm	243/74 (317)	76.8

Acrosome의 손상도를 확인한 결과 손상을 입지 않은 정자의 비율은 성감별 정자 76.8%, 일반정자 81.5%로 차이가 나지 않는 결과를 확인하였다. 이전의 연구결과에서 두 그룹간의 수정율은 차이를 보이지 않으나 수정란 발달율에서는 성감별 정자를 이용한 그룹의 수정란 생산율이 낮았는데, Acrosome이 아닌 다른 환경적인 요인으로 보이며, 이러한 차이를 밝혀내기 위해서는 다른 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

[제 1협동과제]

○ 성감별 정액의 번식 효율성 검토를 위한 인공수정 실증실험

성감별 정액의 번식 효율성을 검토하기 위하여 실증실험으로 인공수정을 '11년 5월부터 10월말까지 전국 6개 지역을 선정하고 6명의 수정사를 동원하여 실시하였으며, 임신감정은 '12년 2월 추진한 바 그 결과는 표 2와 같다.

표 1. 성감별 정액을 이용한 인공수정 결과

구 분	A	B	C	D	E	F	계
수정두수	80두	80두	62두	80두	80두	80두	462두
임신두수	25두	35두	9두	47두	39두	21두	176두
수태율	31.3%	43.8%	14.5%	58.8%	48.8%	26.3%	38.1%
순 위	(4)	(3)	(6)	(1)	(2)	(5)	

총 462두 인공수정을 하였고, 임신두수는 176두로 수태율이 38.1%였으며 지역 및 인공수정사를 고려한 수태율 분포는 14.5%-58.8% 였다. 수태율 분석 결과 수정사간 수태율이 유의적으로 차이가 있었는데 특정 수태율 저조지역의 인공수정은 공시 육성우 집단이 자가인공수정 및 수정란이식이 만연하던 지역으로 추후 수정사에게 성감별 정액의 인공수정을 의뢰한 상황이 많았던 관계로 수태율이 낮았던 결과를 확인할 수 있었다. 따라서 수태율이 극히 저조하였던 지역 및 수정사인 C, F 지역을 제외하고 수태율을 분석하면 45.6% (146두/320두) 수준으로 타국의 성감별정액 인공수정 수태율과 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 인공수정을 실시하면서 보다 효과적인 방법을 찾고자 요인별로 수태율을 분석한 결과는 표 3과 같다.

표 2. 성감별 정액의 요인별 인공수정 수태율 분석

구 분	씨수소		충진 정자수		수정 부위별		계
	H-1009	H-304	400만	200만	자궁각	자궁체	
수정두수	230두	232두	232두	230두	249두	213두	462두
임신두수	98두	80두	97두	79두	102두	74두	176두
수태율	<b>42.6%</b>	34.5%	<b>41.8%</b>	34.3%	<b>41.0%</b>	34.7%	<b>38.1%</b>

요인별 분석은 크게 3가지로 씨수소별, 스트로 내 충진정자수, 인공수정 주입부위에 따른 수태율 차이를 살펴보았는데 유의적인 차이는 인정되지 않았으나, 씨수소간에 수태율이 다소 차이가 있었고, 스트로내 충진정자수는 400만이, 수정부위는 자궁각 주입에서 다소 좋은 결과

를 얻어 공히 40% 이상의 수태 율을 나타냈다.

표 3. 성감별정액 인공수정 분만결과 분석

구 분	임 신	분만확인	정상 분만			유,사산	기 타
			암	수	계		
두 수	176두	132두	94두	15두	109두	23두	44두
%		75.0%	<b>86.2%</b>	<b>13.8%</b>	82.6%	17.4%	25%

표 1.에서 보는 바와 같이 성감별정액의 번식효율성과 산자를 통한 성분리 정확도 확인하기 위한 실증실험으로 총 426두를 인공수정한 결과 176두가 임신되어 38.1%의 수태율을 보였으며, 임신된 개체 중 매각 및 도태 등으로 분만 확인이 불가능한 44(25%)두를 제외하고, 최종적으로 132두(75.0%)의 분만을 확인할 수 있었으며, 임신기간 중 유·사산 등으로 정상적인 분만이 이루어지지 않아 성별을 파악 할 수 없는 23두(17.4%)를 뺀 정상 분만 109두(82.6%)에 대한 산자의 성비를 확인한 결과 암송아지는 94두 수송아지는 15두로 각각 86.2%:13.8%의 성비 결과를 보였으며, 체외수정란을 이용한 조사 결과(표 5)의 91.1%(27/29)보다 5% 낮은 수준의 인공수정을 통한 성감별정액의 성분리 정확도 결과를 얻을 수 있었다.

표 4. 성감별정액을 이용한 체외수정란의 성분리 정확도 분석

구 분	검사 수정란	성판정 결과		비 고 (분석 방법)
		암	수	
개 수	29개	27개	2개	PCR DNA분석법
%		<b>91.1%</b>	<b>8.9%</b>	

성감별정액을 이용한 현장실증실험과 병행하여 체외에서 배양된 난자를 공여하고 성감별정액과 체외수정 과정을 거쳐 생산된 체외수정란을 PCR기법 통한 DNA분석으로 총 29개의 분석된 체외수정란 중 27개의 체외수정란이 자성인 것으로 확인되어 91.1%의 성감별액 성분리 정확도를 확인 할 수 있었다.

인공수정을 통한 현장실증실험과 체외수정란의 성분리 정확도의 결과로 미루어 두 실험간의 5%의 차이가 있었으나 인공수정을 통한 현장실증실험에서의 여러 가지 요인(매각, 도태, 유·사산)에서 기인된 오차를 고려할 때 유사한 결과로 보여지며 성감별정액의 성분리 정확도는 성감별 정액을 이용한 번식 수행의 모든 기술을 활용하는데 큰 문제가 없다는 판단과 특히 성감별 정액의 인공수정 산업에 공급도 가능하다고 결론을 얻었다.

[2협동과제]

○ 성감별정자의 인공수정 성공률을 높이기 위한 정자생존을 향상기술 개발

Catalase가 정자의 성분리 과정에서 생존성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 catalase를 0, 0.37, 1.1, 3.3 ug/ml의 농도로 catach fluid에 첨가 후 정자를 기 확립된 성감별정자의 처리 프로토콜에 따라 0.5 ml 스트로에 충전 후 LN<sub>2</sub> vapor 방법으로 냉동하였다. 냉동된 정액은 38°C에서 30초간 항온수조에 침지하여 용해 후 38°C에 보존하면서 30분 및 120분에 활력도 (post-thaw motility, PTM)를 현미경 하에서 조사하였다.

원정액에 대한 catalase의 첨가효과는 표 1과 같다. 정자의 냉동용해 후 30분에는 catalase의 첨가농도에 따른 활력도에 차이가 없었으나, 120분에는 첨가된 처리구의 활력도가 첨가되지 않은 대조군에 비해 높았다.

표1. 원정액에 catalase첨가 후 PTM

Catalase (ug/ml)	30분	120분
0	48.2	33.8
0.37	48.8	40.8
1.1	48.7	43
3.3	49.4	42.6

성분리 정자에 대한 catalase의 첨가효과는 표 2와 같다. 원정액의 결과와 유사하게 정자의 냉동용해 후 30분에는 catalase의 첨가농도에 따른 활력도에 차이가 없었으나 120분에는 첨가된 처리구의 활력도가 첨가되지 않은 대조군에 비해 높았다.

표 2. 성분리 정액에 catalase 첨가 후 PTM

Catalase (ug/ml)	30분	120분
0	46.7	33.2
0.37	46.8	40.4
1.1	45.8	40
3.3	47	39.6

본 연구로 catalase 첨가에 의해 정액 내 정자의 냉동용해 후 생존성이 높아지는 것을 확인 하였다. 그러나 catalase에 의한 최적의 생존을 향상 방법을 확립하기 위해서는 차년도에 성분리 과정의 여러 단계에서 catalase의 효과를 단계별로 연구하는 것이 필요하다.

[제 3협동과제]

○ 성감별 수정란의 이식 및 수태율 조사

OPU 유래 성감별 수정란 이식에 따른 수태율을 조사하기 위하여 농가에 이식을 실시하였다. 2012년 12월부터 2013년 5월까지 총 95개의 수정란을 공란우에 이식을 실시하였으며 임신감정은 이식 후 90일 경에 실시하였다. 임신감정은 2013년 2월 말까지 46두의 대상우에 대해 실시하였으며 수정란 이식을 한 시술자가 직접 실시하였다. 또한 수태율 향상을 위해 전년도의 연구결과에 따라 이식 전 3개월부터 사료첨가제를 급여하였다.

수정란 이식 및 감정 결과는 다음과 같다.

표 1. 수정란이식 및 수태율 조사

대상농가	대리모	이식두수	임신감정 대상우	임신감정결과 (%)
5농가	95두	95두	46두	19두 (41.3%)

이식은 5농가를 대상으로 실시하였으며 임신감정 결과 대상우 46두 중 19두에서 임신감정이 확인(41.3%)로 확인되었다. 이는 전 세계적으로 성감별 정액을 이용하여 인공수정을 실시하였을 경우 20% 이하의 수태율을 보이는 것과는 대조적으로 성감별 수정란의 수태율이 높은 것으로 확인되었으며 이는 성감별 수정란 이식이 더욱 확대되는 계기가 될 것으로 판단된다. 성감별정자를 이용한 수정란의 생산 및 이식은 궁극적으로 젖소 개량 및 번식효율 증가, 후보축 확보 측면에서 엄청난 장점이 있을 것으로 판단된다.

## 7. 4차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
성감별된 OPU유래 고능력 송아지의 생존성, 증체량 평가	성감별 수정란을 이식한 후 태어난 산자의 비율과 성비를 확인하고자 함	OPU유래 수정란을 총 95두에 수정란이식을 실시하여 이식 후 약 3개월에 임신감정을 실시한 결과 총 42두(43.75%)에서 수태가 되었음을 확인하였다. 임신감정 확인된 42두에서 36두가 분만되었으며 생산된 산자의 성비는 암컷 33두, 수컷 3두로 암컷의 성비가 91.6%로 확인되었다. 이는 수정란 생산에 사용된 성감별 정액의 성비에서 암컷의 비율이 약 92%인 것을 감안하면 정상적인 성비로 판단된다. 수정란의 성비를 확인하기 위하여 Y정자를 이용하여 성감별 수정란을 생산하여 Y-specific ZRSR2Y gene을 이용해 PCR 분석한 결과 약 90%의 성감별 수정란에서 Y 염색체를 가진 수컷수정란임을 확인하였다. 암컷정자는 이식을 위한 수정란의 생산에 활용하였다.
성감별된 OPU 유래 송아지의 친자확인 및 검증	OPU 유래 수정란에서 태어난 산자의 정확한 유전정보 확인을 위하여 친자확인을 분석 실시	OPU 유래 수정란의 친자감정을 분석하기 위해 산자와 공란우의 모근을 채취, 유전자 분석을 통하여 36두 중 20두를 대상으로 친자감별을 실시한 결과 100% 친자임을 확인하였다. 친자감별은 대상우의 모근을 채취하여 DNA를 추출하였으며 국제 표준으로 채택되어 있는 11종의 MS marker (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, ETH3, ETH225, BM1824, INRA23)와 1쌍의 sexing marker를 Multiplex PCR이용하여 분석하였다.
성감별 OPU유래 수정란이식에 의한 개량방법의 경제성분석 및 산업화 적용 방법 정립	OPU 유래 수정란의 경제적 효과를 분석하고 산업화에 적용할 수 있는 방안을 연구	국내소비에 요구되는 2.1백만톤의 원유를 생산하기 위해 약 206천두의 착유두수가 필요하나, 우수한 공란우로부터 OPU유래 성감별 수정란이식으로 개량했을 경우 161천두의 착유두수로 충분한 원유 생산이 가능함으로써 45천두의 사육두수를 감소시킬 수 있다. 이와 같은 결과로 연간 2,430억원의 사육비용이 절감되므로 그 만큼 생산원가를 절감 및 부가가치를 얻을 수 있다. 이와 같이

