

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001343-01

생명공학기법을 이용한 한우 브랜드 차별화 모델 개발
(Development of Differential Brand Model Using Bio-technique
in Korea Native Cattle (Hanwoo))

명품한우컨설팅

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생명공학기법을 이용한 한우 브랜드 차별화 모델 개발에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 04 월 09 일

주관연구기관명 : 명품한우컨설팅

주관연구책임자 : 박 정 준

세부연구책임자 : 박 정 준

연 구 원 : 이 창 우

연 구 원 : 윤 필 상

연 구 원 : 유 한 준

연 구 원 : 송 정 임

연 구 원 : 김 기 원

세부연구기관명 : 강원대학교

세부연구책임자 : 박 춘 근

연 구 원 : 이 용 승

연 구 원 : 이 지 은

연 구 원 : 이 경 진

연 구 원 : 김 윤 정

요 약 문

I. 제 목

생명공학기법을 이용한 한우 브랜드 차별화 모델 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 한미 FTA체결 및 추진확대에 따른 수입쇠고기와의 경쟁력확보와 웰빙시대를 맞이하여 소비자의 요구에 부응하는 품질의 향상과 차별화 전략이 요구되고 있다. 또한 농축산물의 부가가치화와 맛물린 소비자의 식품 안전성에 대한 관심이 고조되면서 농축산물의 브랜드화에 대한 관심이 증가하고 있는 실정이다. 따라서 우리나라도 추후 한우 지방자치제 브랜드 개발과 사육농가 소득증대 및 쇠고기 시장보호를 위하여 국제 경쟁력을 갖춘 고품질 한우의 대량 생산이 시급한 실정이다. 또한 브랜드의 차별화와 경쟁력을 갖는데 중요한 요소인 “고유한 그리고 차별화된 맛”을 지니는 한우 품종 개발은 한우사육 농가의 소득 및 수입육에 대한 한우육의 국제경쟁력을 획기적으로 개선할 수 있는 계기가 될 것으로 생각된다. 한우에서 차별화된 브랜드 육성을 위해 첫째로 선행되어야 할 것은 품질차별화를 이룰 수 있는 최상의 육질능력을 갖춘 종자, 즉 종모우의 확보 및 생산이다. 현재, 국가단위 종모우가 제1종 법정 전염병 즉, 브루셀라, 구제역, 요네 등 많은 위험요소에 노출되어 있어 종모우의 정액 수급이 원활하지 못하고, 각 지방자치제에 공급되는 우수 종모우의 한정된 정액량으로 인하여 한우농가에서 요구하는 만큼의 수요를 충족시키기에는 한계가 있어 각 지역 브랜드 차별화에 많은 지장을 초래하고 있다. 또한 종모우를 선발하기 위한 당대 및 후대검정 시, 검정축 생산을 위한 우량 암소의 두수확보, 검정축 생산에 시간이 오래 소요된다는 점 등의 어려움으로 인해 많은 비용과 노력이 소요되며 선발기간이 길어 세대간 격을 늘림으로써 연간 개량량을 감소시킨다는 문제점을 안고 있다. 이러한 문제저점은 종모우 두수의 제한으로 근교계수의 증가에 대한 우려가 항상 존재하고 있고, 동형접합체의 증가로 인한 근친피해가 우려된다.

한편으로 현재 국가 차원에서의 수정란 이식 기술은 연구수준에서 머물고 있으며, 그동안 수정란이식의 실용화를 위한 몇몇 연구사업이 수행되었으나 농가에 실용화되어 보급되지 못하고 실패한 것으로 지적되면서 농가 경쟁력 증대를 위한 고능력우의 대량 생산과 효율적인 수정란이식 모델의 개발이 절실히 요구되고 있다.

그러므로, 본 연구는 지역 브랜드 차별화의 일환으로 지방자치제 종모우 생산에 있어 기준점이 되고자 수행되었으며, 연구수행 방법으로 저비용의 유전능력이 우수한 고능력 수정란을 생명공학 기법과 수정란 이식 기술 등에 의해 고능력 한우 집단을 형성하고, 나아가 우수한 종모우를 선발 육종함으로써 농가에서 한우의 우수 유전자원을 확보하고 보존시킬

뿐만 아니라 고급육 생산 체계를 갖출 수 있도록 진행되었고, 침체된 한우 사육농가의 소득 증대와 수입육에 대한 차별화된 한우의 경쟁력을 확보하기 위하여 브랜드 차별화 모델과 기술을 개발하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 우수 종모우 선발모델 개발
- 종모우 정액생산 및 동결보존 시스템 구축
- 종모우 동결정액의 농가 보급
- 우량 공란우 선발기준 체계 확립
- 공란우의 과배란 처리 기술의 최적화 및 수정란 채란
- 체내 우수 수정란 생산과 수정란 이식 기술의 보급
- 수정란이식에 의한 산자생산 및 수태율 증진 기술개발
- FACs를 활용한 한우 정자의 성 분리기술 개발과 수정란 생산
- 자궁 내 환경의 변화에 의한 수태율과 수정란이식 적기 결정에 영향을 미치는 요인 분석
- 수태율에 영향을 미치는 자궁 내 물질의 분석과 이를 통한 자궁환경 조절 기술 개발
- 2D를 이용한 화학적 분석방법을 통한 정상물질의 구성 성분 및 기능 분석

IV. 연구개발결과

- 유전능력평가에 의한 형질별 우량공란우 선정
- 선발지수를 활용한 한우암소의 계통조성 및 분류
- 유전자 타입별 종모우 계통 조성 확립
- 종모우 정액생산 및 동결보존 시스템 구축
- 종모우의 신선 정액 및 동결정액의 성상 검사
- 농가에 사양관리 기술 및 종모우 동결정액의 보급
- 적정 FSH 농도에 의한 공란우의 과배란 처리 및 DEC 방법에 의한 수정란 채란 기술 개발
- 종모우 정액의 인공수정 및 수정란이식에 의한 송아지 생산과 계통별 능력 검정
- FACs에 의한 한우 정자의 성 분리 및 성 분리된 정자에 의한 수정란 생산
- 발정기간 중 암소의 자궁 내 점액 및 혈중 호르몬의 변화 분석
- 2-DE에 의한 정액 중 정상물질의 구성 성분 및 수정란 착상과 정자 수송에 미치는 영향 분석
- 암소 자궁 내 정상 및 INF-t 물질의 주입이 혈중 progesterone의 농도에 미치는 영향
- INF-t에 의한 암소 자궁 세포 내 COX-2, PGE2, PFG2a의 분비양상 분석

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 우량 종모우 선발 체계의 단순화 및 종모우 선발 기간 단축
- 지역 브랜드 차별화 전략을 위한 종모우 선발 기준 제시
- 수정란 이식기술을 이용한 농가 핵군집단 조성기술 체계 보급
- 수정란 채란 비용절감으로 채란 기술 보급 및 활용화 확립

- 수정란 이식 시의 수태율 증진
- 생명공학기법을 이용한 품종개량 및 대량생산
- 한우 고급육 생산품질 균일화로 농가 고소득 창출
- 농가단위의 우수 한우유전자원 확보 및 경쟁력 증대에 기여
- 고능력 한우의 개량 체계 확립으로 한우사육 농가의 경쟁력 강화 및 산업화 가능

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. The present conditon in domestic and foreign countries

Chapter 3. Materials, methods and results

Chapter 4. Accomplishment and contribution to related subjects

Chapter 5. Achievement and plan to contribution

Chapter 6. Information obtained from foreign countries during research

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 1절. 연구의 배경
- 2절. 연구의 필요성
- 3절. 연구개발의 목표 및 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 연구개발 기술의 국내외 현황
2. 생산 및 시장현황
3. 3P 분석
4. 관련기술에 대한 황성지역의 선행연구결과
5. 본 과제관련 최근 연구 논문

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1세부과제명 : 고능력 한우 수정란 이식 및 실용화 모델의 개발

- 우량 공란우 선발기준 체계 확립
- 우수 종모우 선발모델 개발
- 종모우 정액생산 및 동결보존 시스템 구축
- 종모우 동결정액의 농가 보급
- 발정동기화 기술의 최적화
- 다배란 유기에 의한 수정란 회수기술 개발
- 체내 우수 수정란 생산과 수정란 이식 기술보급
- 체내 우수 수정란이식에 의한 산자생산 및 수태율 증진 기술개발

제 2세부과제명: 한우 우수유전자원의 보급을 위한 성 분리 및 번식생리 조절 기술 개발

- FACs를 활용한 한우 정자의 선택적 성 분리기술 개발
- 실용적인 정자 성 분리 기술 및 성판별을 통한 선택적 수정란 생산
- 자궁 내 환경의 변화에 의한 수태율과 수정란이식 적기 결정에 영향을 미치는 요인 분석
- 수태율에 영향을 미치는 자궁 내 물질의 분석과 이를 통한 자궁환경 조절 기술 개발
- 화학적 분석방법을 통한 정장물질의 구성 성분 및 기능 분석

○ 실질적인 정장물질의 주입을 통한 방법이 수태율에 미치는 영향 조사

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절. 연구의 배경

최근 한미 FTA체결 및 추진확대에 따른 수입쇠고기와의 경쟁력확보와 웰빙시대를 맞이하여 소비자의 요구에 부응하는 품질의 향상과 차별화 전략이 요구되고 있다. 또한 농축산물의 부가가치화와 맞물린 소비자의 식품 안전성에 대한 관심이 고조되면서 농축산물의 브랜드화에 대한 관심이 증가하고 있는 실정이다. 이러한 상황에서 한우의 경우도 예외 없이 고급육에 대한 수요의 증가와 함께 우리 국민의 기호를 충족시킬 뿐만 아니라 외국산 쇠고기와의 경쟁력을 갖출 수 있는 다양한 유전적 특성을 지닌 한우의 품종개발과 브랜드화가 필요하다. 즉, 우리 한우에 주어진 과제는 고기의 품질향상과 고부가가치화에 의한 경쟁력 확보와 비싸더라도 품질이 좋은 안전한 먹거리로서의 변신인 것이다. 차별화된 브랜드만이 성공할 수 있는 시대의 요구에 부합해야만 하는 것이다. 한우에서 차별화된 브랜드 육성을 위해 첫째로 선행되어야 할 것은 품질차별화를 이룰 수 있는 최상의 육질능력을 갖춘 종자, 즉 종모우의 확보 및 생산이다. 이러한 현상은 현재 지자체에서 불고 있는 한우 종모우생산 바람과도 일맥상통하는 것으로 차별화된 한우브랜드 육성에서 비롯된 자연스러운 현상으로 보아야 한다. 이와 같은 브랜드의 한 예로써 가까운 일본의 경우에는 각각의 현(도시)마다 개량사업소가 존재하며, 이 개량사업소에서는 각 지역 특성에 맞는 종모우를 선발하고 개량함으로써 육질의 차별화를 이루어 농가 소득을 증대시켰다. 비록 한우개량사업소에서 보유하고 있는 종모우가 우수하다 하여도 요구하는 만큼 수요를 충족시키기에는 한계가 있다.

따라서 우리나라도 추후 한우 지자체 종모우 개발과 사육농가 소득증대 및 쇠고기 시장보호를 위하여 국제 경쟁력을 갖춘 고품질 한우의 대량 생산이 시급한 실정이다. 또한 브랜드의 차별화와 경쟁력을 갖는데 중요한 요소인 “고유한 그리고 차별화된 맛”을 지니는 한우 품종 개발은 한우사육 농가의 소득 및 수입육에 대한 한우육의 국제경쟁력을 획기적으로 개선할 수 있는 계기가 될 것으로 생각된다.

2 절. 연구의 필요성

우리나라의 현행 종모우 선발 체계는 당대검정과 후대검정에 의하여 유전적으로 우수한 종모우를 선발하게 되어 있다. 당대검정은 선발된 보증씨수소와 개량농가에서 보유하고 있는 우량 암소간의 계획교배로 생산된 수송아지에 대해 생후 7개월에서 12개월까지 6개월간 검정을 실시하며 육종가를 추정하게 된다. 추정된 육종가로부터 후보종모우를 선발하여 후대검정을

실시하게 되는데, 후대검정은 후보종모우와 개량농가의 가임 암소들로부터 생산되어 생후 6개월 이내에 거세된 수소만을 대상으로 생후 7개월에서 24개월까지 18개월간 실시하여 검정을 실시하게 되며, 수집된 검정축의 성적을 기준으로 보증종모우를 선발하게 된다. 하지만 종모우를 선발하기 위한 당대 및 후대검정 시, 검정축 생산을 위한 우량 암소의 두수확보, 검정축 생산에 시간이 오래 소요된다는 점 등의 어려움으로 인해 많은 비용과 노력이 소요되며 선발 기간이 길어 세대간격을 늘림으로써 연간 개량량을 감소시킨다는 문제점을 안고 있다. 이러한 문제점은 지자체 종모우의 활성화와 보급을 위하여 반드시 극복되어야만 한다. 또한 종모우 두수의 제한으로 근교계수의 증가에 대한 우려가 항상 존재하고 있고, 동형접합체의 증가로 인한 근친피해가 우려된다.

한우 고유의 맛은 한우 육질을 대표하는 근내지방도의 축적정도에 따라 차이가 날 수 있으나 근내지방도의 양 이외에 각종 지방산이나 아미노산 등에 좌우될 수 있어 제한된 종모우의 사용은 오히려 한우 고유유전자를 상실시킬 수도 있다. 일본의 유명한 각각의 브랜드도 맛의 차이를 갖고 있다. 각 고유브랜드의 맛을 유지하기 위하여 이미 지방산의 조성이나 맛에 영향을 주는 각종 독특한 요인을 찾아내려고 심혈을 기울이고 있다. 우리 한우 고기의 경우 풍미 물질인 핵산분해 물질의 함량도 높고, 유리아미노산중의 염기성 및 황을 함유한 아미노산(메치오닌, 시스틴)의 비율이 수입육보다 28%가 높다는 것이 밝혀졌다. 또한 지방산중 올레인산이 높고, 포화지방산보다 불포화지방산을 더 많이 함유하고 있기 때문에 우리나라 사람들이 좋아하는 한우고기에는 독특한 풍미물질이 많이 함유되어 있음이 알려져 있다.

그러나 국민의 소득수준이 높아짐에 따라 쇠고기의 수요량이 증가하고 있음에도 불구하고, 한우고기는 관능적으로 수입 쇠고기나 교잡종 쇠고기와는 구별이 되나 젓소 고기와는 구별이 되지 않는다. 이와 같이 한우고기와 젓소고기를 구별하지 못하는 근본적인 원인은 국내의 거의 모든 젓소고기가 이제껏 한우고기로 유통되어 우리나라 사람들의 관능적 판단기준이 한우고기와 젓소고기를 구별하지 못 할 정도로 변화되어졌기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 장기적으로 볼 때 자라나는 세대들은 수입 쇠고기를 지속적으로 소비하게 될 것이므로 수입 쇠고기와 한우고기를 구별하지 못하는 수준으로 변화될 것으로 예측할 수 있다. 결국 한우고기를 차별화하기 위해서는 하루 빨리 순수한 한우고기를 지속적으로 공급하여 소비자들이 한우고기 품질에 대한 기준이 확립되도록 하여야 할 것이다.



그림 1. 횡성축협 고능력 한우 암소 - 근내지방도형(왼쪽) 및 종합형(오른쪽)

일반적으로 우리나라 사람들의 기호에 적합한 고품질의 한우 품종 개발과 균일화된 고급육 생산이 필요하며, 고능력 한우는 근내지방도가 높고, 등지방두께가 낮은 종합형과 모든 형질이 평균이상인 상태에서 도체중이 뛰어난 도체중형, 모든 형질이 평균이상인 상태에서 등심단면적이 뛰어난 등심단면적형, 모든 형질이 평균이상인 상태에서 근내지방도가 뛰어난 근내지방도형으로 고품질의 균일화된 고급육이 생산되고 있다 (그림 2 참조).

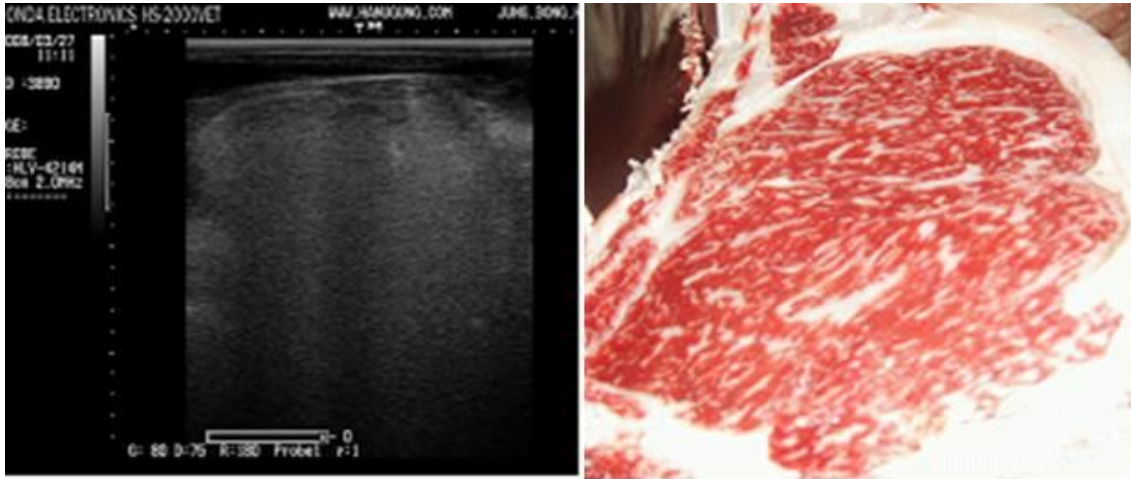


그림 2. 고능력 한우의 초음파 화상(왼쪽) 및 도체사진(오른쪽)

한편 횡성한우고기는 일반한우고기에 비해 풍미와 관련된 아미노산 함량이 3.361mg으로 일반한우고기 2.430mg보다 높고, 지방산중 올레인산이 일반한우 48.73%인데 비해 횡성한우는 52.7%로 높게 나타나고 있다(그림 3). 따라서 횡성한우는 우리나라 사람들이 선호하는 독특한 풍미물질을 많이 함유하고 있다고 할 수 있다.