		<p>단 기간에 대량으로 고능력 젖소 집단을 형성할 수 있는 개량방법으로 개량을 완성할 수 있을 것으로 사료된다. 이와 같이 개량속도를 높이기 위해서는 국가적인 'OPU유래 성감별 젖소수정란의 생산공급센터'를 구축하여 전국적인 공급망을 갖출 필요가 있다고 판단된다.</p>
<p>공시 씨수소의 선정과 OPU에 의한 수정란 생산을 위한 성감별 정액 생산 및 정액 공급</p>	<p>젖소개량사업소의 고능력 씨수소 중 유량, 단백질, 체형 및 유방형질 등 예상유전전달능력이 우수한 개체를 OPU 유래 성감별 수정란 생산을 위해 공여 및 성감별동결정액을 생산 낙농가 공급</p>	<p>보유 씨수소 중 유전능력 및 형질별 예상유전전달능력이 우수한 씨수소를 4두(미국형 4두) 공시하여 최상의 종모우를 선정하고, 생산된 19,053개의 성감별 동결정액 중 총 17,663개를 국내 낙농가의 젖소개량에 활용할 수 있도록 인공수정용으로 공급하였다.</p>
<p>성감별정자의 인공수정 성공률을 높이기 위한 정자 생존을 향상기술 개발</p>	<p>정자의 성분리 단계별 catalase첨가에 따른 정자의 냉동용해 후 생존활력을 조사</p>	<p>Catalase를 Talp 정자염색용액, catch fluid, 냉동희석제 AB에 대조구 0, 0, 0 ug/ml, 처리구 1에 0.2, 1, 0.2 ug/ml, 처리구 2에 2, 10, 2 ug/ml의 농도로 각각 첨가 후 정자를 기 확립된 성감별정자의 처리 프로토콜에 따라 냉동하였다. 또한 정자 염색을 1, 5시간 실시하여 장시간의 정자염색과정에 대한 catalase의 영향을 분석하고자 하였다. 냉동된 정자는 용해 후 38°C에 보존하면서 30분 및 120분에 활력도를 비교 조사하여 성감별 정자의 생존성을 높이는 조건을 찾고자 하였다.</p>
<p>OPU 유래 수정란 이식 및 수태율 조사</p>	<p>성감별 수정란의 이식 및 임신감정을 통한 수태율 조사하여 성감별 수정란 이식의 효율성 및 암컷 생산 비율을 조사하고자 함</p>	<p>총 95두에 대한 수정란 이식을 실시하였으며 임신감정은 약 3개월 후에 직장 촉진법으로 실시한 결과 총 42두(43.75%)에서 수태가 확인되었다. 정상 임신기간 후에 생산된 송아지들의 성비를 조사한 결과 암컷의 생산비율은 33두로 91.6%의 결과를 확인하였다. 이는 성감별 정자를 이용한 OPU유래 고능력 젖소 암컷 수정란의 생산 및 이식으로 당대에 개량을 완성할 수 있을 뿐만 아니라 고능력 집단의 후보축을 확보할 수 있는 가장 효과적인 개량방법으로 판단된다.</p>



## 8. 4차년도 세부연구수행 결과

### [제 1세부과제]

#### ○ 성감별된 수정란의 성비조사

Flow Cytometry 방법에 의한 성 분리된 수컷 동결정액으로 체외수정란을 생산하여 이를 Y-specific gene의 발현을 조사하였다. 이를 확인하기 위하여 먼저 Y-sperm으로 IVF시킨 single blastocyst를 가지고 RNA를 분리하였다. PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturs)를 이용하여 RNA를 분리 한 다음, cDNA는 SuperScriptIII Reverse Transcriptase (Bio-Rad)를 사용하여 total RNA에서부터 합성하였다. PCR은 housekeeping gene인  $\beta$ -actin과 Y-Specific gene인 ZRSR2Y를 이용하여 수행하였고, PCR의 수행 프로그램은 다음과 같다; 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C 30 sec and 72°C for 1 min; 10 min 72°C for extension (PCR Primer 정보는 표 1과 같다).

PCR 결과물은 1% agarose gel에 전기영동 되어 gel imaging system을 통해 확인한 결과 총 10개의 수컷 동결정액으로 수정시킨 수정란을 확인하였으며, positive control으로는 male testis를 이용하여 positive를 확인하였다. 그림 1.에서 보면 positive control인 male testis (12번)에서는 housekeeping gene Actin과, Y-specific gene ZRSR2Y가 모두 검출 되었고, 1-10번의 수컷 동결정액으로 수정시킨 수정란에서는 2-10번에서 ZRSR2Y인 Y-specific gene이 검출 되었고, 1번의 경우에는 Y-specific gene이 검출되지 않았다. 결과 Flow Cytometry 방법에 의한 성 분리된 수컷 동결정액으로 체외수정란을 만든 수정란에서 약 90%정도가 수컷 수정란을 생산해 내는 것을 알 수 있었다.

표 1. Primer sequences and information for PCR.

Gene name	Primer sequence	Length (bp)	Accession No.
Actin	Forward 5'-GAAGATGACCCAGGTCAGTGG-3'	20	NM_173979.3
	Reverse 5'-GTACATGGCAGGGGTGTTGA-3'	20	
ZRSR2Y	Forward 5'-GTCAGTTGCAACCTGGAACC-3'	20	JX899373.1
	Reverse 5'-GCCATATTCCATTGGGTAC-3'	20	

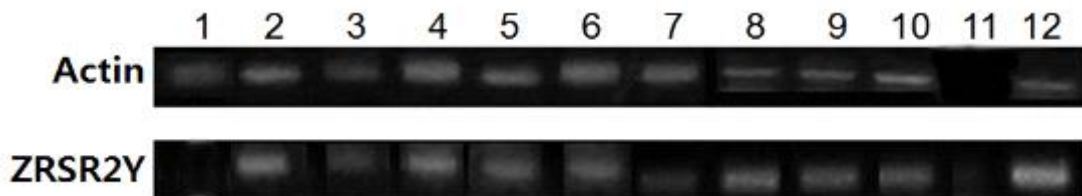


그림 1. Retults of sexing and expression analysis in individual blastocysts by reverse transcriptase polymerase chaine reaction (RT-PCR). The ZRSR2Y ,Y-linked gene, was expressed in 2-10 lines. ACTIN was used as a control gene. 12 line, Male testis cDNA was analyzed as positive control. 11 line was analyzed as negative control.

○ 성감별된 OPU 유래 고능력 송아지의 생존성, 증체량 평가

본 연구에서는 전년도 이식을 실시한 대리모에서 생산된 산자의 생존성을 검증하기 위하여 수태율과 생존성 및 산자의 암수를 조사하였다. 전년도에 총 95개의 수정란을 공란우에 이식을 실시하였으며 임신감정은 이식 후 90일 경에 실시하였다. 수정란 이식 및 감정 결과는 다음과 같다.

표 2. 수정란이식 및 수태율 조사

대상농가	이식두수	임신감정결과 (%)
5농가	95두	42두 (43.75%)

표 3. OPU유래 수정란 이식 및 분만 결과

총 이식두수	수태 (%)	분만 (%)	암컷 (%)	수컷 (%)
96	42 (43.75)	36두 (37.5)	33두 (91.6)	3두 (8.3)

수정란 이식 후 분만 결과 및 성비는 다음과 같다. OPU유래 성감별에 의해 생산된 수정란의 이식 결과는 수란우 95두 중 42두에서 임신감정이 확인(43.75%)되었다. 이러한 결과는 전 세계적으로 성감별 정액을 이용하여 인공수정을 실시하였을 경우에도 20% 이하의 수태율을 보이는 것과는 대조적으로 성감별된 수정란의 수태율이 높은 것으로 확인되었으며 분만 결과는 암컷 33두(91.6%), 수컷 3두(8.3%)로 확인되었다. 이는 성감별 정액을 제조하더라도 X와 Y를 완벽히 분리되지 않는 한계가 있으며 이에 따라 수컷이 생산된 것으로 보인다. 성감별 정자를 이용한 수정란의 생산 및 이식은 궁극적으로 젖소를 당대에 개량 및 번식효율 증가, 후보축 확보에 따른 후속 경제적 효과가 크게 개선될 것으로 판단되고 연속적인 개량의 효과가 발생되므로 동일한 집단구성이 형성되고 그에 따른 사양관리 측면에서 큰 장점이 있을 것으로 판단된다. 현재 2013년 12월부터 성감별 수정란을 생산하여 이식을 진행 중에 있으며 40두에 이식을 완료한 상태이다.

○ 성감별된 OPU 유래 송아지의 친자확인 및 검증

성감별 OPU 유래 송아지의 친자확인을 위하여 생산된 산자 중 20두의 모근을 채취하였다. 모근은 5농가에서 20두를 대상으로 실시하였으며 친자감별은 친자감별 키트(그림 1)를 이용하여 실시하였다.



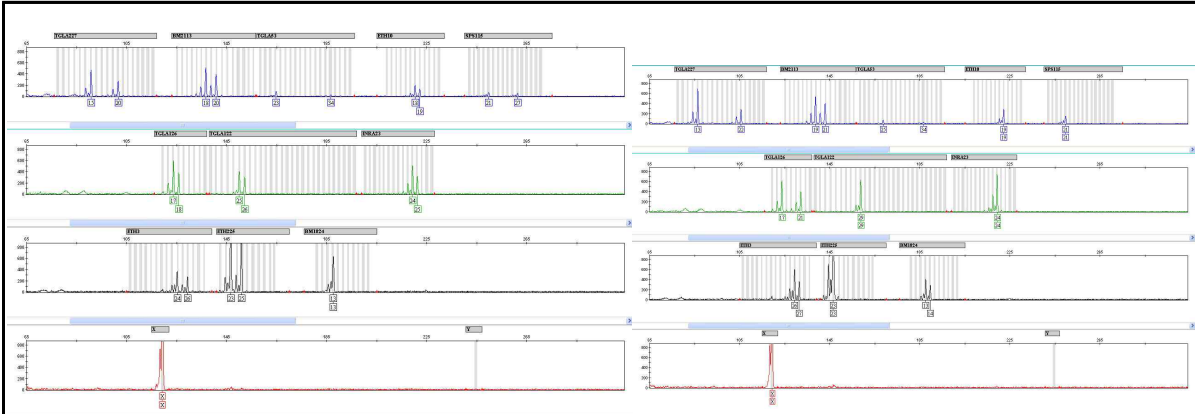


그림 3. Multiplex PCR 결과.

OPU유래 수정란이식으로 생산된 고성력 암송아지들의 친자감정을 실시한 결과 100% 부모와 일치함을 확인하였다.

○ 성감별 OPU유래 수정란이식에 의한 개량방법의 경제성분석 및 산업화 적용방법 정립

현재 2013년 12월말 기준 국내 사육되고 있는 젖소 및 사육 농가수는 Table 1에서 보는 것과 같이 총 사육두수 424천두 전년대비 사육두수는 1.0% 증가하였으나, 농가수는 5.8천호로 전년대비 -3.3% 감소하였다. 또한 착유두수는 2011년도 대비 2012년도는 구제역 영향에 의한 증가하는 경향이 있었으나, 2013년에는 206천두로 전년 동기 -0.4% 감소하였다.

표 5. 년도별 사육두수 및 사육 농가수의 증가사항

(단위 : 천마리, 천가구, 마리, %)

구 분	'11.12	2012.12	2013.12	비고
총 사육두수	404	420	424 (1.0%)	
가임암소	283	299	304 (1.7%)	
착유우	191	209	206 (-0.4%)	
사육 가구 수	6.1	6	5.8 (-3.3%)	

주) 통계청 KOSIS 국가통계포털 자료

년도별 원유생산량은 표 6에서 보는 것과 같이 2011년도는 2010년도 구제역 여파에 의한 1,889,150톤에서 2012년은 2,110,698톤, 2013년도 2,093,072톤으로 증가하여 현재까지 원유 생산에 필요한 사육두수는 2013년12월 기준으로 206천두의 착유두수가 필요하다. 그러나 유전적 가치가 우수한 유생산량이 13,000 kg 이상 생산되는 공란우를 이용하여 OPU 유래 성감별 수정란이식으로 개량을 했을 경우 161천두의 착유우로 현재 생산되는 원유가 생산가능하고, 사육두수도 45천두를 감소하며 또한 표 7에서 보는 것과 같이 사육비용이 연간 2,430억원의 절감효과가 발생된다.

표 6. 년도별 원유생산량 및 OPU방식에 의한 개량에 의한 착유두수의 감소폭

(단위 : 천마리, %)

년도별	2011	2012	2013	비고
원유생산량(ton)	1,889,150	2,110,698	2,093,072	
현재 두당 생산량(kg)	9,891	10,099	10,161	년도별 12월기준
개량전 착유두수	191	209	206	통계청 자료
개량 후 착유두수	145	162	161	원유량 대비 개량 후 사육예상 두수
감소두수 (%)	-46 (24.1)	-47 (22.5)	-45 (21.8)	

주) 원유생산량 및 개량전 착유두수는 통계청 KOSIS 국가통계포털 자료.

OPU 방식의 수정란 생산용 공란우의 검정능력이 원유생산량 13,000 kg 이상.

표 7. 년도별 원유생산량 대비 개량 후 사육감소에 따른 사료비 절감액

(단위 : 천마리, 천원, %)

년도별	2011	2012	2013	비고
원유생산량(ton)	1,889,150	2,110,698	2,093,072	
개량 후 착유두수	145	162	161	
감소두수 (%)	-46 (24.1)	-47 (22.5)	-45 (21.8)	
사료비 절감액	-248,400,000	-253,800,000	-243,000,000	

주) 통계청 KOSIS 국가통계포털 자료.

2013년 12월 기준 착유우 두당 년 사료비; 5,400,000원(월; 450,000원).

국내에 사육 중에 젖소의 개량을 위해서 새롭게 정립된 OPU 유래 성감별 수정란이식기술을 적극적으로 활용하여 단기간에 대량으로 고능력 젖소 집단을 구축하여 개량을 완성할 수 있다. 그리하여 국내의 젖소 개량방법에 OPU유래 성감별수정란이식기술의 접목으로 개량효과의 극대화를 이루어 고능력우 집단의 조기구축과 농가의 경영합리화에 기여할 수 있을 것이다.

#### [제 1협동 과제]

##### ○ 고능력 씨수소 정액의 선정

본 연구를 위해 농협 젖소개량사업소에서 사육되고 있는 씨수소 중 성감별 동결정액을 생산하여 OPU 유래 체외수정란 생산을 위해 선정된 고능력 씨수소 정액은 4두로 H-314, H-316, H-319, H-327번이며 개체별 유전능력의 표 1과 같다.

표 1. 성감별 정액 생산을 위한 씨수소의 유전능력 및 내역

종모우명 (정액번호)	종합지수	유전전달능력					중점개량형질
		유 량	유지방	유단백	체 형	유 방	
<b>알타펜텀 (H-314)</b>	(TPI) 1,619	566	9	16	2.17	1.90	체형, 유방
도 립 (H-315)	(LPI) 850	1,345	49	29	7	6	유량,지방,체형
<b>페노쉬 (H-316)</b>	(TPI) 1,778	284	4	14	1.89	1.67	유방, 체형
<b>디세오 (H-319)</b>	(TPI) 1,789	558	11	14	1.30	1.88	유방
에너지 (H-320)	(TPI) 1,961	444	24	14	2.23	1.77	유지방, 체형
<b>알타버져 (H-327)</b>	(TPI) 1,945	487	30	12	1.21	1.05	유지방, 체형

위 표의 H-315, H-316, H-319, H-320번 씨수소 정액은 1차년도 신선 및 동결정액 성상검사 및 2차년도 성감별정액을 이용한 실증실험에 공시되어 인공수정 사업에서 산업적 이용이 가능하다고 판단된 정액으로 낙농가에 인공수정용으로 공급된 개체임을 밝히며, 성감별 동결정액을 생산하기 위한 씨수소 선정은 젖소개량사업소 보유 씨수소 중 유전능력이 우수하며 형질별 예상유전전달능력이 탁월한 개체 중에서 성감별 동결정액 성상에 영향이 없는 씨수소를 최종적으로 선정하여 실험에 공시될 수 있도록 준비하였다.

최종적으로 4두가 선정되어 성감별 동결정액을 생산하였는데, 체형형질이 우수한 H-314번, 유방형질이 우수한 H-316, H-319번, 유지방형질이 우수한 H-327번 정액의 형질이 탁월하여 공시할 수 있었다

**○ 고능력 씨수소 성감별 동결정액 생산 및 공급결과**

국내 낙농가의 인공수정용 성감별 동결정액을 생산하기 위한 고능력 씨수소는 4두였으며, '11년 7월부터 '12년 5월 까지 생산된 성감별 동결정액의 성상을 검사하여 공급기준 이상의 우수한 정액을 확보하였으며, 2010년 말부터 2011년 초까지 발생한 구제역에 따른 낙농가의 조기 피해 복구를 위해 성감별 정액을 '11년 9월부터 공급하기 시작하여, '14년 현재까지 공급 중이며, 고능력 씨수소를 활용한 성감별 정액의 생산 및 공급 결과는 표 2와 같다

표 2. 고능력 씨수소 성감별 동결정액 성상 및 생산 결과

구 분	성감별정액 생산		성감별정액 공급			비 고
	충진정자수	총생산량	공급기간	공급량	재 고	
HS-315	400만	2,201개	'11,09,29 -'11,12,30	2,201	-	정액성상 기준 활력 40%이상
HS-316	400만	6,053개	'11,09,29 -공급중	5,563	490	기형 15%이하 총생산량
HS-319	400만	5,883개	'11,12,22 -공급중	4,496	1,387	19,053개 생산 총공급량
HS-320	400만	5,403개	'11,09,29 -'12,6,07	5,403	-	17,663개 공급

성감별 동결정액을 생산하여 낙농가에 공급하기 위한 고능력 씨수소는 H-315, H-316, H-319, H-320번, 등 4두였으며 생산된 성감별 동결정액의 성상은 정액 공급기준 이상의 매우 우수한 상태였고, 생산된 성감별 동결정액은 19,053개였으며, 이중 총 17,663개의 성감별 동결정액을 공급하였다.

[제 2협동 과제]

○ 성감별정자의 분리효율 향상기술 개발: 정자 성분리 단계별 catalase 첨가효과

Catalase가 정자의 성분리 과정에서 생존성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 catalase를 Talp 정자염색용액, catch fluid, 냉동희석제 AB에 대조구 0, 0, 0 ug/ml, 처리구 1에 0.2, 1, 0.2, 처리구 2에 2, 10, 2 ug/ml의 농도로 각각 첨가 후 정자를 기 확립된 성감별정자의 처리 프로토콜에 따라 0.5 ml 스트로에 충전 후 LN<sub>2</sub> vapor 방법으로 냉동하였다. 냉동된 정액은 38°C에서 30초간 항온수조에 침지하여 용해 후 38°C에 보존하면서 30분 및 120분에 활력도 (post-thaw motility, PTM)를 현미경 하에서 조사하였다.

성분리 단계별 catalase의 첨가효과는 표 1과 같다. 정자의 냉동용해 후 30분에는 catalase의 첨가농도에 따른 활력도에 차이가 없었으나, 120분에는 첨가된 처리구의 활력도가 첨가되지 않은 대조군에 비해 높았다.

표1. 성분리 단계별 catalase 첨가 후 PTM

Catalase (ug/ml)	30분	120분
대조구 (TCA 0, 0, 0)	46.4	33.6
처리구 1 (TCA 0.2, 1, 0.2)	45.5	41.6
처리구 2 (TCA 2, 10, 2)	45.8	41.2

T: Talp, C: Catch fluid, A: AB freezing extender

정자의 성분리는 종모우에 따른 개체차가 있으며, 동일한 종모우에서도 채취정액에 따른 성분리 효율에 차이가 있다. 정자 성분리의 1단계는 형광염색제에 의한 정자 염색이며, 정자에 따른 염색시간에 큰 차이가 있는바, 정자를 장시간 염색하였을 때 catalase 첨가가 냉동융해 후 생존성에 미치는 영향을 조사하였다.

정자를 1, 5시간 Talp 용액에서 염색 후 성분리 단계에 따른 catalase의 첨가효과는 표 2와 같다. 정자의 냉동융해 후 30분에는 각각의 염색시간 내에서는 catalase의 첨가농도에 따른 활력도에 차이가 없었으나, 120분에는 첨가된 처리구의 활력도가 첨가되지 않은 대조군에 비해 높았다.

표 2. 정자의 염색시간에 따른 catalase 첨가 후 PTM

염색시간	Catalase (ug/ml)	30분	120분
1h	대조구 (TCA 0, 0, 0)	48.5	37.2
	처리구 1 (TCA 0.2, 1, 0.2)	45.8	41
	처리구 2 (TCA 2, 10, 2)	46.2	41.6
5h	대조구 (TCA 0, 0, 0)	44.3	30
	처리구 1 (TCA 0.2, 1, 0.2)	45.2	42.2
	처리구 2 (TCA 2, 10, 2)	45.4	40.8

본 연구로 정자의 성분리 과정 중 정자염색단계, catach fluid단계, AB냉동회석 단계에 각각 catalase를 첨가하는 것이 성분리 정자의 냉동융해 후 생존성을 높일 수 있음을 확인하였다. 한편 정자 성분리의 각 단계에는 난황성분을 이용하되, 차년도 연구에서는 성분리 과정 중 특히 정자 염색단계에 난황이 미치는 영향을 분석함으로써 정자성분리의 효율성을 높이는 조건을 확인하는 것이 필요하다.

**[제 3협동과제]**

**○ 성감별된 OPU 유래 고능력 송아지생산 시 암컷송아지 생산비율 조사**

OPU 유래 성감별 수정란 이식 후 생산된 산자의 성비를 조사하기 위하여 이식을 실시한 농가에서 정보를 받아서 분석을 실시하였다. 전년도(2012년 12월부터 2013년 5월까지)에 총 95개의 수정란을 공란우에 이식을 실시하였으며 임신감정은 이식 후 90일 경에 실시하였다. 임신감정은 전 대상우에 대해 실시하였으며 수정란 이식을 한 시술자가 직접 직장촉진법으로 임신감정을 실시하였다. 생산된 산자의 성비는 다음과 같다.



표 1. OPU유래 수정란 이식 결과 및 분만 결과

이식농가	총 이식두수	수태 (%)	분만 (%)	암컷 (%)	수컷 (%)
5농가	96	42 (43.75)	36두 (37.5)	33두 (91.6)	3두 (8.3)

OPU 유래 성감별에 의해 생산된 수정란의 이식은 젖소를 사육하고 있는 5농가를 대상으로 실시하였으며 42두(41.3%)에서 임신감정이 확인되었다. 또한 생산된 산자는 36두가 생산되었으며 암컷 33두, 수컷 3두로 암컷의 성비가 91.6%로 확인 되었다. 이러한 결과는 성감별 수정란의 높은 암컷 생산비율을 보이며 성감별 정자를 이용한 수정란의 생산 및 이식은 궁극적으로 젖소를 당대에 개량 및 번식효율 증가, 후보축 확보에 따른 후속 경제적 효과가 크게 개선될 것으로 판단된다. 또한 연속적인 개량의 효과가 발생되므로 동일한 집단구성이 형성되고 그에 따른 사양관리 측면에서 큰 장점이 있을 것으로 판단된다.