횡성한우 맛의 우수성 과학적 증거

횡성한우 2차 심의



그림 3. 횡성한우 맛의 우수성의 과학적 증거

이러한 한우를 보다 우리나라 기후와 풍토 여건에 맞게 개량하고 발전시키는 것이 가장 큰 기술이라 할 수 있다. 그러나 국가 차원에서의 수정란 이식 기술은 연구수준에서 머물고 있으며, 그동안 수정란이식의 실용화를 위한 몇몇 연구 사업이 수행되었으나 농가에 실용화되어 보급되지 못하고 실패한 것으로 지적되면서 농가 경쟁력 증대를 위한 고능력우의 대량 생산과 효율적인 수정란이식 모델의 개발이 절실히 요구되고 있다.

따라서 체내 수정란 이식 기술 개선, 정자 및 수정란 성 감별기술을 바탕으로 고능력 한우의 균일화된 고급육 생산 사업이 농가에 실용화 될 수 있도록 새로운 모델을 개발하기 위하여 본 연구과제에서는 정부의 지원 하에 산·학 협력연구 사업으로 추진하였다.

3 절. 연구개발의 목표 및 범위

1. 최종 목표

현재, 국가단위 종모우가 제1종 법정 전염병 즉, 브루셀라, 구제역, 요네 등 많은 위험요소에 노출되어 있어 종모우의 정액 수급이 원활하지 못하고 각 지방자치체에 공급되는 우수 종모우의 한정된 정액량으로 인하여 농가에서 요구하는 만큼의 수요를 충족시키기에는 한계가 있어, 각 지역 브랜드 차별화에 많은 지장을 초래하고 있다. 따라서 본 연구는 지역 브랜드 차별화의 일환으로 지방자치제 종모우 생산에 있어 기준점이 되고자 수행되었다.

이에, 본 연구는 저비용으로 유전능력이 우수한 고능력우를 생명공학 기법과 수정란 이식 기술 등에 의해 수정란을 대량 생산, 번식시킴으로써 농가에서 한우의 우수 유전자원을 확보하고 보존시킬 뿐만 아니라 나아가 고급육 생산 체계를 갖출 수 있도록 하기위하여 진행되었고, 침체된 한우 사육농가의 소득 증대와 수입육에 대한 차별화된 한우의 경쟁력을 확보하기 위하여 브랜드 차별화 모델과 기술을 개발하고자 한다.

2. 주요내용

- 우량 공란우 선발체계 확립
- 우수 고급육 종모우 생산 및 사양관리 기술개발
- 저비용 수정란 대량증식 및 보급체계 확립
- 고능력 한우의 정자 및 수정란의 성 분리에 의한 수정란 생산기술 개발
- 인공수정 및 수정란이식 적기 규명을 위한 생식기내 환경 분석
- 인공수정 및 수정란이식 시 수태율 향상기술 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 연구개발 기술의 국내외 현황

1) 국내 연구 현황

개념정립 단계	○	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

- 한우의 유전적 다양성을 어우르고 시대적, 지역적 요구 변화에 대비하여 특성별로 분리된 한우의 육성이 필요함
- 맞춤형 종축생산으로 국가 단위 한우개량의 한계보완 및 지역 특성별 브랜드화 사업 등에 활용할 필요가 있음
- 한우 유전자원 보존 및 개량을 목적으로 국가가 종모우를 독점함으로써 한우 정액 동결보존에 대한 연구가 미비함
- 우수 유전자원(Elite cow) 수정란의 확보를 위한 다양한 실험방법이 요구됨

2) 국외 연구 현황

개념정립 단계		기업화 단계		기술 안정화 단계	○
---------	--	--------	--	-----------	---

- 일본화우의 경우 특정 고능력 종모우를 집중적으로 이용함에 따라 지역별로 근친계수가 높아지는 것을 방지하기 위하여 중앙차원에서 유전자원을 확보하고 유전적 특징을 유지 및 공급할 수 있는 체계를 구축함
- 외국의 경우 소 정액성상분석을 위한 다양한 분석방법(flow cytometry, CASA, PCR)을 도입하여 현장 적용기술의 개발에 적극적으로 대처하고 있음
- 전 세계적으로 빠른 개량의 효율성을 위해 수정란이식 기술을 적극 활용하고 있음
- 전통적인 육종프로그램보다 육우의 개량을 가속화 할 수 있는 MOET breeding scheme이 10~20%의 유전적 개량량을 높일 수 있어 이에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있음

2. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 농가 맞춤형 한우 송아지 생산기술 개발
(FTA/DDA대응 최신훈산기술 개발성과, pp46, 농촌진흥청 축산연구소, 2006)
- 우수정액 인증제 추진
(축산연구정보 pp16, 농촌진흥청 축산과학원, 2008)
- 농가단위 한우 유전능력평가 모형 개발
(축산시험연구사업, pp75, 2006)

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 인공수정이 숫송아지 분만확률증가 요인이 되고 있다 (호주).
(축산연구정보 pp40, 농촌진흥청 축산연구소, 2007)
- 일본에서 흑모화우 체외수정란 생산과 보급 (일본)
한국과 일본의 소 수정란이식 실용화 연구현황과 활성화 방안, pp75-81, 2004)
- 소의 골격 및 육량증가를 위한 소 성장호르몬의 사용 (미국)
(Animal Science, 84:1176-1197, 2006)

3. 3P 분석

1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 고급육생산을 위해 사료내에 첨가되는 각종 성분의 기능과 역할 분야에 치중
- 정자의 sexing에 관한 기존의 특허는 주로 돼지와 관련된 특허에 치중

2) 논문분석 측면

- 기존 논문은 한우의 고급육 생산을 위한 사양관리시스템의 개발과 사료중 첨가되는 각종 성분의 효능에 대한 연구분야에 치중
- 기존의 논문은 수태를 위한 자궁내 요인의 DNA분석 등의 연구에 치중

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내시장의 분석결과 한우 고급육 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 고비용의 생산비로 인하여 한우 사육농가는 매우 어려운 상황에 처해 있으므로, 저비용으로 고능력 한우 수정란을 생산하여 농가에 보급 할 있는 저비용 고능력 한우 생산기술 개발이 필요

4. 관련기술에 대한 횡성지역의 선행연구결과

1) 고능력 한우(공란우) 경제형질관련 유전인자 분석 (횡성축협 제공)

횡성 한우 중 고능력 한우를 대상으로 경제형질 관련 유전인자형을 조사하기 위하여 한우 육질형질(마블링 및 연도: Mar I, Mar II, Ten I 및 Ten II marker) 관련 DNA marker와 한우 육량형질(등지방 두께 및 등심단면적: Quan I 및 Quan II marker) 관련 DNA marker를 분석하였다. (표 1, 그림 4; 상지대학교 생명자원과학대학 정의룡교수 연구실 분석, 횡성축협 자료제공)

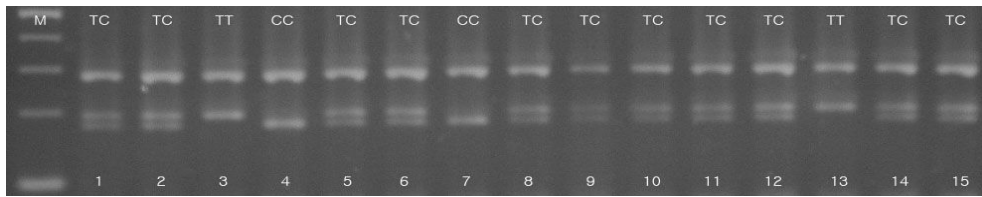
표 1-1. 한우 경제형질 관련 유전인자(DNA marker) 검사

한우 경제형질 관련 유전인자(DNA marker) 검사 결과 보고서														
DNA 검사대상 한우				DNA marker 유전자형 분석				육질형질 유전능력 평가						
				마블링		연도		마블링(marbling)		연도(tenderness)		육질형질 종합		
구분	순번	키표번호	성별	Mar I	Mar II	Ten I	Ten II	우수 유전인자 보유 수	판정 결과	우수 유전인자 보유 수	판정 결과	우수 유전인자 보유 수	판정 결과	
종합형	1	162476248	♀	TC	GA	GG	GG	2	보통상	2	보통상	4	보통상	
	9	165067450	♀	TC	GG	GG	GG	3	우수	2	보통상	5	우수	
	3	143639964	♀	TT	GA	CG	GG	3	우수	3	우수	6	우수	
	13	162964574	♀	TT	GA	CG	GA	3	우수	2	보통상	5	우수	
	12	167508630	♀	TC	GG	CG	GG	3	우수	3	우수	6	우수	
	14	165062912	♀	TC	GA	CG	GG	2	보통상	3	우수	5	우수	
도체중형	15	163446141	♀	TC	GA	CC	GG	2	보통상	4	최우수	6	우수	
	5	162477064	♀	TC	GG	GG	GG	3	우수	2	보통상	5	우수	
	10	170080444	♀	TC	GA	CG	GG	2	보통상	3	우수	5	우수	
등심단면적형	4	158579022	♀	CC	GA	CG	GG	1	보통하	3	우수	4	보통상	
	7	164801895	♀	CC	GG	GG	GA	2	보통상	1	보통하	3	보통상	
	8	164802861	♀	TC	GA	GG	GA	2	보통상	1	보통하	3	보통상	
근내지방형	11	174418977	♀	TC	GG	GG	GG	3	우수	2	보통상	5	우수	
	6	162475307	♀	TC	GA	GG	GA	2	보통상	1	보통하	3	보통상	
	2	163449822	♀	TC	GG	CC	GG	3	우수	4	최우수	7	최우수	
육질형질 판정결과 총계								최우수 : 0두 (0%) 우수 : 7두 (46.7%) 보통상 : 7두 (46.7%) 보통하 : 1두 (6.6%) 열 등 : 0두 (0%)	최우수 : 2두 (13.4%) 우수 : 5두 (33.3%) 보통상 : 5두 (33.3%) 보통하 : 3두 (20.0%) 열 등 : 0두 (0%)	최우수 : 1두 (6.7%) 우수 : 9두 (60.0%) 보통상 : 5두 (33.3%) 보통하 : 0두 (0%) 열 등 : 0두 (0%)				

표 1-2. 한우 경제형질 관련 유전인자(DNA marker) 검사

한우 경제형질 관련 유전인자(DNA marker) 검사 결과 보고서										
DNA 검사대상 한우				DNA marker 유전자형 분석		육량형질 유전능력 평가		경제형질(육질 및 육량 종합) 판정		
				등지방두께 및 등심단면적 (backfat thickness & M Longissimus dorsi area)						
구분	순번	귀표번호	성별	Quan I	Quan II	우수 유전인자 보유 수	판정 결과	우수 유전인자 보유 수	종합판정	우수 형질
종합형	1	162476248	♀	GA	TT	3	우수	7	보통상 (★★)	등지방두께 및 등심단면적
	9	165067450	♀	AA	TC	1	보통하	6	보통상 (★★)	마블링
	3	143639964	♀	GA	TC	2	보통하	8	우수 (★★★)	마블링, 연도
	13	162964574	♀	GG	TT	4	최우수	9	우수 (★★★)	마블링, 등지방두께 및 등심단면적
	12	167508630	♀	GA	TT	3	우수	9	우수 (★★★)	마블링, 연도, 등지방두께 및 등심단면적
	14	165062912	♀	AA	TC	1	보통하	6	보통상 (★★)	연도
도체중형	15	163446141	♀	AA	TC	1	보통하	7	보통상 (★★)	연도
	5	162477064	♀	GA	TT	3	우수	8	우수 (★★★)	마블링, 등지방두께 및 등심단면적
	10	170080444	♀	GA	TT	3	우수	8	우수 (★★★)	연도, 등지방두께 및 등심단면적
등심단면적형	4	158579022	♀	GA	TT	3	우수	7	보통상 (★★)	연도, 등지방두께 및 등심단면적
	7	164801895	♀	GA	TC	2	보통하	5	보통하 (★)	.
	8	164802861	♀	GG	TT	4	최우수	7	보통상 (★★)	등지방두께 및 등심단면적
근내지방형	11	174418977	♀	AA	TC	1	보통하	6	보통상 (★★)	마블링
	6	162475307	♀	GA	TC	2	보통하	5	보통하 (★)	.
	2	163449822	♀	GA	TT	3	우수	10	최우수 (★★★★)	마블링, 연도, 등지방두께 및 등심단면적
육량형질 판정 결과 총계						최우수 : 2두 (13.3%) 우수 : 6두 (40.0%) 보통상 : 0두 (0%) 보통하 : 7두 (46.7%) 열 등 : 0두 (0%)	경제형질 종합판정 결과 총계		최우수 (★★★★) : 1두 (6.7%) 우수 (★★★) : 5두 (33.3%) 보통상 (★★) : 7두 (46.7%) 보통하 (★) : 2두 (13.3%) 열 등 (0) : 0두 (0%)	

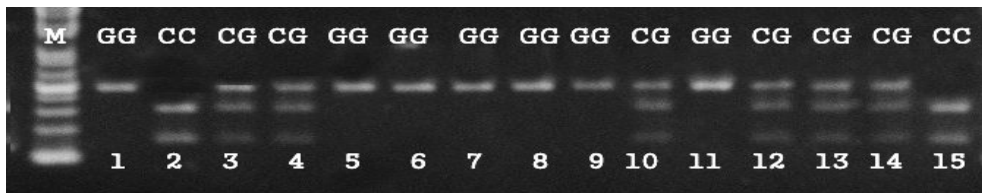
<Mar I DNA marker; 근내지방도 관련 유전자>



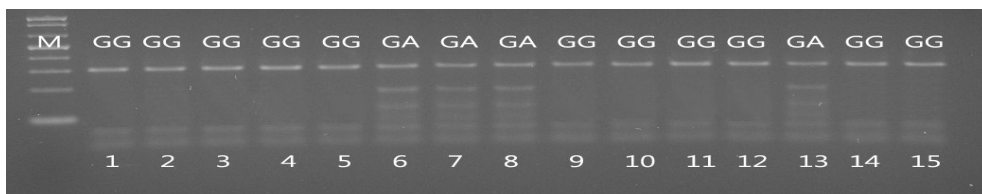
<Mar II DNA marker; 근내지방도 관련 유전자>



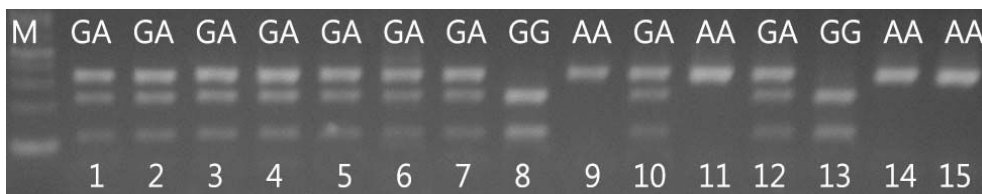
<Ten I DNA marker; 연도 관련 유전자>



<Ten II DNA marker; 연도 관련 유전자>



<Quan I DNA marker; 육량 관련 유전자>



<Quan II DNA marker; 육량 관련 유전자>

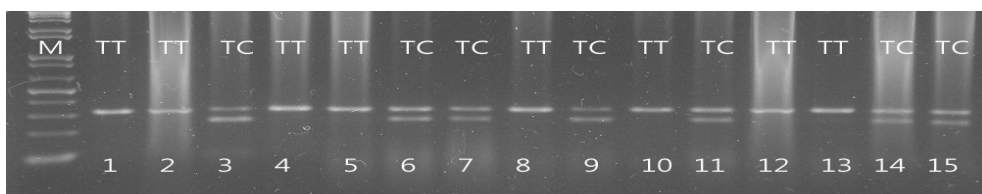


그림 4. 한우 경제형질 관련 유전인자(DNA marker)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

[제1세부과제명 : 고능력 한우 수정란 이식 및 실용화 모델의 개발]

고능력 한우 공란우를 수정란 이식 기술에 의해 대량 번식시켜 우량 유전자원의 확보 및 보존 시키고 고급육 생산 체계를 갖춰 실용화시킴으로 축산농가의 소득 증대에 기여하는데 목표가 있다.

○ 우량 공란우 선발기준 체계 확립

1. 재료 및 방법

1) 우량 공란우 선정

본 시험은 황성한우 브랜드에서 사육되고 있는 혈통등록된 한우 암소 12,706두의 혈통자료와 후대 수소의 출하성적(근내지방도, 등지방두께, 배장근단면적)을 조사하여 각 개체별 유전능력을 추정하여 능력이 우수한 개체 251두를 1차 선발하였다. 선발된 개체에 대해 초음파를 측정하여, 각 초음파 측정자료에 대해서 정규성 검정 등을 실시한 후 자료입력 과정이나 초음파 영상 해석 시 오류인 것으로 판단되는 성적들은 분석대상에서 제외하고 분석하였다.

유전능력 분석에 따라 계통별 공란우 선발을 위해 각 형질별 육종가를 표준화하여 표준화 선발지수에 따라 종합형, 도체중형, 등심단면적형, 근내지방도형으로 분리하여 Rank Correlation을 이용하여 유전능력 상위서열에 따라 공란우를 세분하여 선발하였는데, 1차로 선발된 공란우 두수는 종합형 30두, 도체중, 등심단면적 및 근내지방도형 15두 였으며, 최종 심사 절차를 거쳐 종합형 6두, 도체중, 등심단면적 및 근내지방도형을 각각 3두를 최종 선발하였다. 선발된 공란우에 대해 교배종모우를 선정하여 우량 수정란 생산을 위해 활용하였다.

또한 황성한우 초음파 형질에 대한 유전형태 분석 및 암소 선발기준 정립을 위해 이용된 황성지역에서 사육되고 있는 한우 암소의 초음파 자료에 대해 혈통 추적이 가능한 4,374두의 혈통자료와 개체별 초음파 측정치(등지방두께, 배장근단면적, 근내지방도, 지방함량)를 이용하여 개체별 유전능력을 분석하였다. 근내지방도는 27단계 기준으로 세분하였고, 초음파 측정자료에 대해서 정규성 검정 등을 실시한 후 자료입력 과정이나 초음파 영상 해석 시 오류인 것으로 판단되는 성적들은 분석대상에서 제외하고 분석하였는데, 등지방두께가 25보가 큰 개체, 배장근단면적이 120보다 큰 개체, 근내지방도가 23보다 큰 개체, 지방함량이 50보다 큰 개체들이었다. 또한 년도-계절-지역의 동기우 설정시 측정개체가 1두인 것은 분석에서 제외하여 실제 분석에 이용된 개체는 1,982두 였다.



그림 5. Real-time Ultrasound(1.5-3MHz frequency: 180mm linear probe, HS-2000, FHK, Japan)



그림 6. 초음파기기를 이용한 한우 생체평가 방법

표 2. 월령별 초음파 측정두수

연령	두수
1세	3
2세	213
3세	507
4세	389
5세	20
6세	265
6세이상	449

2) 공란우 혈통 및 유전모수 추정

본 시험의 우량 공란우 선발을 위해 혈통기록 분석은 PAMST package를 이용하여 분석하였고, 각 개체에 대한 유전모수 및 육종가 추정은 MTDFREML package를 이용하여 분석하였다.

개체 모형을 행렬에 의한 방정식으로 유전모수 및 육종가 추정

$$y = X\beta + Zu + e$$

여기서,

y : $N \times 1$ 관측치 벡터,

b : $p \times 1$ 알려지지 않은 상수벡터,

u : $q \times 1$ 알려지지 않은 임의변수 벡터,

e : $N \times 1$ 임의오차 벡터,

X, Z : 각각 b 와 u 의 원소를 y 의 원소에 관련되도록 설계한 $N \times p$ 와 $N \times q$ 차수의 계수행렬

분산 및 공분산은 다음과 같다.

$$Var(u) = G = A \otimes G_0$$

$$Var(e) = R = I \otimes R_0$$

$$Var(y) = V = ZGZ' + R$$

여기서,

A : 상가적 혈연계수 행렬

G_0 : 형질들간의 상가적 유전분산-공분산 행렬

R_0 : 형질들간의 임의 오차분산-공분산 행렬

I : 단위행렬

u 의 BLUP과 b 의 GLS를 계산하기 위해 다음과 같은 혼합모형 방정식 사용

$$\begin{pmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} + \mathbf{G}^{-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{u}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} \end{pmatrix}$$

G 는 혈연관계행렬로 모든 개체에 대한 혈연관계 포함

초음과 형질에 대한 유전력 및 육종가를 추정하기 위하여 다음과 같은 다형질 혼합모형을 이용하였다.

$$y_{ijkl} = \mu + YS_i + \beta_1 X_{1ij} + \beta_2 X_{1ij}^2 + \beta_1 X_{2ik} + \beta_2 X_{2ik}^2 + a_{ijk} + e_{ijkl}$$

μ	=	전체평균
YS_i	=	출생년도-계절의 효과
X_1, X_2	=	개체의 초음파측정시 흉위 및 측정일령의 공변이
β_1, β_2	=	회귀계수
a_{ijk}	=	개체에 대한 임의효과 $\sim N(0, A\sigma_a^2)$, A는 혈연계수행렬
e_{ijkl}	=	임의오차 효과

3) 우량 공란우 선발기준

- 표준화 육종가에 의한 선발기준

각 형질의 유전능력 분석에 따라 형질별 표준화 육종가를 Z표준편차 단위에 따라 -1표준편차 이하를 D등급으로 -1에서 0표준편차는 C등급으로 0에서 1표준편차는 B등급으로 1표준편차 이상으로 A등급으로 분리하고 공란우에 대한 평가를 실시하여 각 형질에서 A등급에 해당되는 우량 공란우를 선발 활용한다. 육질형 우량공란우는 근내지방도 A등급 이상, 육량형 우량공란우는 도체중 B등급이상이며 배장근단면적이 A등급 이상으로 구분하여 선발 하였다.

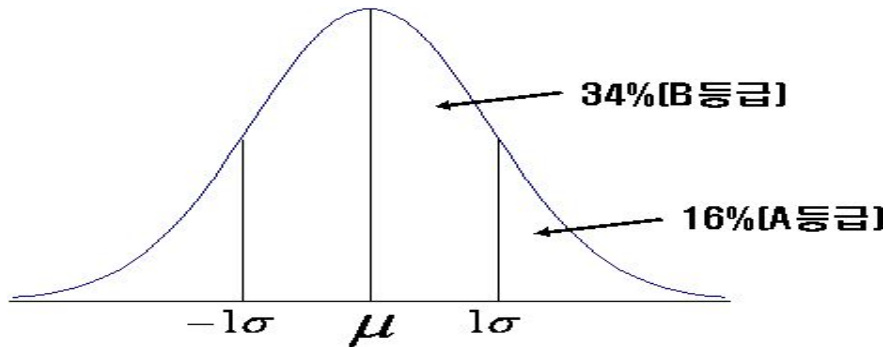


그림 1. 표준편차 단위

- 종합형 공란우 선발을 위한 선발지수

$$-1.0 \times (\text{등지방두께}) + 1.5 \times (\text{근내지방도}) + 1.0 \times (\text{배장근단면적})$$

2. 연구 결과

공란우 선발 기준에 의거하여, 1차적으로 후보 공란우를 선발하였다. 선발된 후보 공란우들은 표 3~6에 각각 그 내역을 나타내었다. 도체중형 공란우 15두, 등심단면적형 공란우 15두, 근내지방도형 공란우 15두 및 종합형 공란우 30두를 각각 선발하였다.

표 3. 도체중형 공란우 내역

두수	개체명호	부	모	도체중 추정육중가
1	181989460	338	158433799	14.2779
2	174416652	261	162476876	19.6961
3	175624377	338	140273525	14.7011
4	182107689	354	141287236	21.9024
5	175033926	532	140272858	22.5666
6	184992498	387	162996296	9.0795
7	177818712	338	143638651	9.2915
8	177818989	354	162995008	10.5953
9	181988821	279	163446315	17.4564
10	172850854	338	161338522	7.0524
11	182106354	532	167989460	11.3449
12	172924203	267	163446141	18.8030
13	175621932	338	143639089	11.0604
14	172924289	532	162477064	23.3338
15	181996857	338	169764157	9.4798

표 4. 등심단면적형 공란우 내역

두수	개체명호	부	모	등심단면적 추정육중가
1	174498122	267	164803721	8.0829
2	167749286	267	165062714	4.7314
3	174501488	263	143638817	6.3037
4	181996796	338	163449799	1.5056
5	175623851	267	164802342	6.3580
6	182007248	393	167509224	3.3361
7	174498115	267	164802861	1.4353
8	181996802	338	167342036	6.3800
9	162999604	261	164802038	2.1615
10	174420468	261	158579022	2.2595
11	182007323	336	165146407	1.8274
12	174501211	256	164801895	1.5856
13	167740504	263	164801383	2.7175
14	182107542	354	140273997	1.8855
15	165283508	261	164803721	1.9631

표 5. 근내지방도형 공란우 내역

두수	개체명호	부	모	근내지방도 추정육종가
1	181996796	338	163449799	2.9638
2	181997618	338	162475307	3.4579
3	182106781	354	169768421	3.1266
4	174171605	338	115971344	2.2196
5	174498580	267	164802076	2.2100
6	174503437	354	162476024	2.3386
7	182011757	348	174418977	2.7714
8	174505899	267	115923741	2.3759
9	177819245	338	165063070	1.7693
10	175027642	267	167507596	1.9503
11	174498948	354	163449822	1.7051
12	181997830	338	163446258	2.2994
13	174498412	267	116993595	2.0225
14	163446696	261	118222083	1.4618
15	170080499	261	143638544	1.9991

표 6. 종합형 공관우 내역

두수	개체명호	부	모	종합형 선발지수
1	177823105	354	162476248	3.4436
2	175029301	267	167238322	2.9196
3	182006036	393	174416133	2.6727
4	182006036	393	174416133	2.6727
5	182106071	338	162964574	2.6291
6	174166229	267	167508500	2.5066
7	174505615	338	164802038	2.3781
8	175625770	338	164803318	2.1124
9	182019630	393	170080550	2.0914
10	172922421	338	143639964	2.0411
11	182011337	393	164809549	2.0022
12	184993259	354	162475042	1.9849
13	181996680	338	162999414	1.9330
14	172922186	256	140453838	1.7214
15	174169152	267	118109794	1.7095
16	174418021	261	165068334	1.6936
17	177816695	354	158469942	1.6191
18	175032646	338	162474838	1.5922
19	163492970	263	163389911	1.4931
20	177819320	338	167347833	1.3371
21	172922490	338	162964574	1.3270
22	177818484	267	167508579	1.1919
23	174501549	338	162964988	1.1592
24	182017704	387	170080444	1.0800
25	181997571	338	167989569	1.0669
26	175625794	338	143638974	1.0294
27	177823228	354	165063063	0.9914
28	174415310	338	165062752	0.8571
29	177823211	354	165067450	0.8528
30	172924845	267	117034017	0.8198

표 7. 최종 선발 공란우 내역

구 분	바코드	생년월일	성 명	주 소
종합형	165062912	00. 5. 17	신용환	청일면 갑천리
	162476248	99. 8. 7	강제섭	둔내면 석문리
	165067450	00. 5. 18	강제섭	둔내면 석문리
	143639964	98. 4. 10	선원석	횡성읍 옥동리
	162964574	01. 2. 5	선원석	횡성읍 옥동리
	167508630	01. 5. 10	이도연	강림면 강림리
도체중형	163446141	01. 1. 18	박재홍	강림면 강림리
	162477064	98. 8. 19	박재홍	강림면 강림리
	170080444	02. 5. 10	선태석	횡성읍 옥동리
등 심 단면적형	158579022	00. 1. 5	최병철	갑천면 구방리
	164801895	00. 10. 30	김진근	청일면 유평리
	164802861	00. 5. 10	선원석	횡성읍 옥동리
근 내 지방도형	162475307	99. 3. 27	김명희	우천면 산전리
	174418977	02. 4. 25	김성근	공근면 부창리
	163449822	01. 7. 20	박순장	횡성읍 정암리

표 7은 선발된 후보 공란우에서 최종 선발된 공란우를 나타낸 표로써, 총 15두의 공란우가 선발되었으며, 각각 종합형 6두, 도체중형 3두, 등심단면적형 3두, 근내지방도형 3두로 구분되어 있다(그림 7).

표 8. 황성한우 초음파 형질의 일반평균

두수	두수	평균	표준편차	최소값	최대값
등지방두께	1904	3.69	2.61	1.00	20.00
등심단면적	1904	50.53	10.22	23.60	114.00
근내지방도	1904	4.00	2.57	1.00	20.00
지방함량	1685	11.10	5.17	4.00	50.00

표 9. 황성한우 초음파 측정치간의 일반상관 계수

	등심단면적	근내지방도	지방함량
등지방두께	0.7201**	0.6083**	0.3887**
등심단면적	-	0.5777**	0.3597**
근내지방도	-	-	0.4556**

○ 우수 종모우 선발모델 개발

1. 재료 및 방법

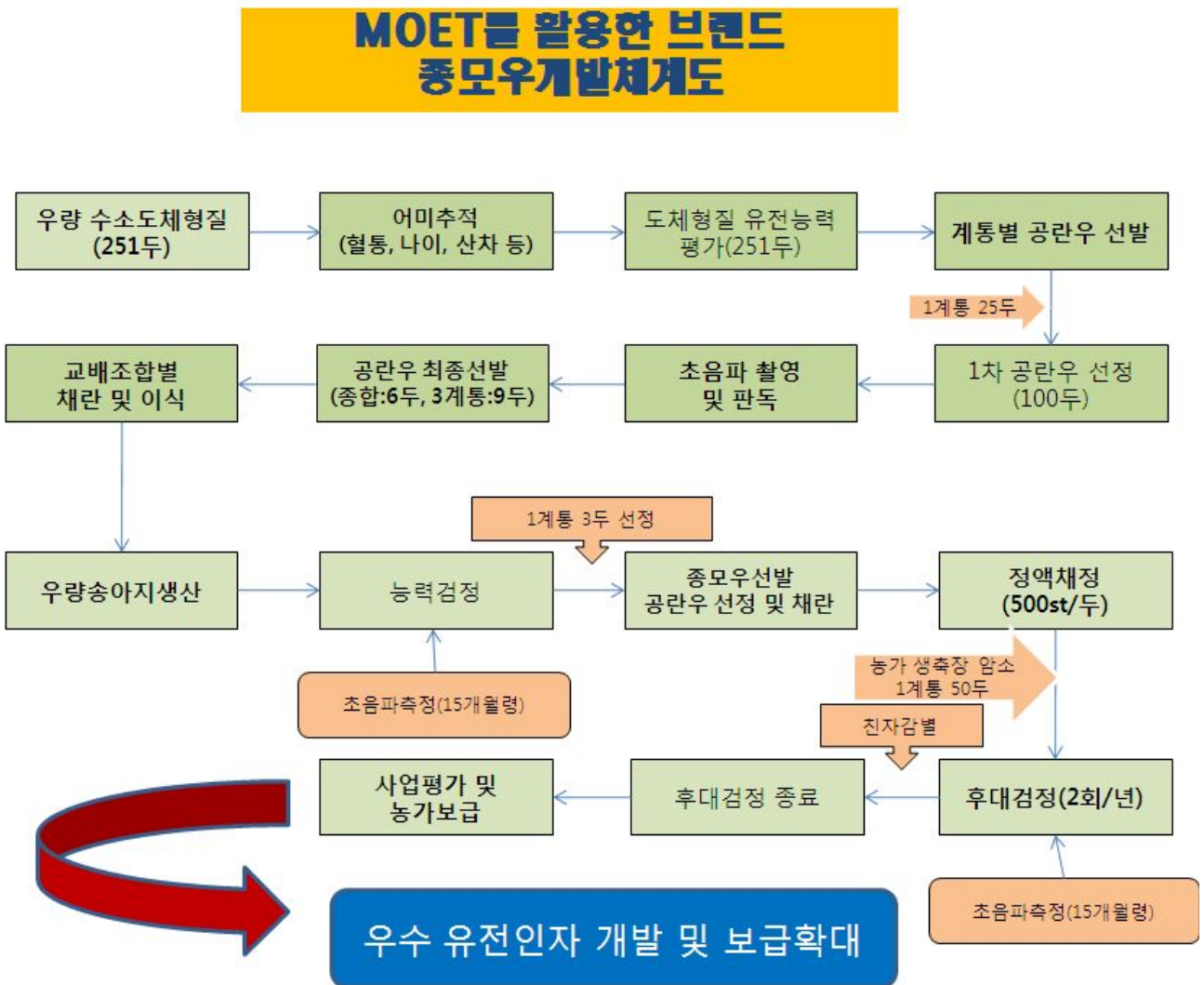


그림 8. MOET를 활용한 횡성한우 브랜드 종모우의 개발체계도

1) 우수 종모우 선발

수정란 이식에 의해 태어난 수송아지 중 발육상태, 초음파 측정, 유전능력 평가를 실시한 개체 중 우수한 개체만을 종모우로 선발하였다(그림 9와 10).

2) 후대검정우의 환경효과 추정

- 자료의 교정

수집된 자료중 NPP(Normal Probability Plot) 분석을 통해 이상치라고 생각되는 개체는 분석에서 제외했는데 생시체중의 경우 18kg 이하인 개체, 이유시체중의 경우 40kg 이하인 개체였다.

- 각 성장형질에 영향을 미치는 환경 효과를 추정하기 위해 다음과 같은 선형모형을 이용하여 최소 제곱법으로 분석하였다.

$$y_{ijkl} = \mu + YS_i + Sire_j + Sex_k + e_{ijkl}$$

- μ = 전체평균
- YS_i = 출생년도-계절효과
- $Sire_j$ = 종모우의 효과
- Sex_k = 성별의 효과
- e_{ijkl} = 임의오차 효과



그림 9. 종모우의 체형 측정 방법



그림 10. 종모우 선발을 위한 초음파 측정

농가수익형 선발지수

$$- 1 \times (\text{등지방두께 표준화육중가}) + 2.0 \times (\text{근내지방도 표준화육중가}) + 1.5 \times (\text{배최장근단면적 표준화육중가})$$

2. 연구 결과

1) 1차 후보종모우 선발

표 10은 1차로 선발된 후보종모우의 개체정보를 나타낸 표로서 후대검정을 위한 동결정액 생산량을 나타낸 표이다. 이를 통해 생산된 동결정액은 후대검정을 위한 산자생산에 사용되었다. 2세부과제의 강원대학교 번식학 실험실에서 분석된 정액성상 검사 결과 또는 채정직후의 정액량, 색 및 육안을 통한 활력검사를 바탕으로 동결정액 생산 여부를 판단하였다. 성상검사 결과가 좋지 않거나 정액의 형상이 정상적이지 못한 개체들은 동결 정액 제작에서 제외시켰다.