○ 성감별된 OPU 수정란 이식효율 향상을 위한 FM 처리

성감별 OPU유래 수정란이식의 효율향상을 위하여 FM (Fluximine Injection)을 이용하여 수태율 향상을 위하여 실시하였다. FM은 동물의 발열, 염증 및 통증의 치료에 사용되는 약품으로 Anti-prostaglandin 역할을 하는 것을 이용하여, 수정란 이식 시 자궁경관과 자궁내막과 자극으로 인한 Oxytocin and PGF2a 호르몬 분비를 억제시켜 궁극적으로 자궁경관 및 자궁내막의 안정성을 높이고 이식된 수정란의 부화 및 수태율을 높일 수 있을 것으로 판단하였다. 그리하여 최종적으로 젖소에 활용하기 위하여 한우에서 사전 예비연구를 실시를 위해 총 27두를 대상으로 FM 처리군 13두, 비처리군 14두를 수정란이식하여 수태율을 비교 분석하였다.

FM처리는 수정란이식 10분 전 10 ml FM을 근육주사를 투여한 후 수정란을 이식하였다. 이러한 과정은 FM이 자궁에 흡수되어 자궁경관 및 자궁내막의 근육수축을 막고 이완시킬 뿐만 아니라 궁극적으로 수정란의 부화 및 착상에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.



그림 1. FM (Fluximine Injection).

FM 처리군과 비처리군의 수정란이식 후 수태율의 결과는 다음과 같다.

표 2. FM 투여군과 비투여군의 수태율 비교

	처리 두수	수태(%)
FM 비처리군	14두	7두 (50%)
FM 처리군	13두	10두 (76.9%)

대리모 27두를 대상으로 FM 처리군과 비처리군을 확인한 결과 FM 처리군은 10두 (76.9%)에서 임신을 확인하였고, 비처리군에서는 50%(7두)에서 임신이 확인되어 FM처리군에서 높은 임신율을 얻을 수 있었다. 이는 FM 처리가 수정란 이식 시 자궁경관과 자궁내막 과 자극으로 인한 Oxytocin and PGF2a 호르몬 분비를 억제한 결과로 보이며 수태율 향상을 위해서 FM을 처리하여 이식하는 것이 효율성이 높은 것으로 사료된다.

## 9. 5차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
체내유래 암컷수정란 생산기술 개발	OPU유래 성감별 고능력 젖소 수정란이식 산업화를 위한 문제점 개선	성감별 정자에 따른 수정란 생산 효율을 조사한 결과 수정란 생산율은 성감별되지 않은 정액(H-314 CT 23.4%, H-330CT 19.3%, H-331CT 18.4%)을 사용한 그룹이 성감별된 정액(H-314Y 13.6%, H-330Y 7.6%, H-331Y 13.45%)을 사용한 그룹보다 유의적으로 높았다. Acrosome의 손상도를 확인한 결과 정상성이 성감별된 정액(22.30±0.53)보다 감별되지 않은 정액(52.10±4.53)이 유의적으로 낮았다. 이러한 차이가 두 그룹간의 수정율의 차이를 보였으며 Acrosome의 정상성의 차이가 를 보이며 이러한 차이로 수정률이 낮은 것으로 보인다.
	성감별 수정란을 이식한 후 태어난 산자의 비율과 성비를 확인하고자 함	OPU 유래 성감별에 의해 생산된 수정란의 이식은 젖소를 사육하고 있는 8농가를 대상으로 실시하였으며 50두(43.47%)에서 임신을 확인하였다. 또한 생산된 산자는 43두가 생산되었으며 암컷 39두, 수컷 3두로 암컷의 성비가 90.6%로 확인 되었다. 이는 수정란 생산에 사용된 성감별 정액의 성비에서 암컷의 비율이 약 92%인 것을 감안하면 정상적인 성비로 판단된다. 수태율 및 산자생산 결과는 전년도 결과와 비슷하였다.
공시 씨수소의 선정과 OPU에 의한 수정란 생산을 위한 성감별 정액 생산 및 정액 공급	젖소개량사업소의 고능력 씨수소 중 유량, 단백질, 체형 및 유방형질 등 예상유전전달능력이 우수한 개체를 OPU 유래 성감별 수정란 생산을 위해 원정액 공여	보유 씨수소 중 유전능력 및 형질별 예상유전전달능력이 우수한 씨수소를 4두(미국형 4두) 공시하여 최상의 종모우를 선정하고, 생산된 19,053개의 성감별 동결정액 중 총 18,255개를 국내 낙농가의 젖소개량에 활용할 수 있도록 인공수정용으로 공급하였다.
성감별정자의 분리효율 및 생존율 향상기술 개발	성분리를 위한 정자의 염색과정 중 난황의 첨가에 따른 정자의 분리도와 냉동융해 후 생존에 미치는 영향 분석	난황은 정자의 냉동 전 및 냉동 후 생존율을 높이는 역할을 하는바, 정자의 성분리 과정에서도 난황을 이용한다. 즉, 성이 분리된 정자를 모으는 catch fluid 와 냉동희석액에 난황을 첨가함으로써 정자의 생존율을 높이나, 정자의

		<p>염색과정 중 난황첨가 효과에 대해서는 알려진 것이 없다. Catalase 첨가 또는 무첨가 Talp 정자염색용액에 2% 난황을 첨가 후 정자를 성분리 및 프로토콜에 따라 냉동하였고, 용해 후 30분 및 120분에 활력도를 조사하여 성감별 정자의 생존율을 높일 수 있는지 비교분석 하였다.</p>
<p>체내유래 수정란 이식효율 향상기술 개발</p>	<p>성감별된 OPU 유래 고능력 송아지 생산 시 암컷송아지 생산비율 조사</p>	<p>OPU 유래 성감별에 의해 생산된 수정란의 이식은 젖소를 사육하고 있는 8농가를 대상으로 실시하였으며 50두(43.47%)에서 임신을 확인하였다. 또한 생산된 산자는 43두가 생산되었으며 암컷 39두, 수컷 3두로 암컷의 성비가 90.6%로 확인 되었다. 이는 성감별 정자를 이용한 OPU유래 고능력 젖소 암컷 수정란의 생산 및 이식으로 당대에 개량을 완성할 수 있을 뿐만 아니라 고능력 집단의 후보축을 확보할 수 있는 가장 효과적인 개량방법으로 판단된다.</p>
	<p>성감별된 OPU 유래 송아지의 친자확인 및 검증</p>	<p>친자감별은 3농가에서 20두를 표본으로 하여 친자감별을 실시한 결과 OPU유래 수정란이식으로 생산된 고능력 암송아지들의 100% 부모와 일치하는 친자감정율을 확인하였다.</p>

10. 5차년도 세부연구수행 결과

[제 1세부과제]

○ 성감별 정자의 Acrosome 분석 및 생존율 향상방안 연구

성감별 정자는 정자를 성감별하는 과정 중에 DNA 손상, 희석, 원심분리, 고압, 레이저 빛 등과 같은 많은 종류의 잠재적인 위험에 노출된다. 이와 같은 위험에 의해 정자 무결성, 막구조, morphology 등에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 본 연구에서 3종류의 정액을 성감별 되지 않은 정액, 성감별 된 정액으로 처리구를 6그룹으로 나누어 배아 발달율을 조사하였다. 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of bull during IVF using frozen-thawed sexed semen.

Sperm No.	Session	IVM	IVC1	Cleavage (%)	IVC2	BL(%)
H-314CT	10	501	472	316 (66.9) <sup>a</sup>	238 <sup>a</sup>	117 (23.4) <sup>a</sup>
H-314Y	11	557	522	293 (56.1) <sup>b,c</sup>	199 <sup>b,c</sup>	76 (13.6) <sup>b,c</sup>
H-330CY	6	321	299	205 (68.6) <sup>a</sup>	135 <sup>a</sup>	62 (19.3) <sup>a,b</sup>
H-330Y	8	406	392	188 (47.6) <sup>c</sup>	93 <sup>c</sup>	31 (7.6) <sup>c</sup>
H-331CT	5	278	266	163 (61.3) <sup>a</sup>	111 <sup>a</sup>	51 (18.4) <sup>a,b</sup>
H-331Y	6	328	306	180 (58.8) <sup>a</sup>	117 <sup>a</sup>	44 (13.4) <sup>b,c</sup>

<sup>a,b,c</sup>Value with superscripts in same line was denoted significantly different ( $p < 0.05$ ).

성감별 정자에 따른 수정란 생산 효율을 조사한 결과 수정란 생산율은 성감별되지 않은 정액을 사용한 그룹이 성감별된 정액을 사용한 그룹보다 유의적으로 높았다. 이러한 결과는 수정란 생산 효율에 영향을 미치며 이러한 이유를 조사하고자 FITC/PI staining을 통하여 정자의 Acrosome 분석을 실시하여 정상적인 정자의 비율과 손상도를 분석하였다.

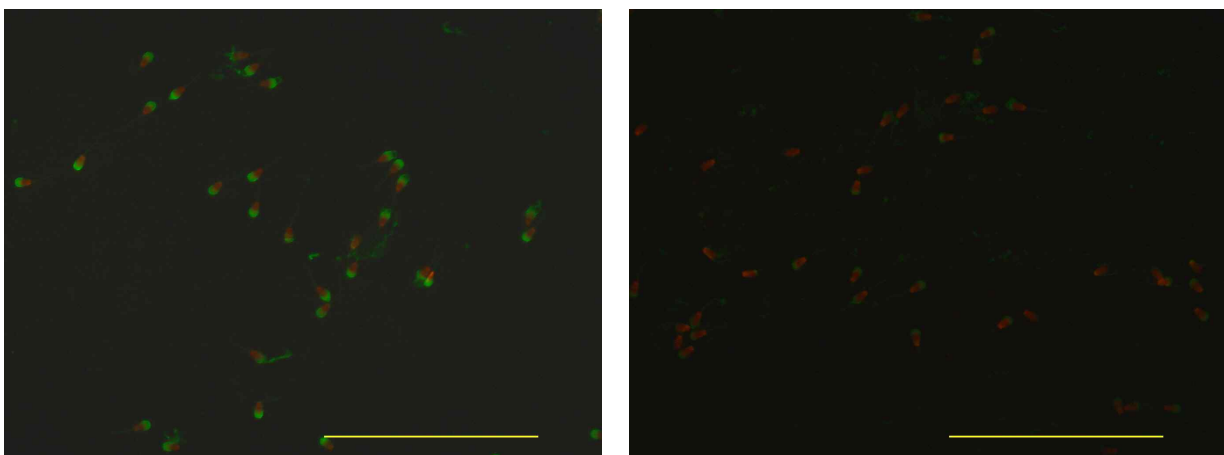


그림 1. 정자의 Acrosome 분석을 위한 FITC/PI staining.

Acrosome 손상도 분석결과는 Table 2와 같이 정상성이 성감별된 정액이 성감별되지 않은 정액이 유의적으로 낮았다. 즉, 정상정자는 unsorted vs. sorted semen에서 각각  $52.10 \pm 4.53$  vs.  $22.30 \pm 0.53$ 로서 유의적인 차이를 보였다. 또한 부분적인 침체손상율은 unsorted vs. sorted semen에서 각각  $21.63 \pm 2.57$  vs.  $36.27 \pm 1.97$  및 완전 침체손상율은 unsorted vs. sorted semen에서 각각  $26.27 \pm 1.97$  vs.  $41.43 \pm 1.69$ 로서 sorted semen에서 부분침체손상율과 완전손상율 모두 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 두 그룹간의 Acrosome의 정상성의 차이가 궁극적으로 이들 정액을 이용한 체외수정률 및 배발달율의 차이로 나타난 것으로 판단된다. 이러한 차이를 극복하기 위해서는 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다. 즉 성감별과정에서 정자의 acrosome 정상성을 유지하기 위한 처리방법 등의 개발이 요구된다.

Table 2. Mean  $\pm$  SD acrosome integrities in sexing sperm.

Type of sperm	Acrosomal status (FITC/PI staining)		
	Intact, %	Partially damage, %	Damage, %
Unsorted sperm	$52.10 \pm 4.53^*$	$21.63 \pm 2.57$	$26.27 \pm 1.97$
Sorted sperm	$22.30 \pm 0.53$	$36.27 \pm 1.97$	$41.43 \pm 1.69$

\* Value with superscripts in same line was denoted significantly different ( $p < 0.05$ ).