표 10. 1차 선발된 종모우

	종모우	생년월일
도체중형	009830107	'07. 11. 26
	009789100	'08. 07. 12
등심단면적형	009787798	'08. 01. 08
	009788073	'08. 01. 06
	009788081	'08. 01. 06
	009789183	'07. 10. 18
	009789191	'07. 10. 22
	009789206	'07. 10. 22
	009788065	'08. 01. 06
	009787802	'08. 01. 12
근내지방형	009808465	'08. 03. 13
	027089866	'08. 09. 07
	027095692	'08. 08. 23
	031719869	'08. 10. 12
종합형	009788090	'08. 02. 11
	007006906	'08. 04. 19
	009787780	'07. 12. 22
	009787771	'07. 12. 27
	027095789	'08. 09. 09
	027095730	'08. 09. 20
	027095748	'08. 09. 28
031724854	'08. 11. 10	



그림 11. 1차 선발된 황성한우 브랜드 종모우

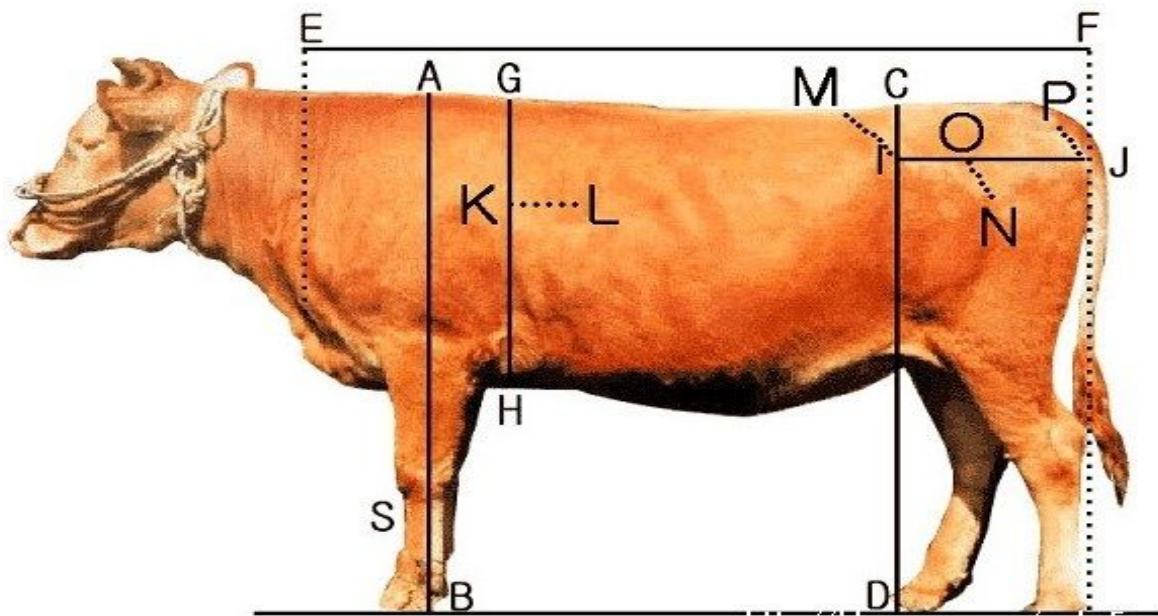


그림 12. 한우 체형정보. A-B:체고 C-D:십자부고 E-F:체장 G-H:흉심 M-I:요각폭 I-J:고장 K-L: 흉폭 N-O:곤폭 P-J:좌골폭 S:전관위

표 11. 1차 선발된 종모우의 개체 체형정보

개체번호	구분	측정항목					
		체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심
009830107 (생시체중 : 18.6 kg) / 도체중형	이유	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심
		82	84	90	82.5	19	39
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위
		29	21.5	24	10.5	98	11.5
	12개월	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심
		298	116	116	131	33	58
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위
		43	36	36	15	153	
009789183 (생시체중 : 23 kg) / 등심단면적 형	이유	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심
		101	89	92	94	21	42
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위
		24	31	26	16	107	13
	12개월	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심
		388	120	120	143	43	61
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위
		45	40	41	19	165	
009789206 (생시체중 : 30 kg) / 등심단면적 형	이유	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심
		116	88	93	96	24	43
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위
		26	32	27	19	110	14
	12개월	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심
		403	119	122	138	41	61
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위
		46	35	43	16	165	
009789191 (생시체중 : 27 kg) / 	이유	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심
		115	90	93	96	24	43
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위

등심단면적 형		26	32	28	19	110	14	
	12개월	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심	
		403	119	120	147	41	63	
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위	
		46	37	40	17	166		
009787780 (생시체중 : 32 kg) / 근내지방형	이유	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심	
		87	84	88.5	79.5	18.5	36.5	
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위	
		27	17.5	20.5	10	91	11.5	
	12개월	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심	
		254	117	116	123	34	57	
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위	
		43	32	30	16	145		
	009787771 (생시체중 : 34 kg) / 근내지방형	이유	체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심
			101	89	95	86.5	23	39.5
			고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위
			30.5	23	26	12	104	13
12개월		체중	체고	십자부고	체장	흉폭	흉심	
		319	117	120	134	39	59	
		고장	요각	곤폭	좌골폭	흉위	전관위	
		43	36	37	23	157		

표 11는 1차로 선발된 후보종모우 일부의 체형특성을 나타낸 표이다. 그림 12에 나타낸 각 측정치들을 기준으로 하여 후보종모우들의 체형을 측정하였다. 측정시기는 이유시기와 12개월 도 달 시기에 실시하였다.

2) 황성한우 브랜드 후보종모우의 후대검정 능력

표 12. 브랜드 종모우 인공수정으로 태어난 자손의 성장능력

	n	평균	표준편차	최소값	최대값	전국평균
생시체중	106	26.05	3.26	19.00	34.00	23.40
91일령 이유체중	97	79.49	14.55	45.07	116.07	72.64 ¹⁾

* 한우유전능력 평가보고서(2005)

¹⁾ 92일령 평균치

표 13. 브랜드 종모우 인공수정으로 태어난 자손의 성장능력에 영향을 미치는 환경요인의 효과

	df	생시체중	91일령 이유체중
출생년도-계절	4	52.31	781.43*
종모우	3	18.13**	547.21**
성별	1	14.48	517.01
Error	97	8.97	188.90
R ²		0.22	0.19

표 14. 브랜드 종모우별 자손의 성장능력


종모우	n	생시체중	이유시체중
근내지방형	26	24.65±0.61	71.37±3.02
도체중	20	24.78±0.75	78.06±3.32
등심단면적	32	25.77±0.53	82.24±2.64
종합형	28	27.85±0.65	81.03±2.85

표 15. 브랜드 종모우 자손의 성별 성장능력

성별	n	생시체중	이유시체중
암	55	25.38±0.46	75.79±2.11
수	51	26.14±0.48	80.56±2.19

표 16은 1차 종모우 선발에 이어 최종적으로 선발된 종모우의 내역을 나타낸 표이다. 현재 황성 축협목장에서 사양관리 중으로 1차 선발된 후보종모우에 이어 최종 선발된 종모우 정액 생산을 위해 정액 채정 및 동결이 이루어질 예정이다.

표 16. 최종 선발된 황성한우 브랜드의 종모우

	031724926	
	생년월일	'08. 10. 29
	생시체중	22 kg
	이유체중	76.5 kg
	12개월 체중	296 kg

	027095730	
	생년월일	'08. 09. 20
	생시체중	22 kg
	이유체중	73 kg
	12개월 체중	315 kg

	049373292	
	생년월일	'10. 01. 13
	생시체중	32 kg
	이유체중	82 kg
	12개월 체중	350 kg

○ 종모우 정액생산 및 동결보존 시스템 구축

1. 재료 및 방법

1) 정액 채취

인공질법에 의해 종모우로부터 채정된 원정액을, 15 ml 튜브에 담아 동결용 배양액으로 1:1 희석한 후, 일부는 정자 성상 검사용으로써 강원대학교로 운반한다. 나머지 1차 희석 정액은 하루 동안 4℃로 천천히 냉각시키고 동결정액 제조시에는 동일한 동결용 배양액으로 다시 희석하여 동결정액 제조에 사용한다(그림 13).



그림 13. 인공질법에 의한 횡성한우 종모우 정액 채취

2) 정자 성상검사

본 실험은 정자 및 수정란의 성 분리에 의한 수정란 생산기술 개발을 할 때 사용되는 정자들의 성상 검사를 통해 보다 좋은 정자를 선별하고자 시행하게 되었다. 여러 종모우중 우수한 성상을 가지는 정자를 이용하여 성 분리 및 수정란을 생산하게 되면 우수한 형질의 개체를 얻기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하게 되었다. 정자 성상 검사는 횡성축협 생축장의 종모우로부터 인공질법을 이용해 채정한 정자를 다음과 같이 검사를 실시하였다. 정자의 생존율 검사는 SYBR14-PI staining에 의해 실시되었으며 기형을 검사는 Rose-bengal 염색을 통하여 그 비율을 계산하였다. 또한 채취된 정액의 침체상태는 CTC 방법에 의해 측정을 실시하고, Coomassie Brilliant Blue(CBB) 염색법을 이용하여 침체반응 유발액에 60분 동안 반응 시켜 침체반응율을 측정하였다. 저삼투압액을 이용하여 정자의 막강도 검사(HOST)를 실시하였으며 그 외에도 정자의 DNA 손상 검사(Acridine Orange stain Test) 그리고 Rhodamin123 염색을 통한 미토콘드리아 검사도 병행하여 검사를 실시하였다. 각각의 성상검사방법은 아래와 같다.

생존율은 살아있는 세포의 막 투과성의 차이를 보이는 SYBR-14와 PI를 정자에 형광염색하는

방법을 이용하였다. 그림 14에서와 같이 살아있는 정자는 SYBR-14에 의해 염색되어 그린색 형광을 발산하고, 죽은 정자의 경우 PI에 의해 염색되어 붉은색 형광을 발산하게 된다. 이와 같이 그린색과 붉은색을 나타내는 정자의 비율을 분석하여 생존율을 분석하였다.

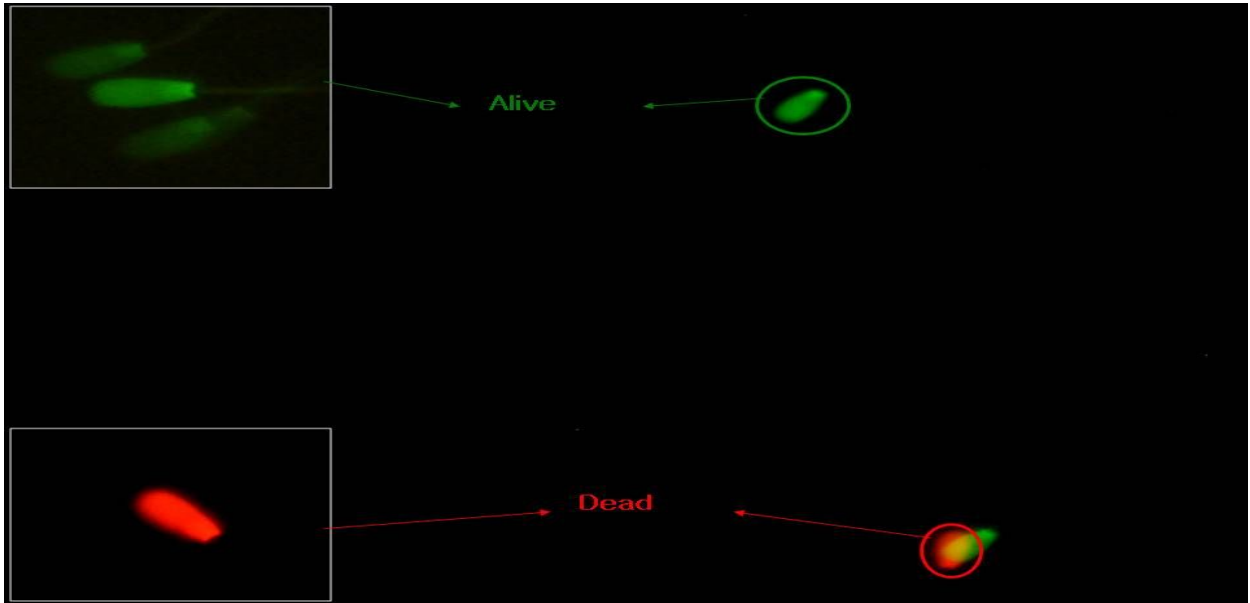


그림 14. 생존율 검사를 위해 SYBR-14(그린색 형광)과 PI(붉은색 형광)에 의해 형광 염색된 소 정자의 모습

기형율은 아래 그림 15와 같이 정자를 Rose Bengal로 염색하여 외형적으로 기형인 정자의 비율을 분석하였다.



그림 15. 소 정자의 외형적 기형분석을 위해 Rose Bengal로 염색한 소 정자의 모습

침체상태는 CTC 염색방법을 이용하였다. 채정된 정자를 고정하여 CTC형광 시료와 칼슘이온을 동일 양을 넣고 암실에서 염색하여 형광 염색된 정자의 모습을 3단계로 구분하여 그 비율을 분석하였다. CTC는 칼슘과 반응하여 정자 막에 염색되며, 침체 외막과 원형질막에 붙어 황색 형광을 발산하게 된다. 이때 원형질막과 침체 외막의 손상이 일어나거나 없어진 경우 그 부위는 형광시료가 염색되지 않게 된다. 이와 같은 현상을 이용하여 채정 당시의 정자의 침체 상태를 분석할 수 있다. CTC에 의해 염색된 정자의 형태는 원형질막이 온전히 있는 손상되지 않은 상태로 전체적으로 염색된 F pattern과 원형질막이 손상되고 침체외막이 드러나 정자의 수정능력 획득된 상태로 정자 두부 중 핵부분이 염색되지 않은 B pattern 그리고 침체반응이 일어나 수정능력이 상실되어 두부 전체가 염색되지 않거나 희미하게 염색된 AR pattern 으로 나눌 수 있다(그림 16).

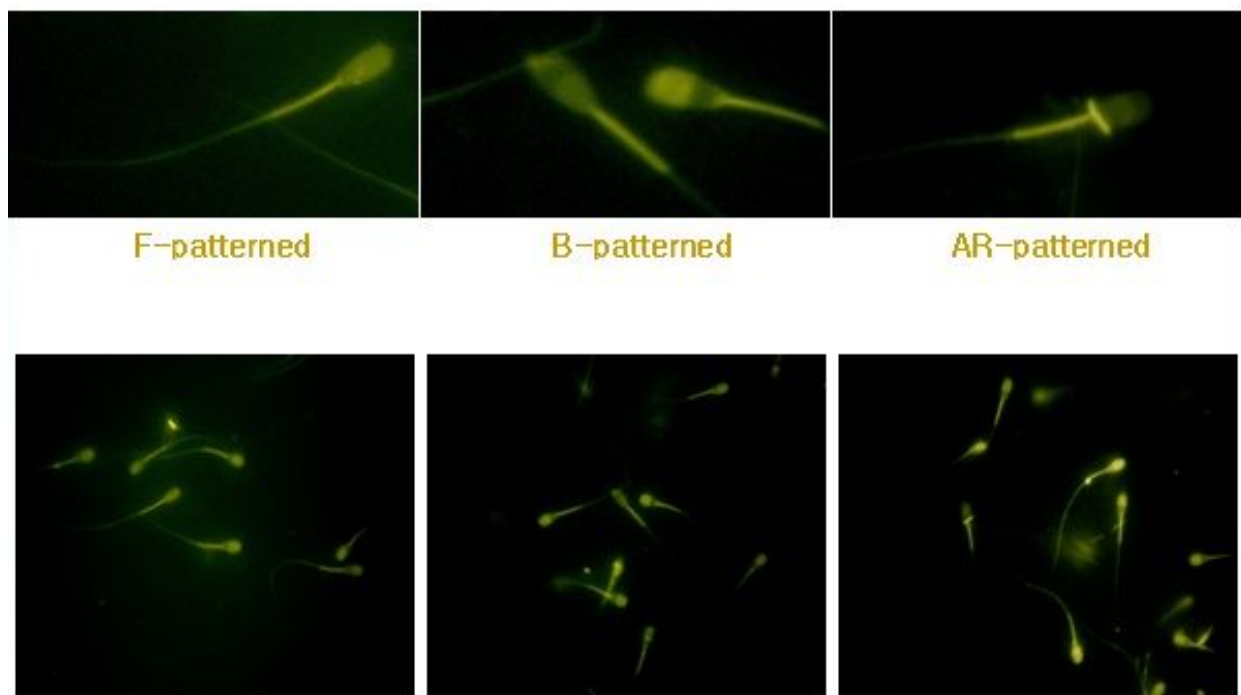


그림 16. CTC 염색을 형태에 따라 소 정자의 침체 상태를 3pattern(F, B, AR)으로 분류한 모습

침체 반응율은 정자의 수정능력을 간접적으로 평가하는 방법으로 침체반응을 고의적으로 유도하여 침체반응유도전과 비교하여 얼마나 많은 수의 정자가 반응되었는지를 평가하는 방법으로 정자의 침체 반응 유무를 확인하기 위해 단백질 염색에 이용하는 CBB로 정자를 염색하여 그림 17과 같이 침체 반응 유무를 확인 분석한다.

미토콘드리아 막 기능검사는 정자의 이동에 필요한 에너지를 공급하는 정자 중편부부위의 미토콘드리아초의 막 기능을 분석하는 방법으로 Rhodamin123과 PI를 이용하여 미토콘드리아 막 손상 유무와 기형 유무를 분석하는 방법이다. (그림 18)

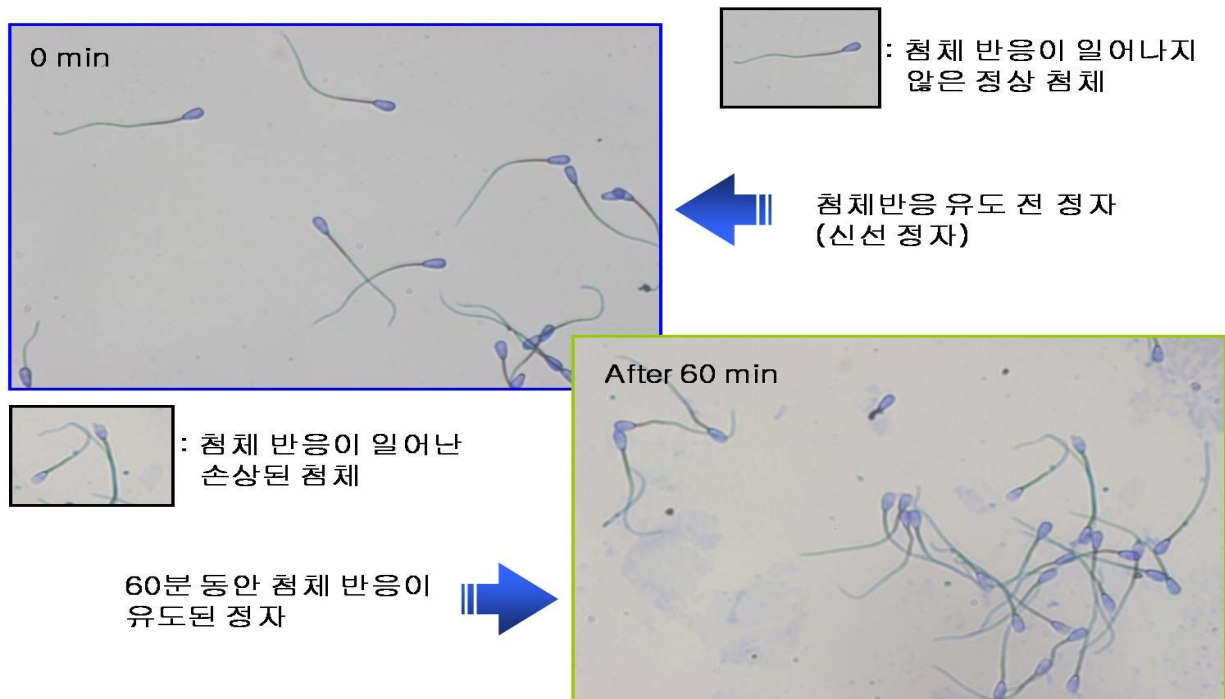


그림 17. 침체 반응을 검사를 위해 침체반응이 유도 전 정자와 유도 후 정자를 CBB염색을 통해 분석한 모습

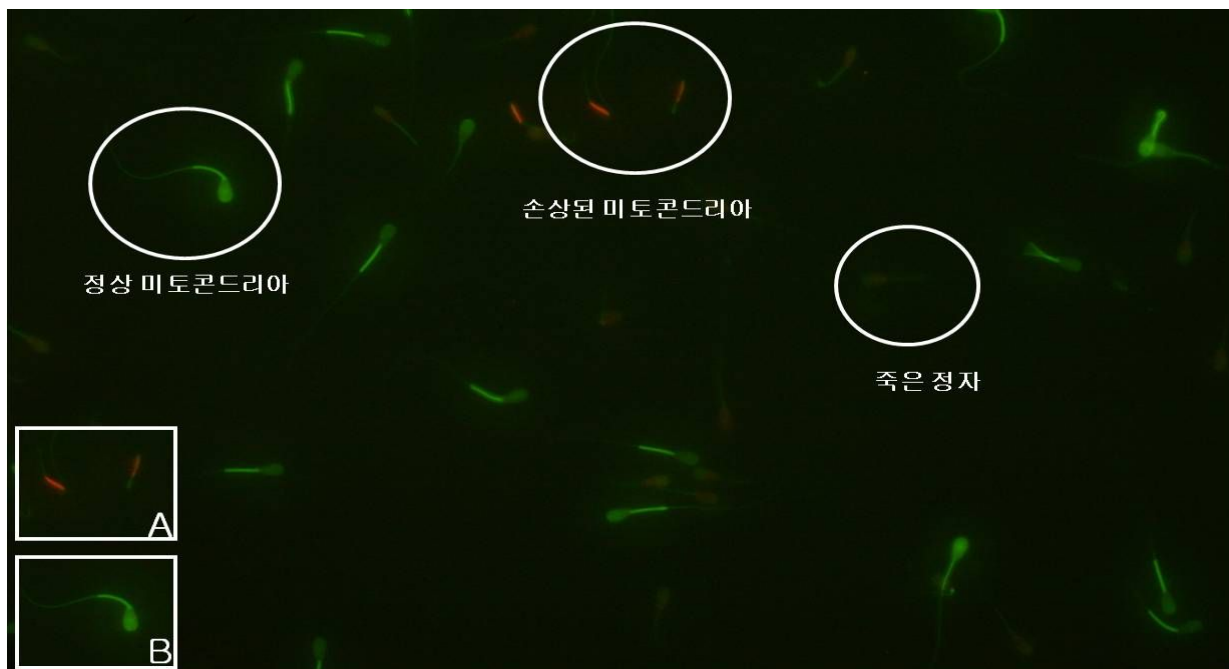


그림 18. 미토콘드리아 막기능정상성 검사를 위해 Rhodamin123으로 염색된 소 정자 모습

Acridine Orange 염색방법은 정자의 DNA 구조적 이상 유무를 분석하기 위한 방법으로 DNA 구조 중 2중구조에 손상유무를 확인 하기위한 검사이다. 그림 19에서 보이는 바와 같이 구조적 이상이 있는 정자의 경우 그린색이었던 Acridine Orange의 색이 오렌지색으로 변하는 것을 확인 할 수 있다.

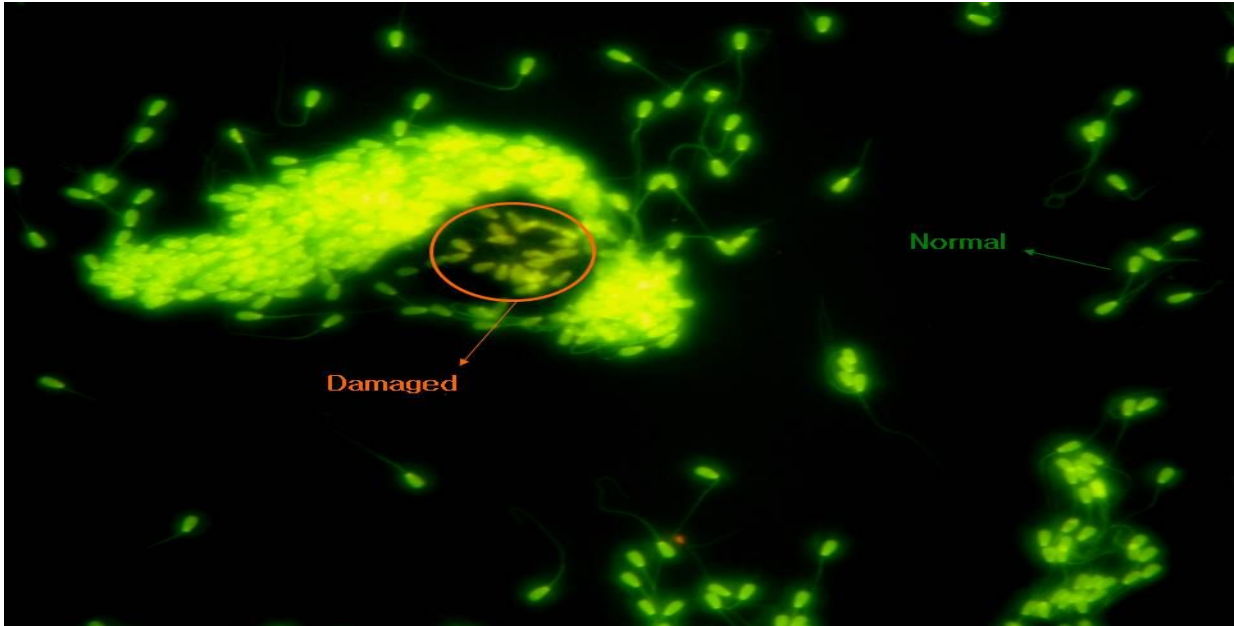


그림 19. 소 정자의 DNA 구조 손상분석을 위해 Acridine Orange로 형광염색한 모습

정자 막기능 강도 검사는 저삼투압 용액에 정자를 넣고 30분동안 정자가 저삼투압 환경에서 세포내 삼투상태를 유지하는 정자의 비율을 분석하기 위한 방법으로 세포막내 삼투압펌프의 기능에 대해 평가하기 위한 방법으로 용액 환경에 얼마만큼 잘 적응하는가를 평가 할 수 있다. 정상적인 정자의 경우 저삼투압 상황에 놓이면 정자의 꼬리 끝이 그림 20에서 같이 원으로 말리게 되고, 삼투압조절능력이 상실된 정자의 경우 꼬리 끝이 퍼진 상태를 나타나게 된다.



HOST 용액에 담겨진 정자 중 저 삼투압에 저항성을 가진 정자로 정자 강도 측정시 살아있는 정자의 경우 이와 같이 꼬리가 둥그렇게 말려 있는 현상을 보인다.

HOST 용액에 담겨진 정자 중 저 삼투압에 의해 사멸된 정자의 모습으로 꼬리가 직선으로 퍼져 있는 모습을 나타낸다.

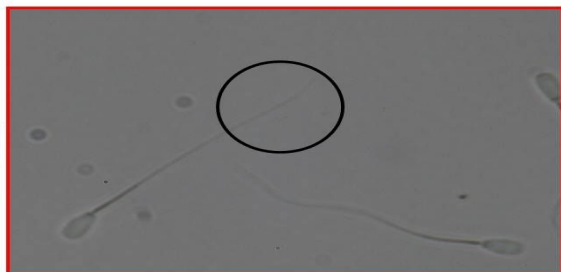


그림 20. 소 정자의 막기능 강도 검사를 위해 저삼투압 용액에서 30분동안 배양시킨 정자의 모습

3) 정액 동결보존

신선한 계란을 깬 후 노른자만을 분리하여 거름종이에 넣고 노른자를 제외한 주변의 흰자를 제거한 후 노른자의 막을 뚫어 속의 난황만을 뽑아서 비이커에 담는다. 1000 ml 메스실린더에 난황 250 ml와 준비한 750 ml의 증류수를 넣어 섞어준 후, 혼탁액을 원심분리기(15000rpm, 40분)를 이용하여 상층액과 난황단백질이 분리되도록 한다. 1000 ml의 메스실린더에 난황과 증류수의 혼합물 750 ml와 Triladyl 250 ml를 넣어 교반한다. 거품 없이 혼합이 잘 되도록 교반한 후, 4°C에서 사용 전까지 냉장보관하고 사용 시에는 여과하여 정액 희석에 사용한다. 정액을 채취한 후 준비된 동결액을 정액과 1:1이 되도록 동량으로 희석하여 4°C에서 하루 동안 정치시킨 후 정액 동결 시, 천천히 섞어주면서 동결액을 이용하여 1.0×10^7 이 되도록 희석시켜준다. 희석정액을 0.5 ml straw에 넣고 pre-freezing을 실시한 후, LN₂에 침지한다.

2. 연구결과

표 17에 나타난 것처럼 총 20개체의 종모우 정액 성상 검사를 실시하였다. 1개체 당 최대 10번의 반복 실험 또는 최소 4회의 성상 검사를 실시하였으며, 성상검사결과를 바탕으로 정액 동결 유무를 판단하였다. 표 18은 정액 성상검사 결과를 통해 선발된 종모우 중 5개체의 정액 채취 정보를 나타낸 표이다. 정액 채취 간격에 따른 정액량 및 정자 농도의 차이를 알 수가 있다.

표 17. 횡성한우 브랜드의 1차 종모우 선발을 위한 후보종모우의 정자 성상분석 결과

개체 번호	생존율	미토콘드리아 정상기능율	DNA 구조 손상율	첨체상태			첨체 반응율	기형율	정자 강도측정
				F	B	AR			
(2)	28.5	97.72	0.7	15.5	76.75	7.75	87.56	9.83	22.4
	32.7	97.00	0.46	45.98	45.61	8.41	67.14	4.6	32.45
	33.6	95.41	0.01	45.57	65.13	10.7	45.84	9.21	25.22
	40.1	97.68	0.51	55.79	52.31	8.1	75.63	6.83	43.86
(3)	23.39	95.62	99.14	39	54.75	6.25	90.39	6.25	14.4
	23.68	94.52	99.76	68.17	43.26	11.43	78.23	7.85	23.56
	44.46	97.6	99.76	69.91	43.23	13.14	77.62	5.58	33.34
	53.26	98.56	99.71	44.85	60.75	5.6	78.88	9.1	54.24
183	22.7	98.8	1.7	24.3	60.5	15.2	10.7	6.8	33
	43.28	99.46		43.9	61.44	5.34	14.55	4.4	43.2
	55.41	94.67		43.63	63.13	6.76	16.57	4.8	44.12
	50.21	97.8		21.11	84.23	5.34	21	8	34.56
196	5.9	98.5	1.0	24	59.5	16.5	8.1	4.5	15
	25.3	99.46	0.02	53.97	52.46	6.43	35	5.2	45
	26.7	98.47		50.25	58.66	8.91	46	6.6	43.2
	33.17	96.53		56.82	49.12	5.94	44.2	6.78	40.1
206	76	95.7	1.24	47	49	4	87.48	6	61
	84.25	98.7	0.27	66.05	43.86	9.91	77.84	7.2	64

	65.13	99.1		65.85	44.15	10	66.95	6.3	50
	66.7	97.6		41.97	67.53	9.5	79.53	9.2	57
465	84.3	97.3	1.43	28.3	65	6.7	89.32	4.2	61
	88.64	98.46	0.79	41.33	68.13	9.46	64.55	5.3	53.3
	70.59	99.10		66.5	43.5	10	64.35	6.2	44
	77.86	95.05		61.6	46	7.6	70.1	4.8	62.2
2035	56.9	98.8	2.6	43.5	50	6.5	6.0	4.5	44
	57.3	96.6	1.3	58	50.7	8.7	32.5	5.6	47
	48.6	95.6		60.48	48.7	9.18	33.6	7.8	53
	60.2	97.3		55.46	50	5.46	30.1	5.8	67
	67.3	95.4		56.3	46.8	3.1	35.8	4.9	60
0846	74.68	99	0	46	50.7	3.3	98.2	5.2	49
	75.3	94.8	0.2	50.7	48.7	0.6	75.7	2.7	54.7
	73	97.3		40.3	50.7	9	84.62	1	39
	82.3	97.3		41.3	46.4	12.3	99.50	5.33	42
	83.67	95.33		43.67	51	5.33	98.63	1	72.33
	84.67	90.45		29.33	63.67	7	86.26	7.33	48
	72.67	92.34		46.67	45.33	8	49.1	3.67	19
	40.67	65.67		34	55	11	33.77	4.67	26
3010	50.27	90.15	1.16	20.15	71.75	8	42.39	13.44	24
	65.5	99.5	4.7	17.5	77.3	5.2	8.7	5	46
	86	98		58.3	38.4	3.3	89.7	4	42.75
	81	95.3		46	45.3	8.7	98.92	4.33	32
	78.7	96		51.3	47.3	1.4	96.2	5.3	61.3
	82.33	91.67		55	39.67	5.33	71.64	3	59.75
	74.67	93.33		38	53	9	8.33	10.67	52.33
8806	71	99.25	0.43	55.7	42.3	2	92.19	3	39.5
	74.6	96.35	0.3	61.82	43.78	5.6	81.23	4.5	46.3
	81.69	94.46		51.39	56.21	7.6	67.42	3.6	48.5
	75.8	95.63		41.67	67	8.67	72.48	5.6	58.8
8807	44.4	98.43	0.49	41.3	52.4	6.3	22.52	4.33	17.8
	31.25	97	0.47	40.3	49.7	10	87.76	4.4	9
	63	96.67	0	23.7	72.7	3.6	90.6	6.2	44.75
8808	72.5	98.5	0	42	56	2	100	6.6	48.8
	76.5	89.7		64.77	43	7.77	78.5	7.1	46.8
	81.3	91.6		59.17	48.63	7.8	88.4	6.8	47.5
	88.5	97.6		55.63	52.37	8	81.9	8.7	43.0
8809	79.25	97.33	0.62	27	70	3	95.81	6.2	35.25
	74.6	97.6		36	71	7	71.19	6.4	44.8
	69.54	98.5		45.1	60.3	5.4	80.9	10.5	51.2

	78.3	97.9		49.88	56.35	6.23	72	11.1	67.2
8777	76.5	98.83	0.85	52.7	43.5	3.8	16.62	6.67	78.7
	64.7	99		54.3	45.3	0.4	71.4	2	50
	75.6	95.3		52	45	3	84.95	0.67	40
	80	95.33		54	43.33	2.67	98.19	2	72
	83.33	94.67		52	44.67	3.33	89.53	7	64.33
	81.33	90		15	83.33	1.67	80.95	10	40.67
	80	93		32.67	66.33	1	78.60	6.33	47
8778	48.5	99	1.1	50.7	38.3	11	43.9	6.4	34.4
	32.5	97.4	1.1	16	76.7	7.3	7.2	5	18.5
	20.02	99.50	0.4	46.7	49.7	3.6	30.62	5.5	11.2
	20.3	97.5		51.21	55.48	6.69	44.63	7.3	32.16
8779	69.2	96	1.63	46.5	50	3.5	10.85	8.8	63
	63	97.67	0	23.3	73.7	9	89.08	5.2	37
	73.9	94.6		42	67.53	9.53	45.68	7.6	48
	69.67	98.2		80.27	25.34	5.61	55.68	4.8	46
8780	38.3	97.7	0.8	39.3	46.7	14	39.9	6.6	38
	44.6	97.8	0.4	57.7	45.61	3.31	26.58	4	30
	53.25	98.15	0.8	40.3	50	9.7	5.36	4.75	21
	77.64	98.8		61.57	44.43	6	65.48	4.8	48
	80.13	97.63		56.46	52.34	8.8	64	8	50
8918	76			13	76	11		22	
	60.25	94.25	0.44	19.7	72.3	8	58.29	4	22.2
	62.7	87.3		33.7	59.3	7	42.2	6.7	26
	79.7	98.7		45.7	49.3	5	12.2	7	35.3
				45.78	60.12	5.9			
8919	73	94.16	0.14	29.5	64.5	6	53.26	16.7	48.3
	71.2	96.8	0.36	52.34	53.23	5.57	53.6	10.3	58
	70.6	99.18		52.78	55.68	8.46	66.58	9.7	53.2
	68.4	97.36		46.16	59.84	6	61.4	7	55
8920	79	97.7	0.01	41.3	54.7	4	88.9	8.3	25.75
	70.86	84.67		52.33	44	3.67	88.93	11	40.67
	77.33	89		34.33	64.33	1.34	51.74	7.67	42.33
	78.67	92.33		34	64.67	1.33	74.20	9.67	46.33
	70.67	96.67		48.33	40.67	11	41.58	10.83	36.67
	77.3	87.7		55.3	41.3	3.4	61.9	5	27.3
	83	99		45.7	49.3	5	11.2	8	47
	81	97.3		47.7	48.3	4	22.1	6.7	57.3
	79.3	93.7		59.7	37	3.3	81.3	9	50
	83.4	97.6		61.84	47.66	9.5	82.3	7	51