### ○ 성감별 수정란을 통하여 생산된 산자의 생존성 및 증체량 평가

본 연구에서는 전년도 이식을 실시한 대리모에서 생산된 산자의 생존성을 검증하기 위하여 수태율과 생존성 및 산자의 암수를 조사하였다. 전년도에 총 115개의 수정란을 공란우에 이식을 실시하였으며 임신감정은 이식 후 90일 경에 실시하였다. 수정란 이식 및 감정 결과는 다음과 같다.

표 2. 수정란이식 및 수태율 조사

대상농가	이식두수	임신감정결과 (%)
8농가	115두	50두 (43.47%)

수정란 이식 후 분만 결과 및 성비는 표 3에서와 같이 수태율 43.47% (50/115두), 분만율 37.3% (43두/115두)에서 실제 성비는 암컷 vs. 수컷 (39두: 90.6% vs. 3두: 6.9%)로서 암송아지의 생산이 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 성감별 정자를 이용한 OPU 유래 수정란생산 및 이식으로 암송아지의 생산효율을 높일 수 있다는 결과를 얻었다 (표 3).

표 3. OPU유래 수정란 이식 및 분만 결과

총 이식두수	수태 (%)	분만 (%)	암컷 (%)	수컷 (%)
115	50 (43.47)	43두 (37.3)	39두 (90.6)	3두 (6.9)

이러한 결과는 전 세계적으로 성감별 정액을 이용하여 인공수정을 실시하였을 경우에도 20% 이하의 수태율을 보이는 것과는 대조적으로 성감별된 수정란의 수태율이 높은 것으로 확인되었으며, 분만 결과는 암컷 39두(90.6%), 수컷 3두(6.9%)로 확인되었다 (그림 1).



그림 1. 성감별 수정란 이식으로 태어난 산자.

이는 성감별 정액을 제조하더라도 X와 Y를 완벽히 분리되지 않는 한계가 있으며 이에 따라 수컷이 생산 된 것으로 보인다. 성감별 정자를 이용한 수정란의 생산 및 이식은 궁극적으로 젖소를 당대에 개량 및 번식효율 증가, 후보축 확보에 따른 후속 경제적 효과가 크게 개선될 것으로 판단되고 연속적인 개량의 효과가 발생되므로 동일한 집단구성이 형성되고 그에 따른 사양관리 측면에서 큰 장점이 있을 것으로 판단된다. 또한 성감별된 암소(그림 2)의 정상적인 번식여부를 조사한 결과 성감별된 암소의 인공수정을 통하여 산자의 번식여부를 조사하기 위하여 인공수정을 통한 정상적인 산자의 생산을 조사하였다. 현재 대부분 임신 중이고 10월경부터 산자가 생산될 예정으로 추가적인 추적조사를 할 예정이다.



그림 2. 3차년도 성감별 수정란 이식으로 태어난 산자  
(현재 인공수정 후 만삭의 임신상태로서 10월경부터 분만 예정임).

**[제 1협동 과제]**

**○ 고능력 씨수소 정액의 선정**

본 연구를 위해 농협 젓소개량사업소에서 사육되고 있는 씨수소 중 성감별 동결정액을 생산하여 OPU 유래 체외수정란 생산을 위해 선정된 고능력 씨수소 정액은 4두로 H-314, H-316, H-323, H-327번이며 개체별 유전능력의 표 1과 같다.

표 1. 성감별 정액 생산을 위한 공시 씨수소의 유전능력 및 내역

종모우명 (정액번호)	종합지수	유전전달능력					중점개량형질
		유 량	유지방	유단백	체 형	유 방	
<b>알타펜텀 (H-314)</b>	(TPI) 1,619	566	9	16	2.17	1.90	체형, 유방
도 릭 (H-315)	(LPI) 850	1,345	49	29	7	6	유량, 지방, 체형
<b>페노쉬 (H-316)</b>	(TPI) 1,778	284	4	14	1.89	1.67	유방, 체형
디세오 (H-319)	(TPI) 1,789	558	11	14	1.30	1.88	유방
에너지 (H-320)	(TPI) 1,961	444	24	14	2.23	1.77	유지방, 체형
<b>마텔 (H-323)</b>	(TPI) 1,893	387	11	16	0.77	0.01	유단백, 유지방
<b>알타버져 (H-327)</b>	(TPI) 1,945	487	30	12	1.21	1.05	유지방, 체형

위 표의 H-315, H-316, H-319, H-320번 씨수소 정액은 1차년도 신선 및 동결정액 성상 검사 및 2차년도 성감별정액을 이용한 실증실험에 공시되어 인공수정 사업에서 산업적 이용이 가능하다고 판단된 정액으로 낙농가에 인공수정용으로 공급된 개체임을 밝히며, 성감별 동결정액을 생산하기 위한 씨수소 선정은 젓소개량사업소 보유 씨수소 중 유전능력이 우수하며 형질별 예상유전전달능력이 탁월한 개체 중에서 성감별 동결정액 성상에 영향이 없는 씨수소를 최종적으로 선정하여 실험에 공시될 수 있도록 준비하였다.

최종적으로 4두가 선정되어 성감별 동결정액을 생산하였는데, 체형형질이 우수한 H-314번, 유방형질이 우수한 H-316, 유지방형질이 우수한 H-323, H-327번 정액의 형질이 탁월하여 공시할 수 있었다



○ 고능력 씨수소 성감별 동결정액 생산 및 공급결과

국내 낙농가의 인공수정용 성감별 동결정액을 생산하기 위한 고능력 씨수소는 4두였으며, '11년 7월부터 '12년 5월 까지 생산된 성감별 동결정액의 성상을 검사하여 공급기준 이상의 우수한 정액을 확보하였으며, 2010년 말부터 2011년 초까지 발생한 구제역에 따른 낙농가의 조기 피해 복구를 위해 성감별 정액을 '11년 9월부터 공급하기 시작하여, '14년 현재까지 공급 중이며, 고능력 씨수소를 활용한 성감별 정액의 생산 및 공급 결과는 표 2와 같다

표 2. 고능력 씨수소 성감별 동결정액 성상 및 생산 결과

구 분	성감별정액 생산		성감별정액 공급			비 고
	충진정자수	총생산량	공급기간	공급량	재 고	
HS-315	400만	2,201개	'11,09,29 -공급완료	2,201	-	정액성상 기준 활력 40%이상
HS-316	400만	6,053개	'11,09,29 -공급완료	5,563	-	기형 15%이하 총생산량
HS-319	400만	5,883개	'11,12,22 -	4,496	1,285	19,540개 생산 총공급량
HS-320	400만	5,403개	'11,09,29 -공급완료	5,403	-	18,255개 공급

2011년 구제역 피해 복구를 위해 본격적으로 성감별 동결정액을 생산하여 낙농가에 공급하기였고, 고능력 씨수소 H-315, H-316, H-319, H-320번, 등 4두로 부터 생산된 성감별 동결정액은 19,540개였으며, 이중 총 18,255개의 성감별 동결정액을 공급하였다. 현재는 빠른 기간내에 구제역 피해가 복구되었으며, 국내 수급불균형에 따른 잉여우유 발생으로 낙농가에 공급하기 위한 성감별 정액의 추가 생산은 보류상태.

[제 2협동 과제]

○ 성감별정자의 분리효율 향상기술 개발: 난황이 정자염색 등 정자의 성분리에 미치는 영향 정자의 염색과정 중 난황 및 catalase 첨가 유무가 염색후 정자의 성 분리도 및 냉동 용해 후 생존성에 (PTM) 미치는 영향을 조사하기 위하여 난황 및 catalase를 Talp 정자염색 용액에 각각 2%, 0.2 ug/ml의 농도로 첨가 또는 무첨가 후 정자를 기 확립된 방법으로 성분리하여 프로토콜에 따라 0.5 ml 스트로에 충전 후 LN<sub>2</sub> vapor 방법으로 냉동하였다. 냉동된 정액은 38°C에서 30초간 항온수조에 침지하여 용해 후 38°C에 보존하면서 30분 및 120분에 활력도 (post-thaw motility, PTM)를 현미경 하에서 조사하였다.

정자의 염색과정 중 난황 및 catalase의 첨가효과는 표 1과 같다.

표1. 정자염색 중 난황의 첨가와 catalase가 분리도 및 PTM에 미치는 영향

Stain	Catalase	Resolution	PTM	
			30 min	120 min
XY	+	6.25	41	25.8
	-	6.3	38.8	20
XY+EY	+	7	38.5	20.2
	-	6.6	41.8	23.4

4년차 결과에서 catalase첨가가 냉동용해 후 30분에 PTM에는 영향을 미치지 않았으나 120분때의 PTM은 높이는 결과를 얻었다.

염색과정 중 0.2 ug/ml catalase의 첨가없이 XY-Talp에 2%난황을 첨가했을 때 정자의 분리도는 6.6으로 무첨가구의 6.3에 비해 분리도가 저하되는 경향이 있었다. 냉동용해 후 30분 및 120분에서의 PTM은 난황 무첨가 및 첨가군에서 각각 38.8, 20 및 41.8, 23.4%로, 염색과정중 난황을 첨가한 구에서 PTM을 증가시켰다.

Catalase를 첨가 후 XY-Talp에 2%난황을 첨가했을 때 정자의 분리도는 7.0으로 무첨가구의 6.25에 비해 분리도가 저하되었다. 냉동용해 후 30분 및 120분에서의 PTM은 난황 무첨가 및 첨가군에서 각각 41, 25.8 및 38.5, 20.2%로 염색과정 중 catalase가 첨가된 상태에서 난황을 첨가한 구에서 오히려 PTM이 저하되었다. 이는 catalase와 난황이 정자염색 과정 중 상호작용이 발생하여 정자의 PTM을 저하시키는 것으로 추측된다.

[제 3협동과제]

○ 성감별된 OPU 유래 고능력 송아지생산 시 암컷송아지 생산비율 조사

OPU 유래 성감별 수정란 이식 후 생산된 산자의 성비를 조사하기 위하여 이식을 실시한 농가에서 정보를 받아서 분석을 실시하였다. 전년도에 총 115개의 수정란을 공란우에 이식하였으며 임신감정은 이식 후 90일 경에 실시하였다. 임신감정은 전 대상우를 대상으로 하여 실시하였으며 수정란 이식을 한 시술자가 직접 직장촉진법으로 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

표 1. OPU유래 수정란 이식 결과 및 분만 결과

총 이식두수	수태 (%)	분만 (%)	암컷 (%)	수컷 (%)
115	50 (43.47)	43두 (37.3)	39두 (90.6)	3두 (6.9)

OPU 유래 성감별에 의해 생산된 수정란의 이식은 젖소를 사육하고 있는 8농가를 대상으로 실시하였으며 50두(43.47%)에서 임신을 확인하였다. 또한 생산된 산자는 43두가 생산되었

으며 암컷 39두, 수컷 3두로 암컷의 성비가 90.6%로 확인 되었다. 이러한 결과는 전년도 결과와 비슷하였으며, 이러한 결과는 젖소를 당대에 개량 및 번식효율 증가, 후보축 확보에 따른 후속 경제적 효과가 크게 개선될 것으로 판단된다. 또한 연속적인 개량의 효과가 발생되므로 동일한 집단구성이 형성되고 그에 따른 사양관리 측면에서 큰 장점이 있을 것으로 판단된다.

○ 성감별된 OPU 유래 송아지의 친자확인 및 검증

성감별 OPU 유래 송아지의 친자확인을 위하여 생산된 산자 중 20두의 모근을 채취하였다. 모든 공란우의 모근은 채란기간동안 채취를 하여 분석을 하였으며 산자의 모근은 3농가에서 20두를 표본으로 하여 실시하였다. 친자감별은 경상대학교 GAST에 의뢰하여 실시하였으며, 친자검사 결과는 다음과 같다 (표 2).

표 2. 친자감별 Kit를 이용한 친자 검증 결과.