표 18. 1차 후보종모우의 정액 채취

개체번호	정자농도 (/ml)	총 정자수 (/ml)	채취량 (ml)
0846	6.33×10^8	5.7×10^9	9
	4.91×10^8	2.21×10^9	4.5
	1.8×10^9	6.3×10^9	3.5
	6.75×10^8	1.35×10^9	2
	7.95×10^8	3.4×10^9	4.2
	3.45×10^8	2.07×10^9	6
	6.75×10^8	2.07×10^9	7
	3.42×10^8	2.07×10^9	4.3
	5.52×10^8	2.07×10^9	4.5
	7.12×10^8	2.07×10^9	6.1
	4.85×10^8	2.07×10^9	5.8
3010	1.41×10^9	8.46×10^9	6
	6.25×10^8	3.75×10^9	6
	6.2×10^8	4.96×10^9	8
	2.75×10^8	1.65×10^9	6
	4.43×10^8	1.65×10^9	4
	5.5×10^8	1.65×10^9	6
	4.74×10^8	1.65×10^9	8
	8.35×10^8	1.65×10^9	5
	6.1×10^8	1.65×10^9	4
8777	8.67×10^8	5.2×10^9	6
	3.72×10^8	2.42×10^9	6.5
	1.75×10^8	1.75×10^9	10
	8.5×10^8	2.72×10^9	3.2
	5.9×10^8	3.84×10^9	6.5
	3.9×10^8	3.51×10^9	9
	7.7×10^8	1.65×10^9	4
	6.5×10^8	1.65×10^9	5.2
	4.1×10^8	1.65×10^9	6
	4.3×10^8	1.65×10^9	7
	2.54×10^8	1.65×10^9	5
8918	1.5×10^9	1.05×10^{10}	7
	3.05×10^9	1.07×10^{10}	3.5
	4.3×10^8	1.07×10^{10}	6
	4.58×10^8	1.07×10^{10}	4
	6.8×10^8	1.07×10^{10}	5
	2.3×10^8	1.07×10^{10}	3.4
	3.0×10^8	1.07×10^{10}	7.1
	5.7×10^8	1.07×10^{10}	5
	2.6×10^8	1.07×10^{10}	5.1
	5.42×10^8	1.07×10^{10}	4
8920	1.69×10^9	1.01×10^{10}	6
	5.5×10^8	2.86×10^9	5.2
	4.75×10^8	3.8×10^9	8
	6.15×10^8	4.92×10^9	8
	1.09×10^9	1.31×10^{10}	12

1.3×10^y	1.82×10^{10}	14
2.25×10^y	1.35×10^{10}	6
5.9×10^y	2.95×10^{10}	5
1.85×10^y	1.02×10^{10}	5.5
2.78×10^y	1.02×10^{10}	4.3
3.46×10^y	1.02×10^{10}	3
5.1×10^y	1.02×10^{10}	6.1
2.4×10^y	1.02×10^{10}	2.1
3.47×10^y	1.02×10^{10}	4
4.41×10^y	1.02×10^{10}	4.3
3.52×10^y	1.02×10^{10}	5
4.6×10^y	1.02×10^{10}	7

표 19와 20은 최종적으로 선발된 종모우의 정자 성상 검사 결과를 나타낸 표이다. 실험은 5회 이상 반복실험을 실시하여 결과를 도출해내었다. 생존율의 경우 0846, 3010, 8777 개체가 8778과 8807 개체와 비교하여 유의적으로 높게 나타났으며 정자강도 검사의 결과에는 8777 개체가 56.2 ± 11.6 으로 가장 높게 관찰되었다($p < 0.05$). 미토콘드리아 정상기능율과 기형율 검사에서는 5개체 모두 유의적인 차이가 발견되지 않았다($p < 0.05$; 표 20). 표 20의 침체반응율 검사에서 8778 개체가 유의적으로 가장 낮게 관찰되었으며 침체상태 검사에서는 모두 유의적인 차이가 인정되지 않았다($p < 0.05$)

표 19. 수정관이식에 의해 태어난 횡성한우 브랜드 종모우 정액의 생존율, 미토콘드리아 정상 기능율, 기형율 및 정자강도 분석에 대한 정자 성상검사 결과

개체번호	반복수 (n)	생존율	미토콘드리아 정상기능율	기형율	정자강도
0846	5	76.3 ± 2.1^a	97.1 ± 0.9	3.6 ± 1.0	46.2 ± 3.5^{ab}
3010	5	70.7 ± 8.1^a	95.7 ± 2.1	6.7 ± 2.3	36.2 ± 5.0^{abc}
8777	5	72.3 ± 3.8^a	97.7 ± 1.2	3.1 ± 1.8	56.2 ± 11.6^a
8778	5	28.4 ± 12.9^b	98.6 ± 0.6	5.6 ± 0.4	21.4 ± 6.8^c
8920	5	46.2 ± 9.2^b	97.4 ± 0.5	5.0 ± 0.6	23.8 ± 10.8^{bc}

(Mean±SEM, $p < 0.05$)

표 20. 수정란이식에 의해 태어난 횡성한우 브랜드 종모우 정액의 침체반응을 및 침체상태에 대한 정자 성상검사 결과

개체번호	반복수 (n)	침체 반응율	침체상태		
			F	B	AR
0846	4	89.5 ± 5.7 ^a	44.6 ± 2.4	49.1 ± 1.0	6.3 ± 2.7
3010	4	59.9 ± 21.1 ^{ab}	35.5 ± 10.0	58.2 ± 9.6	6.3 ± 1.2
8777	4	57.7 ± 20.9 ^{ab}	53.0 ± 0.7	44.6 ± 0.6	2.4 ± 1.0
8778	4	27.2 ± 10.7 ^a	37.8 ± 11.0	54.9 ± 11.4	7.3 ± 2.1
8920	4	67.0 ± 22.2 ^{ab}	35.1 ± 5.7	58.3 ± 7.3	6.6 ± 1.9

(Mean±SEM, p<0.05)

F : 수정능획득이 일어나지 않은 정자, B : 수정능이 획득된 정자, AR : 침체반응이 일어나 수정능이 없는 정자

1차 선발된 후보 종모우들 중 정자 성상 검사 결과를 바탕으로 동결정액을 제조하여 보존하였다(표 21). 또한 제조된 동결정액을 용해하여 동일한 방법으로 정자 성상 검사를 실시함으로써 동결시스템을 확립하고자 하였다(표 22와 23).

표 21. 1차 선발된 종모우와 동결정액 생산량

종모우	동결정액 생산 (스트로우/개)	
도체중형	009830107	420
	009787798	230
	009788073	560
	009788081	400
	009789183	460
	009789191	400
	009789206	680
	009788065	340
근내지방형	009787802	420
	009808465	170
	009788090	400
종합형	009787780	460
	009787771	400

표 22. 수정란이식에 의해 태어난 횡성한우 브랜드 종모우 정액의 생존율, 미토콘드리아 정상 기능을, 기형율 및 정자강도 분석에 대한 동결 용해 후 정자 정상검사 결과

개체번호	반복수 (n)	생존율	미토콘드리아 정상기능율	기형율	정자강도
0846	3	73.6 ± 4.2 ^a	96.4 ± 1.8	4.6 ± 2.3	47.9 ± 5.4 ^{ab}
3010	3	75.6 ± 11.4 ^a	97.5 ± 8.3	6.6 ± 4.8	44.8 ± 4.9 ^{abc}
8777	3	73.3 ± 8.6 ^a	98.4 ± 4.2	7.1 ± 9.8	51.1 ± 3.7 ^a
8778	3	34.5 ± 2.7 ^c	96.5 ± 2.4	2.3 ± 11.2	34.8 ± 4.4 ^c
8920	3	67.4 ± 10.2 ^b	97.7 ± 4.2	6.2 ± 1.1	41.5 ± 8.4 ^{bc}

(Mean±SEM, p<0.05)

표 23. 수정란이식에 의해 태어난 횡성한우 브랜드 종모우 정액의 침체반응율 및 침체상태에 대한 동결 용해 후 정자 정상검사 결과

개체번호	반복수 (n)	침체 반응율	침체상태		
			F	B	AR
0846	3	78.1 ± 3.5 ^a	57.7 ± 4.2	45.6 ± 5.3	3.3 ± 2.6
3010	3	67.7 ± 7.1 ^{ab}	58.1 ± 9.5	50.6 ± 7.6	8.7 ± 3.1
8777	3	67.7 ± 10.1 ^{ab}	55.5 ± 4.1	50.0 ± 4.6	5.5 ± 3.7
8778	3	66.5 ± 8.5 ^a	51.2 ± 9.7	55.5 ± 10.1	6.3 ± 6.8
8920	3	71.4 ± 3.3 ^{ab}	46.1 ± 9.1	59.4 ± 5.6	6.5 ± 4.6

(Mean±SEM, p<0.05)

F : 수정능획득이 일어나지 않은 정자, B : 수정능이 획득된 정자, AR : 침체반응이 일어나 수정능이 없는 정자

○ 종모우 동결정액의 농가 보급

1. 재료 및 방법

1차 선발된 종모우로부터 생산된 동결정액을 이용하여 횡성축협에서 지정한 시험농가의 번식우를 대상으로 인공수정을 실시하였다. 인공수정은 자연발정 번식우를 대상으로 이루어졌으며, 총 5군데의 시험농가에서 인공수정 및 재발정 여부를 통한 수태율 조사가 이루어졌다.

2. 연구 결과

표 24. 횡성 관내의 지정농가로의 동결정액 보급 현황

농가명	정액번호 (유전자 타입)	총 수정 두수 (두)	수정 횟수 (두)		수태율* (%)
			1회	2회	
A	0846 (근내지방형)	31	25	6	81
B	8777 (종합형)	55	34	21	62
C	3010 (도체중형)	83	55	28	66
D	8920 (등심단면적형)	45	30	15	67
	3010 (도체중형)	39	28	11	72
E	0846 (근내지방형)	43	35	8	81
	8777 (종합형)	30	24	6	80
합계		326	231	95	71

*수태율 = 1회 수정두수 / 총 수정두수

총 5개의 농가를 대상으로 총 326개의 횡성한우 브랜드 종모우의 동결 스트로가 공급되어 인공수정에 이용되었다(표 24). 이 중, 95개체가 재발정이 관찰되었다. 수태율의 계산은 총 인공수정시킨 번식우에 대해 1회 수정 후 재발정이 관찰되지 않은 개체를 대상으로 하여 이루어졌다. 5농가의 평균 수태율은 71%로 관찰되었고, 농가마다 수태율에 대한 큰 편차가 발생하였다. A농가와 E농가에 보급된 0846 종모우(근내지방형) 정액의 경우 81%로 가장 높은 수태율을 기록한 반면, B농가에 보급된 8777 종모우(종합형) 정액의 경우 62%로 가장 낮은 수태율을 보여주었다. 하지만 농가별로 분류하였을 때에, 수태율에 큰 편차가 발생하는 것으로 보아 본 실험결과의 수태율은 정액보다 각 농가의 번식우 사양환경에 의한 영향이 크게 작용했다고 판단된다.



그림 21. 황성한우 브랜드 종모우 정액의 인공수정에 의해 태어난 산자

○ 발정동기화 기술의 최적화

1. 재료 및 방법

1) 공란우의 과배란 처리 및 수정란 채란

공란우의 과배란을 유도하기 위해 CIDR-plus(InterAg, Hamilton, New Zealand)를 질 내에 삽입 후 7일째부터 FSH 제제인 Folltropin[®]-V(Vetrepharm, Canada)을 투여한다. 200 mg의 FSH 처리군은 총 FSH 200 mg을 40 mg, 30 mg, 20 mg, 10 mg의 용량으로 1일 오전, 오후 각 2회씩 점감법으로 주사하여 총 8회, 12시간 간격으로 근육 주사를 하고, 400 mg의 FSH 처리군은 총 400 mg의 FSH를 80 mg, 60 mg, 40 mg, 20 mg의 1회 투여 용량으로 나누어 동일한 방법으로 공란우에게 투여한다. FSH 투여 3일 후에 모든 처리군의 CIDR-plus를 제거하고 PGF_{2α} 제제인 Lutalyse(Pharmacia & Upjohn, USA)를 25mg 주사하였으며, FSH 투여 완료 후에 12시간 간격으로 인공수정을 2회 실시하고, GnRH 제제를 250 µg 주사하였다. 인공수정 7일 후, 수정란 채란을 위해 공란우의 제2, 3 미추사이에 2% lidocaine hydrochloride 5 ml로 점감적 주사를 통해 경막의 국소마취를 실시하고, balloon catheter를 자궁선단부에 주입 및 장착하여 수정란 채란을 실시하였다(그림 27).

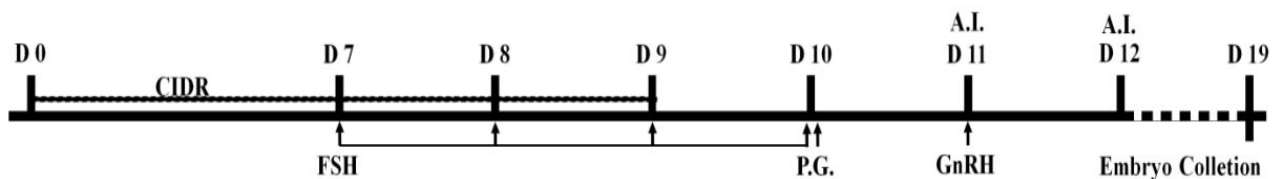


그림 27. 한우의 공란우 과배란 처리 방법

2) 수정란의 평가

Complete flush solution(Bioniche Animal Health, Canada)으로 자궁을 관류하여 수정란을 채란하고, EmCon-Filter(Kruuse, Marslev, Denmark)로 여과하여 실체 현미경(Olympus, Japan)하에서 수정란을 회수한다. 회수된 수정란은 국제수정란이식학회의 수정란 평가 기준 (IETS)에 따라 1등급(excellent or good)과 2등급 (fair)으로 평가, 분류된 수정란만을 선별하였다.

2. 연구 결과

1) FSH 투여 용량에 따른 공란우의 황체 개수와 수정란 회수율

FSH 200mg 투여군과 400mg 투여군간의 과배란 처리에 따른 평균 황체 개수의 결과는 표 25와 같다. 두 투여 용량 간 과배란 처리에 의해 생성된 평균 황체 개수는 200 mg의 FSH 용량이 400 mg의 FSH 용량보다 유의적으로 높은 값을 나타냈다(20.9 ± 1.20 vs 15.8 ± 0.63 , $p < 0.05$). 또한, 왼쪽 및 오른쪽에 위치한 난소별 비교에서도 200 mg의 FSH 용량이 400 mg의 FSH 용량보다 평균 황체 개수가 유의적으로 높게 나타났다(9.7 ± 0.65 vs 7.4 ± 0.30 , 11.3 ± 0.78 vs 8.4 ± 0.45 , $p < 0.05$). 하지만 동일한 처리군 내에서 왼쪽 및 오른쪽에 위치한 난소별 생성된 황체 개수에서는 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 수

정란 채란 결과, 총 회수된 수정란이 200 mg의 FSH 처리군에서는 평균 18.2 ± 1.18 개로 관찰되었고, 이 중 이식 가능한 수정란의 평균 개수는 14.1 ± 1.12 개로 관찰되었다. 반면, FSH 400 mg의 처리군에서는 총 회수된 수정란의 평균 개수는 12.3 ± 0.52 개이며, 이식 가능한 평균 수정란 개수는 6.8 ± 0.33 개로 모두 200 mg의 FSH 처리군보다 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 평균 황체 개수에 대한 총 회수된 수정란의 평균 개수 비율은 200 mg과 400 mg의 처리군에서 각 $86.9 \pm 1.90\%$ 와 $78.0 \pm 0.49\%$ 로 200 mg의 FSH 처리군에서 유의적으로 높게 관찰되었고($p < 0.05$), 평균 황체 개수에 대한 이식 가능한 수정란의 평균 개수 비율 또한 $67.1 \pm 2.66\%$ 와 $43.2 \pm 1.40\%$ 로 200 mg의 FSH 처리군이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 평균 황체 개수가 200 mg에서 더 높게 나타나는 점이 특이점으로 관찰되었는데, 외래종의 소들과 달리 한우는 더 작은 체구를 가지며 FSH에 대한 감도 또한 다르다고 생각된다. 기존의 400 mg 방법은 유우에서 사용되던 방법을 가져와 접목시킨 것이 현재까지 이용되고 있는 것으로서, 본 연구에서는 200 mg과 400 mg의 FSH 농도를 사용하여 한우에서의 적정 FSH 농도를 얻어 내고자 하였고 결론적으로 200 mg에서 더 효율적인 결과를 도출할 수 있었다. 한 예로, 70 %의 에탄올이 90 %의 에탄올보다 멸균에 더 효과적이라는 사실은 널리 알려져 있다. 수치상으로 보이는 것이 전부라 아니듯이, 본 연구의 결과 또한 그러한 맥락으로 이해되어야 한다고 판단된다.

표 25. 한우에서 200 mg과 400 mg의 FSH 농도에 의한 과배란 처리 효과 비교

FSH level	No. of corpus luteum			Embryo recovery		Transferable embryos	
	Left	Right	Total	No. of recovered embryos	Rate of recovered embryos/CL	No. of transferable embryos	Rate of transferable embryos/CL
200 mg	9.7 ± 0.65^a	11.3 ± 0.78^a	20.9 ± 1.20^a	18.2 ± 1.18^a	86.9 ± 1.90^a	14.1 ± 1.12^a	67.1 ± 2.66^a
400 mg	7.4 ± 0.30^b	8.4 ± 0.45^b	15.8 ± 0.63^b	12.3 ± 0.52^b	78.0 ± 0.49^b	6.8 ± 0.33^b	43.2 ± 1.40^b

Values with different superscripts differ significantly (Mean \pm SEM, $p < 0.05$).

2) FSH 투여 용량에 따른 수정란 채란 성적

표 26은 과배란 처리 방법에 따른 수정란 채란성적을 나타낸 결과로서, 총 회수된 수정란에 대한 이식 가능한 수정란의 비율을 보여주는 표이다. 총 회수된 수정란 중 수정란 이식에 사용할 수 있는 수정란은 200 mg 및 400 mg의 FSH 처리군에서 $77.27 \pm 2.75\%$ 및 $55.38 \pm 1.76\%$ 로 나타나, 200 mg의 FSH 처리군에서 채란 효율이 유의적으로 더 높다는 것을 알 수 있었다($p < 0.05$).

이식 가능한 수정란들의 발달 단계를 조사하여, 그 결과를 표 27에 나타내었다. 200 mg 처리군에서는 상실배 단계의 평균 수정란 개수는 8.3 ± 0.76 개, 초기 배반포와 확장 배반포 단계의 수정란은 각각 4.7 ± 1.19 개와 1.2 ± 0.40 개로 관찰되었다. 400 mg의 처리군의 경우, 상실배 단계의 수정란만이 2.0 ± 0.26 개로 200 mg의 처리군과 비교하여 유의적으로 낮게 나타났고($p < 0.05$), 초기 배반포와 확장 배반포 단계의 수정란에서는 각각 2.9 ± 0.18 개 및 1.9 ± 0.17 개로 유의적인 차이가 발견되지 않았다.

표 26. 한우에서 200 mg과 400mg FSH 농도에 의한 과배란 처리 시, 수정란 회수율 비교

FSH level	No. of donors	No. of recovered embryos	No. of transferable embryos	Rate of transferable embryos /recovered embryos
200 mg	15	18.2±1.18 ^a	14.1±1.12 ^a	77.27±2.75 ^a
400 mg	15	12.3±0.52 ^b	6.8±0.33 ^b	55.38±1.76 ^b

Values with different superscripts differ significantly (Mean±SEM, p<0.05).

표 27. 한우에서 200 mg과 400 mg FSH 농도에 의한 과배란 처리 시, 이식가능한 수정란 개수

FSH level	No. of transferable embryos	Developmental stages of embryos for E.T		
		Morula	Early blastocysts	Expanded blastocysts
200 mg	14.1±1.12 ^a	8.3±0.76 ^a	4.7±1.19 ^a	1.2±0.40 ^a
400 mg	6.8±0.33 ^b	2.0±0.26 ^b	2.9±0.18 ^a	1.9±0.17 ^a

Values with different superscripts differ significantly (Mean±SEM, p<0.05).

본 연구에서는 공란우의 호르몬 처리 방법에 따른 공란우의 발정 주기, 평균 황체 개수, 총 회수된 평균 수정란 개수 및 이식 가능한 평균 수정란 개수, 회수된 수정란들의 발달 단계에 대하여 조사하였다. 과배란 처리 방법에 따른 공란우의 난소 반응 및 수정란 회수 결과를 살펴보면 200 mg의 FSH level을 투여하였을 때에 평균 20.9±1.20개의 황체가 생성되었고, 평균 18.2±1.18개의 수정란이 회수되었다. 이러한 결과는 400 mg의 FSH level을 과배란 처리에 이용한 방법보다 높은 결과인데, 이러한 결과는 한우에서 더 적은 농도의 FSH 호르몬만으로도 이식에 충분한 개수의 수정란을 과배란을 통해 생산할 수 있다는 점을 시사해준다. 최 등(2007)은 CIDR 및 PEG에 용해시킨 FSH 200 mg 1회 투여 방법이 기존의 400 mg의 FSH 다회 투여 방법과 비교해 큰 차이가 없다고 보고한 바 있고, 반복채란의 경우 본 연구와 투여 방법이 다르지만 200 mg의 FSH 용량을 과배란 처리에 이용하였을 경우, 반복채란을 위한 과배란 처리를 1개월 간격으로 하여도 과배란 효과를 얻을 수 있었다는 연구 결과 또한 보고된 바 있다(신 등, 2009). 하지만 반복채란의 경우 과배란 처리로 인한 황체 생성이 감소한다고 보고된 바 또한 있다(신 등, 2009; Son 등, 2007). 이러한 결과들은 한우에서 200 mg의 FSH 농도에 의한 과배란 효과가 나타난 본 실험의 결과와 일치하는 부분이며, FSH 200 mg의 사용은 호르몬의 남용으로 인한 부작용, 즉 호르몬 내성과 같은 공란우의 감수성 저하, 체내 호르몬 불균형으로 인한 발정재귀 지연과 같은 번식 장애(Shea 등, 1984; Murphy 등, 1984) 등의 위험을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 반복채란을 위한 휴식기를 절감시킬 수 있을 것이라 생각된다.

Lafri 등(2002)에 의하면 과배란 처리 전에 CIDR를 삽입하고 제거하면서 발정을 유도시켰을 경우와 자연 발정 주기 중에 과배란 처리를 시작하여 PGF_{2α} 투여로 황체를 퇴행시키면서 발정을 유도시켰을 때 총 회수된 수정란 수는 11.2개와 11.1개이며, 이식 가능한 수정란 수는 5.8개와 6.1개로 유의적인 차이가 없었다고 하였다. 본 실험에서도 발정주기를 고려하지 않고 무작위로 공란우를 선발하여 실험에 이용하였는데, FSH 200 mg 및 CIDR 전 처리에 의한 과배란 처리가 난소 반응, 수정란 회수율과 이식 가능한 수정란 수에서 개체별 유의적인 차이를 보이지 않으므로 공란우의 채란 시점과 수란우의 이식 시기를 일치시킬 수 있는 CIDR의 전 처리가 과배란 처리에 있어 유용한 방법으로 사료된다.

결론적으로 CIDR의 전 처리와 FSH 200 mg의 투여가 난소 반응과 회수되는 수정란의 개수와 체내 수정란 생산 효율에 있어서 400 mg의 처리군보다 좋은 효과를 얻을 수 있었다. Dattena 등(1994)의 보고에서는 암양에 p-FSH 16 mg을 30% PVP 용액에 용해시켜 1회와 다회 투여 후 8.6개와 7.8개의 황체 개수를 보고하였는데, 다른 종인 특성을 고려해 봐야 하지만 한우보다 훨씬 적은 양의 16 mg의 FSH 농도에서도 과배란 효과가 나타나는 것을 알 수 있다. Son 등(2007)은 FSH 28 mg 투여시의 평균 황체수가 본 연구의 평균 황체 개수보다 적은 7.9 ± 10 개, 총 24 mg 투여시 8.3 ± 1.1 개로서 두 투여 용량간의 유의적인 차이가 없다는 결과도 보고된 바 있다. 이와 같은 결과들의 차이는 실험에 사용된 FSH 투여 용량에 따른 난소 반응의 차이로 생각이 되며, 품종과 환경을 고려하여 알맞은 FSH의 농도의 사용이 필요할 것으로 보인다. 고가의 FSH 비용을 줄임으로써 과배란 처리 비용과 수정란 생산 단가를 낮출 수 있고, 이러한 결과는 수정란 이식 사업이 보다 경쟁력을 갖추고 활성화시키는 데에 도움이 될 것이라고 생각된다. 또한, 발정 주기에 구애받지 않고 한 번에 여러 마리의 공란우를 과배란 처리를 할 수 있는 CIDR의 전 처리와 FSH 200 mg을 투여한 과배란 처리 방법이 보다 경제적, 효율적이며 축산 현장에서 적용하기에 매우 유용한 방법이라고 판단된다.

○ 다배란 유기에 의한 수정란 회수기술 개발

1. 재료 및 방법

1) 공란우의 과배란 처리

공란우의 과배란을 유도하기 위해 CIDR-plus(InterAg, Hamilton, New Zealand)를 질 내에 삽입 후 7일째부터 FSH 제제인 Folltropin[®]-V(Vetrepharm, Canada)를 투여하였다(그림 27). 공란우의 발정을 개시하기 위하여 총 FSH 200 mg을 40 mg, 30 mg, 20 mg, 10 mg의 용량으로 1일 오전, 오후 각 2회씩 점감적으로 주사하여 총 8회에 걸쳐 12시간 간격으로 근육 주사로 투여하였다. FSH 투여 3일째에 PGF₂α 제제인 Lutalyse(Pharmacia & Upjohn, USA)를 25 mg 1회 투여하고 모든 처리군의 CIDR-plus를 제거하였으며, FSH 투여 개시 후 5일째, 오전에 GnRH 제제(Fertagyl; Intervet Inc., Millsboro, NJ, USA)를 250 µg 투여하고, 12시간 간격으로 인공수정을 2회 실시하였다. 수정란의 채란은 2차 인공수정 7일 후에 2% lidocaine hydrochloride(리도카인, 제일제약) 5 ml를 투여하여 경부외막의 국소마취를 실시하고, ballon catheter를 자궁 내에 주입 및 장착하여 수정란 채란을 실시하였다.

2) 수정란 채란

기존의 수정란 채란 방법은 철심이 연결된 balloon catheter를 공란우의 자궁경을 통과시켜 자궁각에 위치하도록 하고, catheter가 자궁각에서 이탈되지 않도록 고정시킨다. 철심 제거 후, 3-way 방식은 3-way collection equipment(IMV, French)를 이용하고, 2-way 방식은 Y-tubing(Agtech, Manhattan, KS, USA)을 이용하여 complete flush solution(Bioniche Animal Health, Canada)과 balloon catheter를 연결하고, 수정란이 회수되는 부분으로 EmCon-Filter(Kruuse, Marslev, Denmark)를 연결한다. Y-tubing을 사용하여 관류액을 조절하며, 자궁내 순환관류법, 즉 자궁내로 관류액을 유입시키고, 다시 회수하는 방법을 반복적으로 실시하여 수정란을 회수하게 된다(Donaldson 등, 1983). 위 방법을 반복적으로 실시하여 수정란을 채란한다. 이에 반해, DEC(Direct Embryo Collection) 방법을 사용한 수정란의 채란은 Y-tubing 대신 50 ml 주사기를 사용하며, catheter의 장착이 완료된 후, 관류액이 채워진 일회용 60 ml 주사기를 catheter의 끝에 장착된 50 ml 주사기 어댑터에 연결하여 주사기를 통해 직접적으로 관류액을 주입하고, 다시 주사기로 회수하는 방법을 사용한다. 회수된 관류액은 EmCon-filter를 통해 여과시켜 수정란을 회수한다(그림 22, 23).



그림 22. 3-way(왼쪽), 2-way(가운데) 및 DEC(오른쪽) 방법에 사용되는 수정란 채란 장비



그림 23. DEC를 이용한 한우의 수정란 채란

3) 수정란 평가

Complete flush solution(Bioniche Animal Health, Canada)으로 자궁내를 관류하여 회수된 관류액은 EmCon-Filter(Kruuse, Marslev, Denmark)로 여과하여 실제 현미경(Olympus, Japan)하에서 수정란을 수집한다. 수정란은 국제수정란이식학회(IETS)의 수정란 평가 기준(Stringfellow와 Seidel, 1998)에 따라 1등급(excellent or good)과 2등급(fair), 3등급(poor)과 4등급(dead or degenerating)으로 평가, 분류하였고, 1등급 및 2등급으로 분류된 수정란은 이식 가능한 수정란, 3등급 및 4등급으로 분류된 수정란을 이식 불가능한 수정란으로 판별하였다.

4) 결과 도출

각 수정란 채란 방법에 의해 회수된 총 수정란 개수와 이식 가능한 수정란 개수를 조사하였으며, 수정란 채란을 위해 catheter를 자궁 내로 삽입하고 장착하는 시기부터 채란 기술을 마친 후, catheter를 자궁으로부터 제거하는 시기까지를 기술시간으로 계산하였으며, 기술에 소모된 관류액의 양은 1 L 단위로 관류액을 사용하여 기술을 마친 후, 남아 있는 관류액의 양을 계산하여 도출하였다. 또한 수정란 채란에 필요한 최소인원 및 공란우의 보정 여부를 조사하였다.

2. 연구결과

표 28은 3-way 및 2-way를 이용한 기존의 채란 방법과 본 실험에 사용된 DEC를 이용한 1-way 방법을 비교한 것으로 채란 효율성을 나타낸 결과이다. 수정란 채란 방법으로 분류된 실험 처리군별로 수정란 채란이 이루어졌고, 총 회수된 수정란 평균 개수, 이식 가능한 수정란 평균 개수 및 채란 효율성에 대한 결과를 조사하였다. 그 결과, 총 회수된 수정란의 평균 개수는 3-way, 2-way 및 DEC(1-way) 방법에서 각각 11.25 ± 0.63 , 12.5 ± 0.65 , 11.75 ± 0.48 개로 관찰되어 상호간의 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 이식 가능한 수정란의 평균 개수 또한 처리군별로 각각 6.25 ± 0.48 개, 7.25 ± 0.48 개, 7.25 ± 0.63 개로 관찰되어 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 얻어진 결과를 통해 채란 효율성을 분석한 결과 3-way 방법에서는 55.6%, 2-way 방법에서는 58%, DEC(1-way) 방법에서는 61.7%로 조사되었다.

표 28. 한우에서 3-way, 2-way and 1-way (DEC)을 이용한 수정란 채란 시, 수정란 회수율 비교

Methods	No. of donor (n)	No. of recovered embryos (n)	No. of recovered embryos for E.T (n)	Efficiency of method ¹⁾ (%)
3-way	4	11.25 ± 0.63	6.25 ± 0.48	55.6
2-way	4	12.5 ± 0.65	7.25 ± 0.48	58
1-way (DEC)	4	11.75 ± 0.48	7.25 ± 0.63	61.7

¹⁾ % = (No. recovered transferable embryos/NO. recovered embryos)×100

(Mean

± SEM)

표 29은 기존의 채란 방법인 3-way 및 2-way법과 본 연구의 1-way를 이용한 채란 방법의 비교 결과 중에서 채란 과정 동안 소모된 관류액의 양, 시술 시간, 채란 작업에 필요한 최소인원 및 공간우의 보정 여부를 조사하여 나타낸 것이다. 3-way 및 2-way를 이용한 채란 방법은 일반적으로 알려져 있는 채란과정으로 수행하였으며, DEC를 이용한 1-way 방법은 본문에 기재된 바와 같이 수행하였다. 실험 결과, 채란 과정 동안 사용된 관류액의 양에서 DEC(1-way) 방법이 0.28 ± 0.32 l의 양을 소모하여 함께 수행된 3-way 및 2-way의 채란 방법에 소모된 양 (1.80 ± 0.12 l 및 1.75 ± 0.10 l)보다 유의적으로 적게 사용되었음을 알 수 있었다($p < 0.05$). 채란 시술에 소모된 시간 또한 DEC(1-way)를 이용한 채란 방법에서 27 ± 2 분이 소요된 반면, 기존의 채란 방법인 3-way 및 2-way에서는 각각 51 ± 3 분과 45 ± 2 분이 소요되어 DEC(1-way)를 이용한 채란 방법이 기존의 채란 방법과 비교하여 유의적으로 시술 시간을 적게 필요로 한다는 결과를 얻을 수 있었다($p < 0.05$). 뿐만아니라, DEC(1-way) 채란 방법은 채란을 위한 공간우의 보정이 필요하지 않고 혼자서도 채란 작업을 수행할 수 있었다.

표 29. 한우에서 3-way, 2-way and 1-way (DEC)을 이용한 수정란 채란 시, 소모되는 관류액양, 시술시간, 시술필요 인원 및 공란우 보정여부에 대한 비교

Methods	Flushing sol. (l)	Collection time (min)	Workers (No.)	Holer for cattle
3-way	1.80 ± 0.12 ^a	51 ± 3 ^a	2	○
2-way	1.75 ± 0.10 ^a	45 ± 2 ^a	1~2	○
1-way (DEC)	0.28 ± 0.32 ^b	27 ± 2 ^b	1	×

^{a,b} Means with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

(Mean

± SEM)

일반적으로 사용되는 3-way 및 2-way 채란 방법과 1-way에 의한 채란 방법에서 1회 수정란 채란에 소요되는 경비를 비교하기 위해 표 30에 나타내었다. 소요되는 경비 조사는 수정란 채란 시 사용되는 필수적인 물품들만을 선택하여 1회 채란시에 소모되는 양을 파악하여 이루어졌다. 그 결과, DEC(1-way)를 이용한 방법이 3-way 및 2-way와 비교하여 크게 절감된 104,100원이 소모됨을 알 수 있었다. 이것은 3-way 방법과 비교하여 약 1/4.5이며, 2-way 방법과는 약 1/2 가량 차이 나는 경비이다. 이러한 결과를 통해 DEC(1-way)를 이용한 수정란 채란 방법은 비용면에서 매우 효율적인 방법인 것으로 생각된다.