번호 Marker	마커별 비교 결과										
	BM1824	BM2113	ETH10	ETH225	ETH3	INRA23	SPS115	TGLA122	TGLA126	TGLA227	TGLA53
1	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
2	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
3	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
4	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
5	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
6	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
7	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
8	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
9	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
10	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
11	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
12	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
13	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
14	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
15	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
16	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
17	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
18	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
19	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치
20	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치	일치

친자감별을 실시한 결과 OPU유래 수정란이식으로 생산된 고능력 암송아지들의 친자감정을 실시한 결과 100% 부모와 일치함을 확인하였다.

# 제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

### 가. [1년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	체내유래 암컷수정란 생산기술 개발	공란우 선발과 정액의 선택	100	공란우는 부산우유협동조합의 조합원의 목장에서 연간 우유생산량(kg)이 우수한 공란우를 우선적으로 선정하였으며, 선정된 공란우를 2회/주 난자채취를 통해 수정란 생산효율이 우수한 공란우를 최종적으로 7두를 선정하였음. 정액은 유량, 유지율, 단백질, 체형의 유전능력이 모두 우수하며 신뢰도가 높으며 체형이 우수한 정액을 우선 선정하고 선정된 공란우와의 근친도를 고려하여 체외수정에 활용하였음.
		OPU 유래 난자채취 환경 및 실험환경 구성	100	효율적인 체내난자 채취를 위해서는 OPU 채란장에 작업 시 최대한 간편하게 하여 시간을 줄일 수 있도록 하는 것과 채취 과정에서 난자가 온도에 영향을 받지 않도록 하는 것으로 사료됨. 따라서 OPU 유래 체내난자 채취를 위해서는 초음파채취기를 이용하여 난자를 채취함으로써 기자재의 효율적인 활용이 중요하여 보정틀의 설치 시 초음파 기자재를 활용할 수 있는 공간을 확보하여 효율적인 사용이 가능하도록 하였고, 채취된 난자는 외부의 온도에 매우 민감하여 채란하는 공간의 온도의 유지를 위해서 외부 온도조절 장치(냉난방)를 설치하였음. 또한 채취된 난자의 안정적인 온도유지를 위해서 water bath를 설치하였음.
		OPU 유래 체외 수정란 생산과정에서 저혈청 및 무혈청 배지의 효율적 배양체계 구축	100	체외수정란의 생산시스템 과정 중 배양과정에서 과다한 혈청의 첨가로 수정란 이식 후 유산율과 기형율의 증가가 우려되어 이 문제점을 1차적으로 해결하고자 저혈청이 첨가된 배지를 이용하여 체외수정란의 생산효율을 확인하고 생산된 수정란의 품질을 비교조사 하였음

<p>고능력 종모우 선발기준 정립 및 효율적인 채취기술 개발과 공급</p>	<p>씨수소의 효율적인 관리 및 채취기술 개발과 공급</p>	<p>100</p>	<p>성감별 정액 생산을 위한 고능력 종모우를 선정하기 위하여 기초연구로 유량, 유지방, 유단백, 체형형질이 우수한 한국형(2두), 캐나다형(1두)종모우를 선정하였으며 정액 채취 후 성감별 액상 및 동결정액의 성상이 우수하여 OPU 유래 성감별 체외수정란 생산이 가능한 종모우 선정 가능하였고, 성감별 정액생산을 위한 원정액 채취 및 효율적인 관리 운영체계가 정립되었음</p>
<p>성감별정자의 분리효율 향상기술 개발</p>	<p>선발된 고능력 젖소의 정액을 Flow cytometer 이용하여 정자성분리 및 동결정액 제조체계 정립</p>	<p>100</p>	<p>젖소개량 사업소에서 채취된 원정액을 빠른 시간 내에 정자의 성을 분리하는 연구실로 이송하는 방법과 운송도중 정자의 손상을 최소화 할 수 있는 희석액 및 이송 온도 등을 최적화하였음. 3두의 젖소 종모우 정액을 이용하여 각 개체별 정자 성분리 가능성과 분리효율, 분리속도, 냉동 용해 후 정자의P 활력도와 성분리 과정에서의 손상정도를 확인하였음. 특히 성분리 전 각 개체에 따른 형광염색제의 적정농도를 설정하는 방법을 개발하였음. 2개체를 선발하여 각 개체에 적합한 성분리 프로토콜 개발과 성이 분리된 정액의 냉동기술을 정립하였음. 성 분리 후 냉동시킨 정액을 체외수정에 이용할 수 있도록 제공하였음</p>
<p>OPU 유래 수정란 이식효율 향상기술 개발</p>	<p>수란우의 선발 및 관리</p>	<p>100</p>	<p>OPU에 의해 생산된 수정란 이식을 성공하기 위해서 생존성이 높은 정상적인 발달능력을 가진 수정란이 자궁 내에서 정상적인 착상을 위한 수란우의 선정을 철저하게 실시함. 수란우의 선정 조건, 수정란 이식에 대한 설명과 수태율을 향상하기 위한 수란우에 사료첨가제를 급여하는 방법에 대한 농가교육을 철저하게 실시함.</p>

나. [2년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2011)	체내유래 암컷수정란 생산기술 개발	한우와 젓소에서 OPU 기법을 이용한 난자의 생산을 비교	100	OPU 유래 난자를 생산 시 한우와 젓소에서 수정란의 채란율과 난자의 등급을 통하여 비교하여 난자의 생산효율을 증대시키고 최종적으로 수정란 생산율을 향상시키기 위하여 실시
		성 감별 정자의 활용을 위하여 생사염색을 통한 생존율을 조사	100	성감별 정자를 이용한 수정란 생산에 앞서 성감별 정자의 생사 염색을 함. 성감별 정자 염색을 일반정자와 비교하여 체외수정 및 ICSI를 이용한 성감별 수정란 생산에 활용 여부를 검사
		성감별 정자의 체외수정을 통한 수정란 생산 시스템 구축을 위한 배양체계 연구	80	성감별 정자의 체외수정을 통하여 수정란 생산효율을 극대화시키고자 실시. 현재까지 실시되고 있는 수정란 생산 방법 중 가장 효율적이고 생산 효율이 높은 체외수정방법에 성감별 정자를 이용하고자 실시
		ICSI 기술을 이용한 성감별 수정란 생산 효율의 극대화 연구	100	ICSI 기술을 이용하여 성감별 수정란의 생산효율을 극대화 시키고 수정란 생산의 효율성을 위하여 실시, 차후 성감별 수정란 생산에 이용하고자 함
	공시 씨수소의 정액선정과 공급 및 성감별 동결정액 제조기술 개발 관련	고능력 씨수소 정액의 선정	100	공시 씨수소정액은 형질별로 유량, 유지율, 단백질, 체형의 유전능력이 우수하며 신뢰도가 높은 씨수소의 정액을 젓소개량사업소 보유 씨수소중 선정하여 공시함. 년차별 보유 씨수소 능력을 비교분석하여 최상의 씨수소를 주기적으로 선정하여 성감별 동결정액을 생산할 수 있도록 공시할 계획임
		성감별 동결정액 제조기술 정립을 위한 인공수정 번식 효율성 검토	100	1차년도 공시 성감별 액상 및 동결정액의 정상검사 결과 양호하였고 연계하여 관련 성감별 동결정액의 번식 효율성을 검증하고자 성감별 동결정액을 이용한 인공수정 실증 실험을 수행하였음
		고능력 씨수소의 성감별 동결정액 생산	100	젓소개량을 위한 고능력 씨수소의 정액을 이용한 인공수정 및 OPU 기술을 이용한 수정란 생산을 위하여 성감별 동결정액을 생산함
	성감별정자의 분리효율 향상기술 개발	젓소정액의 정자성분리 기술 정립	100	중모우 각 개체별 정액 내 정자의 성분리 최적 조건을 설정하는 방법은 1차년도의 연구에 의해 확립이 되었다. 그러

				나 정자의 성분리 자체가 세포분리기를 이용하기에 분리된 정자 집단이 고순도를 유지 하면서도 분리속도는 최고로 높일 수 있는, 즉 분리효율을 최적화하는 시스템의 확립이 필요하며 이에 대한 연구를 2차년도에서 중점적으로 시행하였다.
	OPU 유래 수정란 이식효율 향상기술 개발	성감별 수정란이식 후 수태율 향상방안 모색	100	수태율 향상을 위하여 가장 많이 사용되고 있는 비타민 E를 급여하였다. 사용되어진 비타민 E 사료첨가제는 케로폴을 사용하였으며 농가를 선정 투여군과 비투여군으로 분류하여 수정란 이식을 실시하였다.

다. [3년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
4차 연도 (2013)	체내유래 암컷수정란 생산기술 개발	젖소 공란우의 수정란 생산을 향상방안 연구	100	선발된 4두의 공란우에서 1025개의 OPU 유래 난자를 채란하였다. 채란된 난자는 G1~G4의 등급을 확인하였으며, 생산효율을 향상시키고자 IVF용 성감별 정액을 의뢰 및 생산하여 체외수정 방법을 정립하였다. 이를 통하여 192개의 수정란이 생산되었으며, A,B,C의 3등급으로 분류하여 생산율을 확인하였다. 이를 통하여 ICSI를 이용한 방법 보다 더 효율적으로 수정란을 생산할 수 있게 되었다.
		성감별 정자의 Acrosome 분석 및 생존율 향상방안 연구	100	성감별 정자와 일반정자의 Acrosome 손상도를 측정하여 수정란 생산효율을 올리고자 Acrosome 염색을 실시하여 차이점을 확인하고자 하였다.
		ICSI 기술을 이용한 수정란 생산	80	ICSI 기술을 이용한 수정란 생산을 위하여 도축장 유래 난자 중 체 1극체가 확인된 203개의 난자를 공시하여 73.3% (149개)의 분할율을 확인하였으며, 39개 (19.2%)의 배반포를 생산하였다.
	공시 씨수소의 정액선정과 공급 및 성감별 동결정액 제조기술 개발 관련	고능력 씨수소 선정 및 성감별 동결정액 생산	100	씨수소정액은 형질별로 유량, 유지율, 단백질, 체형 등의 유전능력이 우수하며 신뢰도가 높은 씨수소의 정액을 젖소개량사업소 보유 씨수소 중 선정 공시하여 젖소개량을 위한 고능력 씨수소의 정액을 이용한 인공수정 및 OPU기술을 이

				용한 수정란 생산을 위하여 성감별정액 생산
		성감별 동결정액의 변식 효율성 검토	100	성감별 동결정액의 변식 효율성을 검증하고자 2차년도에 실시한 성감별 동결정액을 이용한 인공수정 실증실험과 연계하여 성감별정액의 성분리 정확도 판정을 위한 수정란 성판정 및 분만 송아지 성별 조사
	성감별정자의 분리효율 향상기술 개발	catalase에 의한 정자의 생존율 향상을 위한 연구	100	원정액 및 성분리된 정액에 catalase를 농도별로 첨가 후 정자의 생존성을 시간별로 조사하였다.
	OPU 유래 수정란 이식효율 향상기술 개발	성감별 수정란의 이식 및 수태율 조사	100	2012년 12월부터 2013년 5월까지 총 95두에 대한 수정란 이식을 실시하였으며 임신감정 대상우 46두에 대한 감정 결과 19두에서 수태가 확인되었다. 수태율은 41.3%의 결과를 확인하였다.

라. [4년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
4차 연도 (2013)	체내유래 암컷수정란 생산기술 개발	성감별된 OPU 유래 고능력 송아지의 생존성, 증체량 평가	100	총 95두에 대한 수정란 이식을 실시하였으며 임신감정 결과 42두(43.75%)에서 수태가 확인 되었으며 36두가 분만되었다. 성비는 수컷 3두, 암컷 33두로 암컷의 성비가 91.6%로 확인되었다. 2013년 12월부터 수정란 이식을 실시하고 있으며 4월 현재 40두에 이식을 완료하였다.
		성감별된 OPU 유래 송아지의 친자확인 및 검증	100	분만된 36두 중 20두를 대상으로 친자감별을 실시한 결과 100% 친자임을 확인하였다. 친자감별은 대상우의 모근을 채취하여 DNA를 추출하였으며 11종의 MS marker (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, ETH3, ETH225, BM1824, INRA23)와 1쌍의 sexing marker를 Multiplex PCR이용하여 분석하였다.
		성감별 OPU유래 수정란이식에 의한 개량방법의 경제성분석 및 산업화 적용방법 정립	100	국내소비에 요구되는 2.1백만톤을 생산하기 위해 약 206천두의 착유두수가 필요하나, 이와 같이 개량된 약 161천두로 그만큼의 원유생산이 가능하기 때문에 약 45천두의 사육두수를 감소시켜 연간 약 2,430억원의 사육비용이 절감되므로 그만큼 생산원가를 절감 및 부가가치를 얻을 수 있다.



	공시 씨수소의 정액선정과 공급 및 성감별 동결정액 제조기술 개발 관련	고능력 씨수소 선정 및 성감별 동결정액 생산	100	씨수소정액은 형질별로 유량, 유지율, 단백질, 체형 등의 유전능력이 우수하며 신뢰도가 높은 씨수소의 정액을 젖소개량사업소 보유 씨수소 중 선정 공시하여 젖소개량을 위한 고능력 씨수소의 정액을 이용한 인공수정 및 OPU기술을 이용한 수정란 생산을 위하여 성감별 정액 생산
		고능력 씨수소 성감별정액 생산 및 공급	80	우수한 씨수소 성감별 동결정액을 생산하여 젖소개량에 활용할 수 있도록 인공수정용 성감별 동결정액을 낙농가에 공급
	성감별정자의 분리효율 향상기술 개발	정자 성분리 단계별 catalase에 의한 정자의 생존율 향상을 위한 연구	100	Catalase가 정자의 성분리 단계별 생존성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 catalase를 Talp 정자염색용액, catch fluid, 냉동희석제 AB에 첨가 후 냉동하고 용해 후 활력도를 조사하였다.
	OPU 유래 수정란 이식효율 향상기술 개발	성감별 수정란의 이식 및 수태율 조사	100	총 95두에 성감별 암컷 젖소 수정란이식을 실시하였으며 이식 후 약 2-3개월에 직장촉진에 의한 임신감정을 실시한 결과 42두(43.75%)에서 수태가 확인되었다. 정상 분만한 송아지들의 성비를 조사한 결과 암컷의 생산비율은 33두로 91.6%로 확인하였다. 성감별된 정자의 성비가 약 92% 정도이기 때문에 성감별 수정란의 이식으로 생산할 수 있는 송아지도 약 92% 정도일 것이다. 이러한 결과는 성감별 정자를 이용한 수정란의 생산 및 이식이 궁극적으로 젖소를 당대에 개량을 완성할 수 있을 뿐만 아니라 고능력 후보축의 확보에 따른 경제적 효과가 크게 개선될 것으로 판단된다.

마. [5년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
5차 연도 (2014)	체내유래 암컷수정란 생산기술 개발	OPU유래 성감별 고능력 젖소 수정란이식 산업화를 위한 문제점 개선	80	성감별 정자에 따른 수정란 생산 효율을 조사한 결과 수정란 생산율을 조사하고 FITC/PI staining을 통하여 Unsorted sperm과 Sorted sperm의 2그룹 간의 Acrosome의 손상도를 확인하였으며 Partially damage(21.63±2.57, 36.27±1.97)와 Damage (26.27±1.97, 41.43±1.69)는 2

				<p>그룹간의 통계적 유의 차이는 없었다. 그러나 Acrosome의 정상성은 두 그룹간 (52.10±4.53, 22.30±0.53)의 통계적인 차이를 확인하였으며, 이러한 차이는 두 그룹간의 수정률의 결과로 나타난 것으로 판단된다.</p>
	성감별 수정란을 이식한 후 태어난 산자의 비율과 성비를 확인하고자 함	100		<p>전년도 수정란 이식은 8농가를 대상으로 115두를 이식하였다. 수태율은 50두(43.47%)로 확인되었으며, 성감별 수정란 유래 산자의 성비는 분만두수 43두에 암컷 39두(90.6%), 수컷 3두(6.9%)로 확인 되었다. 이는 정상적인 성비로 판단되며 전년도 수태율 및 산자생산 결과와 비슷하였다.</p>
공시 씨수소의 정액선정과 공급 및 성감별 동결정액 제조기술 개발 관련	고능력 씨수소 선정 및 성감별 동결정액 생산	100		<p>우리나라 고유의 환경과 사육조건에서 최고의 능력을 발휘 할 수 있는 씨수소 정액은 생산(유량, 유지량)능력, 체형 등의 유전능력이 우수하며 신뢰도가 높은 젖소개량사업소 보유 씨수소 중 선정 공시하여 젖소개량을 위한 고능력 씨수소의 정액을 이용한 성감별 정액 생산 및 수정란 생산에 이용</p>
	고능력 씨수소 성감별정액 생산 및 공급	80		<p>우수한 종모우를 선발하여 인공수정용 성감별 동결정액을 낙농가에 공급하였으나 현재 국내 우유생산량 증가로 성감별 정액 생산 중단</p>
성감별정자의 분리효율 향상기술 개발	난황이 정자 성분리에 미치는 영향 분석	100		<p>정자염색용액에 난황을 첨가 후 성 분리도 및 냉동융해 후 정자의 생존율을 조사하였다. 또한 전년도 연구에서 밝혀진 catalase 첨가효과와 난황의 첨가에 따른 관계를 규명하였음.</p>
OPU 유래 수정란 이식효율 향상기술 개발	성감별된 OPU 유래 고능력 송아지생산 시 암컷송아지 생산 비율 조사	80		<p>OPU 유래 성감별에 의해 생산된 수정란이식을 통하여 생산된 산자의 암수비율을 조사한 결과 성감별 수정란 유래 산자의 성비는 분만두수 43두에 암컷 39두(90.6%), 수컷 3두(6.9%)로 확인 되었으며 이는 정상적인 성비로 판단되며 전년도 수태율 및 산자생산 결과와 비슷하였다</p>
	성감별된 OPU 유래 송아지의 친자확인 및 검증	100		<p>친자감별은 3농가에서 20두를 표본으로 하여 실시친자감별을 실시한 결과 OPU 유래 수정란이식으로 생산된 고능력 암송아지들의 친자감정을 실시한 결과 100% 부모와 일치함</p>

# 제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 1절. 연구개발의 성과

### 1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Effect of the artificial shrinkage on the development of the vitrified bovine embryos	A-Na Ha	Il-Keun Kong	Su-Jin Cho, Gautam-Kumar Deb, Jae-Il Bang, Tae-Hyeon Kwon, Byeong-Hyun Choi	한국수정란 이식학회	25(1)	국내	비SCI
2010	Effect of OPU (Ovum Pick-Up) Duration on the Rate of Collected Ova and In Vitro Produced Blastocyst Formation	Jong-In Jin	Il-Keun Kong	Tae-Hyeon Kwon, Byeong-Hyun Choi, Sung-Soo Kim, Hyun-Tae Jo	한국수정란 이식학회	25(1)	국내	비SCI
2011	초기임신우의 공란우 활용이 초음파유도 난자채취 및 수정란생산에 미치는 영향	진종인	공일근	권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 방재일, 김삼철, 조규완, 이정규	한국수정란 이식학회	26.(1)	국내	비SCI
2011	한우와 젖소 대리모가 OPU 유래 한우 송아지의 체중과 임신 기간에 미치는 영향	최병현	공일근	진종인, 권태현, 김성수, 조현태	한국수정란 이식학회	26.(1)	국내	비SCI
2013	Development of New Vitrification Method for Preimplantation Mouse Embryo	A-Na Ha	Il-Keun Kong	Md. Fakruzzaman, Kyeong-Lim Lee, Erdan Wang, Jae-Ik Lee, Chan-Sik Min	한국수정란 이식학회	28(2)	국내	비SCI
2014	OPU 채란계절이 한우의 난자 품질 및 발달 능력에 미치는	김성수	공일근	최병현, 조현태, 진종인,	한국수정란 이식학회	29(3)	국내	비SCI

	영향			하아나, 민찬식, 조규완				
2011	9-cis retinoic acid improves developmental competence and embryo quality during in vitro maturation of bovine oocytes through the inhibition of oocyte TNF- gene expression	G.K. Deb	I.K. Kong	S.R. Dey J.I. Bang S.J. Cho H.C. Pack J.G. Lee	JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE	89(9)	국외	SCI
2011	Improved blastocyst development of single cow OPU-derived presumptive zygotes by group culture with agarose-embedded helper embryos	Gautam Kumar Deb	Il Keun Kong	Gautam K Deb, Jong I Jin, Tae H Kwon, Byung H Choi, Jae I Bang, Shukla R Dey, In R Cho and Il Keun Kong	Reproductive Biology and Endocrinology	9	국외	SCI
2012	Coculturing denuded oocytes during the in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes exerts a synergistic effect on embryo development	S. R. Dey	I. K. Kong	G. K. Deb; A. Na. Ha; J. I. Bang; K. L. Lee	Theriogenology	77	국외	SCI
2012	9-cis Retinoic acid inhibits cumulus cell apoptosis during the maturation of bovine cumulus-oocyte-complexes	G. K. Deb	I. K. Kong	S. R. Dey, J. I. Bang, J. G. Lee	Journal of animal science	90	국외	SCI
2013	Coculturing cumulus oocyte complexes with denuded oocytes alters zona pellucida ultrastructure in in vitro matured bovine oocytes	Byung-Hyun Choi	Il-Keun Kong	Jae-Il Bang, Jong-In Jin, Seong-Su Kim, Hyun-Tae Jo, Gautam Kumar Deb, Nasser Ghanem,	Theriogenology	80(9)	국외	SCI

				Kyu-Woan Cho				
2013	Mitochondrial content and gene expression profiles in oocyte-derived embryos of cattle selected on the basis of brilliant cresyl blue staining	Md. Fakruzzaman	Il-Keun Kong	Jae-Il Bang, Kyeong-Lim Lee, Seong-Su Kim, A-Na Ha, Nasser Ghanem, Chang-Hee Han, Kyu-Woan Cho, Kenneth L. White	Animal Reproduction Science	142(1)	국외	SCI
2014	Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and in vitro developmental competence	Hyun-Tae Jo	Il-Keun Kong	Jae-Il Bang, Seong-Su Kim, Byung-Hyun Choi, Jong-In Jin, Heyng-Lyool Kim, In-Suk Jung, Tae-Kwang Suh, Nasser Ghanem, Zhongde Wang	Theriogenology	81(5)	국외	SCI
2014	Effects of Flunixin Meglumine and Prostaglandin F2a Treatments on the Development and Quality of Bovine Embryos In vitro	S-S Kim	I-K Kong	J-I Bang; M Fakruzzaman; K-L Lee, D-H Ko; N Ghanem; Z Wang	Reproduction in Domestic animals	49	국외	SCI

## 2. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	스트로우 내 벽에 배아를 부착하는 부착성 스트로우 유리화 동결법	공일근, 진종인, 방재일, 최병현, 하아나, 조현대	대한민국	10-2012-0 125289	2015	스트로우 내벽에 배아를 부착하는 부착성 스트로우 유리화 동결법	공일근 진종인 방재일 최병현 하아나 조현대	대한민국	10-150929 5

## 2절. 성과 활용 계획

- OPU 유래 성감별 젖소 수정란 생산체계 확립
  - 성감별된 정자를 이용한 고능력 젖소 암컷 수정란 생산과 이식으로 젖소 개량효율 극대화
  - 고비용/저효율의 기존 과배란처리에서 벗어나 저비용으로 현장 젖소사육농가 보급 가능
  - 고능력 젖소 수정란의 대량생산의 효율 극대화 및 고능력 젖소의 대량생산 체계 구축
  - 잉여 수정란의 동결보존으로 고능력 젖소의 유전자원 보존 및 확대가능
  - OPU유래 난자의 배양기술 개발로 OPU 유래 수정란 생산 및 이식효율 극대화
  - 향후 각종 동물의 복제 및 형질전환 등의 각종 BT산업의 기반기술로 적용 가능
  - OPU유래 고능력 젖소 생산기지 및 수정란 공급기지 구축 가능
  - 씨수소, 씨암소 및 분만 송아지 검증체계 구축을 통한 농가 신뢰도 향상
- 고능력 암소 선정 및 우수 젖소정액 선택
  - 종래의 수소 위주의 개량에서 벗어나 우수한 암소를 선발하여 선발강도를 극대화 추구
  - 공란우의 효율적인 선정으로 수정란생산 효율의 극대화
  - 씨수소의 효율적인 활용으로 성감별 정액 생산 및 정액공급의 다양성과 효율 향상
  - 씨수소의 선발기준정립으로 정액의 안정성, 신뢰도 향상
  - 값비싼 챔피언 정액의 효율적인 활용을 통한 생산비 절감
  - 고능력 젖소 대량 공급체계 구축 가능
- 공급되는 젖소수정란의 검증체계 확립
  - 수정란의 인식체계를 확립하여 생산되는 모든 송아지의 등록 수월성 재고
  - 새로운 개체인식체계의 구축으로 전 밀소의 인식체계 확립
  - 생산된 송아지의 13종의 MS markers로 친자검증을 통하여 수정란의 신뢰성 재고
- 수정란이식 및 고능력 젖소 송아지 생산체계 구축

- 적합한 이식시기 규명으로 수태율 향상
- 수태율, 분만율 향상으로 OPU유래 암컷수정란 생산효과 극대화
- 고능력 젖소 송아지 생산기지 구축
- 차후 고능력 씨암소의 선발강도 극대화
- FTA 대비 고부가가치의 축산경영으로 축산농가의 경쟁력 제고
- 암컷 수정란이식에 의한 원하는 성의 산자생산으로 경영합리화 추구

○ 성감별 동결정액 생산 및 공급체계 구축

- 성감별정액의 생산을 통한 정액공급의 다양성과 이용효율 향상
- 구체역과 같은 질병발생에 따른 국가적 피해 복구를 위해 성감별 정액 공급
- 생산(유량, 유지량) 능력, 체형 등을 고려 우수한 고능력 씨수소 선발기준 정립

○ 성감별정액의 생산 및 수정란 생산 시스템 구축

- 씨수소의 유량, 유지율, 단백질, 체형 등의 유전능력이 모두 상위 50%이상이고 신뢰도가 높으며 체형이 우수한 젖소 종모우 정액을 선택
- 젖소개량사업소에서 선발한 고능력 종모우의 신선정액을 수급 받아 각 종모우에 적합한 효율적인 정자 성분리 프로토콜 확립 후 성감별 정액을 생산 및 농가 보급
- OPU 난자와 성감별 정액을 이용한 젖소수정란 생산 시스템 구축
- 농가에 성감별 정액 및 수정란을 생산 및 보급하여 농가경영의 효율성 증대
- 성감별 정액을 후대검정 사업에 적용하여 종모우 선발 효율성 증대

## 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- OPU 기술을 이용하여 도너소로부터 평균 8~10개의 난자를 채란하고 수정가능한 수정란을 2개 생산 (진종인 등, 2001년)
- 도축장유래 난자와 OPU 유래 체내 난자를 이용하여 소와 버팔로의 체외수정란 발달의 차이의 비교 연구 (G. Neglia et al., 2003년)
- 여러 세대에서 OPU 기술을 이용하여 소의 체외생산 (van Wagtendonk-de Leeuw A.M, 2005년).
- OPU기술과 sexed sperm을 이용하여 버팔로의 체외수정란 생산에 관한 연구 (Liang XW et al., 2008년)



## 제 7장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없으며 모두 기존 장비로 연구하였음

## 제 8장 연구실 안전관리 이행실적

### 나. 실험실 안전점검 실시

「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 의거 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단을 실시

#### 1) 일상점검

연구개발활동 전 연구 개발활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검

- 기간: 년 중
- 실시자: 연구 활동 종사자
- 내용: 실험실별 특성에 맞는 점검표 작성 후 점검 실시

#### 2) 정기점검

실험실 안전점검 체계에 따라 매년 정기점검 실시

- 기간: 매월 첫 주 수요일
- 실시자: 연구실 책임자 및 담당자
- 내용: 실험실 안전점검 프로그램을 사용하여 분야별 항목 점검

#### 3) 특별안전점검

폭발사고, 화재사고 등 연구 활동 종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 연구실 책임자의 지시에 의해 실시

- 기간: 년중 필요시
- 실시자: 연구실 책임자
- 내용: 위험요인별 점검

#### 4) 정밀안전진단

정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립

- 기간: 2014년 11월
- 실시자: 외부전문 진단기관
- 내용: 정기점검 후 선정된 중점 점검항목 및 연안법에 규정된 점검항목 진단

## 제 9장 참고문헌

1. van Wagendonk-de Leeuw A.M. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology* 65: 914-25.
2. Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D and Seamark RF. 1994. Gonadotrophin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. *Theriogenology* 42: 1227-36.
3. Barker JSF, Tan SG, Selvaraj OS and Mukherjee TK. 1997. Genetic variation within and relationships among populations of Asian water buffalo (*Bubalus bualis*). *Anim. Genet.* 28: 1-13.
4. Bjornstad G, Nilsen NO and Roed KH. 2003. Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses? *Anim. Genet.* 34: 55-8.
5. Blott SC, Williams JL and Haley CS. 1999. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82: 613-9.
6. Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A and de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43: 677-87.
7. Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A and de Kruif A. 1997. Effect of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47: 1221-36.
8. Boni R, Roviello S and Zicarelli L. 1996. Repeated ovum pick up in Italian mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46: 899-909.
9. Bruck I, Synnestvedt B and Greve T. 1997. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology* 47: 1157-67.
10. Callesen H, Greve T and Christensen F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 27: 217.
11. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN and Caskey CT. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 11141-56.
12. Chrysochou P, Chryssochoidis G and Kehagia O. 2009. Traceability information carriers. The technology backgrounds and consumers' perceptions of the technological solutions. *Appetite* 53: 322-31.
13. DeMayo FJ, Rawlins RG and Dokelow WR, 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 and Squires TJ. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* 49: 1077-82.
15. Garcia A and Salaheddine M. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development.

Theriogenology 50: 575–85.

16. Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R and Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55(6): 1341–57.
17. Guyader Joly C, Ponchon S, Thuard JM, Durand M, Nibart M, Marquant–Le Guienne B and Humblot P. 1997. Effect of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and *in vitro* embryo production in pregnant heifers. *Theriogenology* 47: 157.
18. Neglia G, Gasparini B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R, Campanile G and Antonio Presicce G. 2003. Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59: 1123 - 30.
19. Kasai M, Iritani A and Chang MC. 1979. Fertilization *in vitro* of rat ovarian oocytes after freezing and thawing. *Biol. Reprod.* 21: 839 - 44.
20. Tervit HR, McMillan WH, McGowan LT, Smith JF, Hall DRH and Donnison MJ. 1997. Effect of juvenile calf age on follicular dynamics and *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 47: 300.
21. Todorow SJ, Siebzehruebl ER, Koch R, Wildt L and 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 - 11.
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 membrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod.* 55: 161–8.
24. Tubman LM, Brink Z, Suh TK and Seidel GE Jr. 2004. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J. Anim. Sci.* 82(4): 1029–36.
25. Hochi S, Fujimoto T and Oguri N. 1995. Viability of immature horse oocytes cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 43: 236.
26. Irvine B, Armstrong DT, Earl C, McLean D and Seamark RF. 1993. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 39: 237.
27. Liang XW, Lu YQ, Chen MT, Zhang XF, Lu SS, Zhang M, Pang CY, Huang FX and Lu KH. 2008. *In vitro* embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. *Theriogenology* 69(7): 822–6.
28. Lane M and Gardner DK. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 342–7.
29. Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54: 1059–69.
30. Quinn P, Kerin J, Stone B and Wilson L. 1986. successful cryopreservation of human oocytes In; 42<sup>nd</sup> Ann Mtg Am Fertil Cos and 18<sup>th</sup> Ann Mtg Candian Fertil Androl Soc. pp. 72 (Abstract).

31. Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 313: 573-5.
32. Rubinsky B, Arav A and Devries AL. 1992. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes. *Cryobiology* 29: 69 - 79.
33. Schefflander K, Peli J, Schmoll F and Brem G. 1994. Effects of cryopreservation and carbohydrates on freezing of matured and unmaturred bovine oocytes. *Theriogenology* 23: 909-15.
34. Schenk JL, Suh TK, Cran DG and Seidel GE Jr. 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52(8): 1375-91.
35. Seidel GE Jr. 1999. Sexing mammalian spermatozoa and embryos-state of the art. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54: 477-87.
36. Seidel GE Jr. 2014. Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 8 (Suppl 1): 160-4.
37. Suh TK, Schenk JL and Seidel GE Jr. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology* 64(5): 1035-48.
38. Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science* 178: 411-4.
39. Sathanathan AH, Ng SC, Trounson AC, Bongso A, Ratnam SS and Ho J. 1988. The effect of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res.* 21: 385 - 401.
40. 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: 191-5.
41. Vincent C, Garnier V, Heyman Y and Renard JP. 1989. Solvent effects on cytoskeletal organization and *in-vivo* survival after freezing of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 87, 809 - 20.
42. 박희성, 이지삼, 진동인, 박준규, 홍승표, 이명열, 정장용. 2001. 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.* 16: 193-201.
43. 박성재, 양보석, 임기순, 성환후, 양병철, 장원경, 정일정, 정기화, 심보웅, 양별철. 2000, Effect of Ovum Pick-up Frequency on *In Vitro* Production of Embryos in Hanwoo Cattle. *Korean J. Emb. Trans.* 15: 1-8.
44. 박성재, 류일선, 이동원, 연성흙, 서국현, 허태영, 백광수, 안병석, 손동수, 백광수. 2001, Comparison of the Ultrasound-Guided vs. Hand-Operated Vacuum Pump Transvaginal Ovum Pick-up in Holstein. *Korean J. Emb. Trans.* 16: 145-52.
45. 손우진, 강태영, 조성근, 심보웅, 최민철, 최상용, 박충생, 이효중. 1998. 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. 13: 107-15.

46. 이병천. 1998. 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. 13: 77-86.
47. 윤기영, 이병천, 황우석, 김현일, 노상호, 이강남. 1997, Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle. 대한수의학회지. 37: 917-24.
48. 이병천, 윤기영, 김현일, 노상호, 이강남, 황우석. 1997. 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. 37: 917-9.
49. 진종인, 홍승표, 정장용, 이지삼, 박희성. 2000. Study on Ovum Pick-up (OPU) with Finger-Sensibility using Oocyte Recovery in Holstein Heifers. Korean J. Emb. Trans. 15: 279-86.
50. 진종인, 권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 공일근. 2010. Effect of OPU (Ovum Pick-Up) Duration on the Rate of Collected Ova and *In Vitro* Produced Blastocyst Formation. Korean J. Emb. Trans. 25: 15-20.
51. 진종인, 권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 방재일, 김삼철, 조규완, 이정규, 공일근. 2011. Effect of Early Pregnant Heifer as Donor on the Ovum Pick-Up Derived Oocyte Aspiration and Embryo Production. Korean J. Emb. Trans. 26: 19-25.
52. 최민철, 조성근, 강태영, 박준규, 손우진, 이효중. 1997. 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. 12: 211-8.
53. 황우석, 신태영, 노상호, 박종임, 이병천. 1998. 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. 16: 145-52.

## 본문작성요령

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.
- 차. <첨부>자료는 협약 시 연구계획서 별첨으로 제출한 특허, 논문 및 시장분석보고서를 기준으로 연구 완료 후 변동 내용을 작성하시기 바랍니다.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 감별 정자와 OPU기술을 이용한 고능력 젖소 개량기술 개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 감별 정자와 OPU기술을 이용한 고능력 젖소 개량기술 개발의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.