표 30. 한우에서 3-way, 2-way and 1-way (DEC)을 이용한 수정란 채란 시, 회 수정란 채란에 소요되는 경비

Product	3 way			2 way			1 way (DEC)		
	Unit price	QTY ¹⁾	Total	Unit price	QTY ¹⁾	Total	Unit price	QTY ¹⁾	Total
Catheter	330,000	1	330,000	50,000	1	50,000	50,000	1	50,000
Y-junction flush tube	.	.	.	30,000	1	30,000	.	.	.
Syringe (60 ml)	100	1	100	100	1	100	100	1	100
Emcon filter	44,000	1	44,000	44,000	1	44,000	44,000	1	44,000
Flushing solution	50,000	2	100,000	50,000	2	100,000	50,000	0.2	10,000
Total cost			474,100			224,100			104,100

¹⁾ Quantity (Unit: Won)

본 연구는 DEC에 관한 것으로, 소에서 수정란 이식에 이용되는 체내 수정란을 과배란으로 유도된 공란우로부터 직접 회수하기 위한 채란 방법에 관한 것이다. 실험 결과에 따르면 DEC에 의한 1-way의 방식으로 수정란을 채란하게 되면 평균 이식 가능한 수정란의 개수를 7.25±0.63 개를 회수할 수 있었으며, 61.7%의 채란 효율을 얻을 수 있었다. 또한 기존의 채란 방법인 3-way 및 2-way 방법과 비교하여 유의적으로 절감된 0.28±0.32 l의 관류액 소모량과 27±2분의 시술 시간으로 기존의 방법보다 효율적인 채란 결과를 얻을 수 있었다. 1회 채란에 소모되는 비용 또한 기존 방법과 비교하여 최대 1/4.5, 최소 1/2 가량 절감하는 효과 또한 얻을 수 있었다.

DEC(1-way) 방법은 손으로 주사기를 통해 주입시킨 관류액을 다시 주사기를 당겨 흡입하는 압력에 의해 수정란이 주사기 안으로 관류액과 함께 흡입되게 함으로써 수정란을 채란하는 방식이다. 기존의 채란 방법은 위치 차를 이용한 방법, 즉 관류액을 주입시킨 위치보다 상대적으로 낮은 위치에 있는 회수관을 통해 관류액을 회수하기 때문에 수정란을 회수하는 데에 작용하는 힘이 적게 들어 채란과정이 오래 걸리고, 소모되는 관류액이 많다는 단점을 갖는다. 반면, DEC(1-way)에 의한 수정란 채란 방법은 직접적으로 주사기의 관류액을 통해 압력과 힘이 작용하기 때문에 더 강한 압력에 의해 수정란을 회수함으로써, 단시간에 적은 양의 관류액으로 수정란을 더 효율적으로 채란할 수 있다.

일반적으로 수정란은 체외 수정란과 체내 수정란으로 구분된다. 체외 수정란은 체내 수정란의 생산 비용보다 저렴하고 대량 생산이 가능하기 때문에 많이 이용되고 있지만 낮은 수태율과 높은 유산율, 낮은 분만율을 비롯하여 과체중 및 기형 송아지의 생산 등의 문제점이 보고된 바 있다(Schmidt 등, 1996; van Wagtenonk-de Leeuw 등, 1998; Numabe 등 2000; Lazzari 등, 2002). 반면, 체내 수정란은 체외 수정란의 단점들 극복할 수 있는 우수한 질을 가지며, 우수한 유전자원을 보유한 개체를 직접적으로 사용할 수 있어 형질 개량 측면에서 체외 수정란보다 활용성이 높다는 연구 결과가 있다(Greve 등, 1995; 임 등, 1998; 김 등, 2002; Ax 등, 2005; 박 등, 2005; 최 등, 2005). 하지만 체내 수정란의 생산을 위해 고비용과 많은 노력이 요구되기 때문에 수정란 이식 산업이 활성화되지 못하여 수정란 공급 부족 등의 문제점을 지적받고 있다. 이에 대체적으로 등장한 OPU에 의한 산자 생산 기술(Pieterse 등, 1988)이 있지만, OPU 기술 숙련도, OPU 보조, OPU 간격, 호르몬 처리 및 동기화 등(Merton 등, 2003)의 이유로 활성화되지 못한 상태이다.

결론적으로, 본 연구의 1-way 방식을 채택한 DEC를 이용한 수정란 채란 방법은 간편하면서도 효과적으로 수정란을 채란할 수 있는 기술이다. 적은 양의 관류액으로 효과적인 채란이 가능하며, 채란 시간도 기존의 2-way 또는 3-way 방식에 비해 효과적으로 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라, 수정란 채란을 위한 경비 또한 절감시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이러한 점은 수정란 생산에 필요한 고비용, 높은 노동력 등의 문제점을 극복할 수 있도록 해주며, 수정란 이식 산업의 활성화에 도움을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 또한 DEC에 의한 수정란 채란 과정은 시험 가축의 스트레스를 감소시킬 뿐만 아니라, 지속적으로 가축의 자궁선단부를 자극할 필요가 없어 가축이 받게 되는 스트레스를 줄일 수 있으며, 채란 시설이 필요 없는 간편한 방법이기 때문에 현장에서의 활용가치는 더욱 높다고 생각된다. 즉, DEC 방법은 간편하고 접근성이 기존의 채란 방법보다 용이하기 때문에 현장에서의 활용도가 더욱 높아 추후에 수정란 채란 및 이식 사업의 활성화에 도움을 줄 것으로 기대된다.

- DEC 방법의 효율개선

1. 재료 및 방법

1) 수정란 채란

DEC(Direct Embryo Collection) 방법을 사용한 수정란의 채란은 foley balloon catheter(Rusch, Kernen, Germany)를 공란우의 자궁각에 장착시킨 후, catheter의 끝부분에 50 ml 주사기용 어댑터를 제작하여 연결하고 종래의 2-way 방식에 이용되는 Y-tubing(Agtech, Manhattan, KS, USA) 대신 50 ml 주사기를 사용하여 실시한다. 50 ml의 complete flush solution (Bioniche Animal Health, Canada)이 채워진 일회용 50 ml 주사기를 어댑터에 연결하여 주사기를 통해 직접적으로 자궁 내로 관류액을 주입하고, 다시 주사기로 흡입시키는 방법을 사용하여 관류액을 회수하였으며, 회수된 관류액은 EmCon-filter(Kruuse, Marslev, Denmark)를 통해 여과시켜 수정란을 수집하였다. 공란우 1두 수정란 채란 시, 왼쪽 및 오른쪽에 위치한 난소로부터 수정란을 회수하기 위해 관류액 50 ml가 채워진 12개의 50 ml 주사기를 사용하여 각 난소로부터 6회의 관류를 실시하고 자궁내 관류액을 회수하였으며, 각 주사기별로 회수된 관류액은 분류되어 EmCon-filter를 통해 여과되고 수정란을 수집하는데 이용하였다.

2. 연구 결과

표 31. 한우에서 DEC를 이용한 과배란 처리 후 수정란 채란

Methods	No. of donor (n)	No. of recovered embryos (n)	No. of transferable embryos (n)	Efficiency of method ¹⁾ (%)
Control ²⁾	30	12.0 ± 0.44 ^b	6.9 ± 0.35 ^b	57.4
DEC	30	19.1 ± 1.40 ^a	15.8 ± 1.72 ^a	82.6

¹⁾ % = (No. transferable embryos/NO. recovered embryos) × 100.

²⁾ Control: conventional method of embryo collection.

Values with different superscripts differ significantly (Mean ± SEM, $p < 0.05$).

표 31은 DEC 방법을 이용한 수정란 채란 결과를 기존의 채란 방법과 비교한 결과표이다. 총 회수 수정란 및 이식 가능한 수정란에 대한 조사를 하였으며, 그 결과로 DEC에 의한 수정란 채란 방법에서 19.1±1.40개의 총 회수 수정란과 15.8± 1.72개의 이식 가능한 수정란 수가 관찰되었으며, 종래의 채란 방법에서 얻어진 12.0±0.44개의 총 회수 수정란과 6.9±0.35개의 이식 가능한 수정란 수와 비교하여 유의적으로 높은 결과라는 것을 보여준다($p < 0.05$). 또한 수정란 채란 효율을 분석한 결과 DEC 방법에 의한 수정란 채란이 82.6%로 종래의 방법인 57.4%보다 높다는 것을 알 수 있다.

표 32. DEC에 의한 수정란 채란 시, 관류횟수에 따른 총 회수되는 수정란 개수

Flushing times	n	No. of recovered embryos	Embryo cell stages				
			Exp. B ¹⁾	Ear. B ²⁾	Com. M ³⁾	Ear. M ⁴⁾	Deg. ⁵⁾
1 st	20	1.2 ± 0.46 ^{cd}	0.3 ± 0.24 ^a	0.8 ± 0.32 ^b	0.1 ± 0.11 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b
2 nd	20	8.6 ± 0.53 ^a	0.6 ± 0.44 ^a	3.9 ± 0.90 ^a	3.7 ± 1.00 ^a	0.4 ± 0.18 ^b	0.0 ± 0.00 ^b
3 rd	20	5.3 ± 0.65 ^b	0.0 ± 0.00 ^a	1.3 ± 0.90 ^b	2.2 ± 0.76 ^a	1.8 ± 0.68 ^a	0.0 ± 0.00 ^b
4 rd	20	1.8 ± 0.40 ^c	0.0 ± 0.00 ^a	0.0 ± 0.00 ^b	0.6 ± 0.38 ^b	0.6 ± 0.34 ^b	0.7 ± 0.37 ^b
5 rd	20	2.2 ± 0.72 ^c	0.0 ± 0.00 ^a	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	2.2 ± 0.72 ^a
6 rd	20	0.0 ± 0.00 ^d	0.0 ± 0.00 ^a	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b

1) Exp. B: Expanded Blastocyst.

2) Ear. B: Early Blastocyst.

3) Com. M: Compact Morula.

4) Ear. M: Early Morula.

5) Deg.: Degradation.

Values with different superscripts differ significantly within row (Mean ± SEM, $p < 0.05$).

표 33. DEC에 의한 수정란 채란 시, 관류횟수에 따른 이식가능한 수정란 개수

Flushing times	n	No. of transferable embryos	Embryo cell stages				
			Exp. B ¹⁾	Ear. B ²⁾	Com. M ³⁾	Ear. M ⁴⁾	Deg. ⁵⁾
1 st	20	1.2 ± 0.46 ^{cd}	0.3 ± 0.24 ^a	0.8 ± 0.32 ^b	0.1 ± 0.11 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^a
2 nd	20	8.6 ± 0.53 ^a	0.6 ± 0.44 ^a	3.9 ± 0.90 ^a	3.7 ± 1.00 ^a	0.4 ± 0.18 ^b	0.0 ± 0.00 ^a
3 rd	20	5.3 ± 0.65 ^b	0.0 ± 0.00 ^a	1.3 ± 0.90 ^b	2.2 ± 0.76 ^a	1.8 ± 0.68 ^a	0.0 ± 0.00 ^a
4 rd	20	0.7 ± 0.37 ^{dd}	0.0 ± 0.00 ^a	0.0 ± 0.00 ^b	0.2 ± 0.22 ^b	0.4 ± 0.34 ^b	0.0 ± 0.00 ^a
5 rd	20	0.0 ± 0.00 ^d	0.0 ± 0.00 ^a	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^a
6 rd	20	0.0 ± 0.00 ^d	0.0 ± 0.00 ^a	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^a

1) Exp. B: Expanded Blastocyst.

2) Ear. B: Early Blastocyst.

3) Com. M: Compact Morula.

4) Ear. M: Early Morula.

5) Deg.: Degradation.

Values with different superscripts differ significantly within row (Mean ± SEM, $p < 0.05$).

표 32와 33는 DEC에 의한 수정란 채란 방법에서의 적정 관류액 양을 알기 위해 실시한 실험의 결과로서, 수정란 채란 시에 총 6회의 관류 횟수로 실험을 수행하였다. 총 회수된 수정란 개수의 경우 2회째에 회수된 관류액에서 8.6 ± 0.53 개로 유의적으로 높게 관찰되었고 3회째 관류시에는 5.3 ± 0.65 개로 나타나 2회째를 제외한 다른 관류액 회수군보다 유의적으로 높게 수정란이 회수되었다($p < 0.05$). 반면 6회째에 회수된 관류액에서는 0.0 ± 0.00 개로 수정란이 회수되지 않았다(표 32). 표 33에 나타낸 이식 가능한 수정란도 2회째 회수된 관류액에서 8.6 ± 0.53 개로 유의적으로 높은 회수율을 보여주었으며 3회째에 회수된 관류액 또한 5.3 ± 0.65 개로 2회째를

제외한 다른 회수군보다 유의적으로 높게 관찰되었다($p < 0.05$). 반면, 5회 및 6회째에 회수된 관류액에서는 모두 0.0 ± 0.00 개로 이식 가능한 수정란이 관찰되지 않았다. 순서대로 회수된 관류액에서 관찰 가능한 수정란들의 발달단계 또한 표 32와 33에 나타내었다. 표 32의 총 회수된 수정란들을 각각 관류된 회수군별로 나누어 수정란 발달 단계를 살펴보면, 확장배반포 단계의 수정란은 모든 관류액 회수군에서 유의적인 차이가 발견되지 않았으며 초기상실배 단계의 수정란과 상실배 단계의 수정란은 모두 2회째 회수된 관류액에서 3.9 ± 0.90 및 3.7 ± 1.00 개로 관찰되어 가장 유의적으로 높은 회수율이 관찰되었다($p < 0.05$). 3회째에 회수된 관류액에서는 상실배 단계의 수정란과 초기상실배 단계의 수정란이 각 2.2 ± 0.76 및 1.8 ± 0.68 개로 유의적으로 높은 회수율을 보여주었다($p < 0.05$). 반면 5회째에 회수된 관류액에서는 퇴행란만이 2.2 ± 0.72 개로 유의적으로 높게 관찰되었다($p < 0.05$). 각 관류 횟수에 따라 회수된 이식 가능한 수정란의 경우 초기배반포 단계의 수정란은 2회째 회수된 관류액에서 3.9 ± 0.90 개로 가장 유의적으로 높게 회수되었고, 상실배 단계의 수정란은 2회 및 3회째에 회수된 관류액에서 가장 유의적으로 높게 회수되었다($p < 0.05$). 초기상실배 단계의 수정란은 3회째에 회수된 관류액에서 유의적으로 높은 회수율을 보여주었다($p < 0.05$). 반면, 퇴행 단계의 수정란은 모든 회수된 관류액에서 관찰할 수 없었다(표 33).

본 연구는 Direct Embryo Collection(DEC)를 이용한 수정란 채란 방법에서 적정 관류액의 양을 확인하여 수정란 채란 시, 효율성을 검증하고 수정란의 회수 시기를 확인하고자 실시되었다. 공란우 1두로부터 수정란 채란 시, 총 6회로 나누어 관류를 실시하였고 1회 관류시에는 총 50 ml의 관류액을 사용하였다. 공란우 1두 채란 시에 소모된 총 관류액의 양은 600 ml 이었으나 표 32의 결과로 미루어 보아 수정란의 대부분은 2회 및 3회째에 회수되었음을 알 수 있었다. 특히, 6회째에 이루어진 관류에서는 9번의 반복 실험 동안 회수된 수정란이 관찰되지 않았다. 5회째에 이루어진 관류에서는 9번의 반복실험 중 6번의 실험에서 총 회수된 수정란 개수가 2.20 ± 0.72 개로 관찰되었지만 이식 가능한 수정란은 관찰되지 않았다. 가장 많은 수정란이 회수된 2회째 및 3회째를 제외한 1회 및 4회째에 관류하여 회수된 수정란은 총 회수된 수정란의 경우 1.2 ± 0.46 및 1.8 ± 0.40 개로 관찰되었고, 이식 가능한 수정란의 경우에는 1.2 ± 0.46 및 0.7 ± 0.37 개로 관찰되었다. 이러한 결과들로부터 이식 가능한 수정란의 경우는 1~4회째 관류시에 모두 회수가 가능하며 3~6회째에 회수되는 수정란에는 이식 불가능한 수정란이 포함되고, 특히 5회 및 6회째에 회수되는 수정란들은 모두 퇴화가 진행 중이거나 미수정란의 경우라고 판단되어 진다. 즉, 공란우 1두 채란에 400 ml의 관류액을 사용하여 이식 가능한 수정란을 모두 회수할 수 있었다. 일반적인 3-way 및 2-way를 사용한 채란 방법은 balloon catheter를 장착시킨 후, DEC 방법과는 달리 Y-tubing을 catheter에 연결하고 Y-tubing의 관류액 유입 및 유출관을 각 관류액과 여과를 위한 EmCon-filter에 연결하여 자궁 내 순환 관류법에 의한 반복적인 채란 작업으로 수정란을 회수하게 된다(Donaldson, 1983; Rowe 등, 1980). 이러한 과정에서 관류액이 평균 1~2 L를 소모하는 것과 비교하였을 때, DEC 방법의 적은 관류액 소모량은 대단

히 큰 이점이라고 할 수 있다. 또한 적은 양의 관류액 소모는 채란 시술에 필요한 작업 시간을 단축시킬 수 있음을 고려한다면 더욱 그 효과가 증가될 것 이라고 생각된다.

한편, 1회, 2회 및 3회째에 회수되는 대부분의 수정란 발달 단계는 배반포에서 상실배 단계로 나타나는 경향이 관찰되었고, 이후의 수정란 회수에서는 초기상실배 단계 또는 이하의 수정란 단계가 관찰되는 경향이 나타났다. 즉, 상실배 이하의 수정란 또는 퇴화되거나 미수정된 수정란들은 4회째 이후의 관류액에서만 관찰되었다. 1회째에 회수된 관류액이 처음으로 자궁 및 난관 내로 유입되므로 세척 및 윤희의 역할로 작용하고 첫번째의 관류를 통해 자궁 및 난관 내에서 이동 중이거나 내막에 부착된 수정란들을 부유시킴으로써 이후의 2회 및 3회째의 자궁 내 관류에서 수정란의 회수가 증가된다고 생각된다. 또한, 2회 및 3회째의 자궁 내 관류 이후 회수되는 수정란의 개수는 감소된 결과가 관찰되었고 대부분의 초기상실배 단계 및 퇴화가 진행 중인 수정란의 경우는 4회째 관류 이후에 관찰되므로 발달이 느리거나 퇴화가 진행 중인 수정란들은 채란 전 자궁 또는 난관 내에서 더 깊은 위치에 머물러 있거나 내막에 더 깊게 파묻혀 있다고 판단된다.

결론적으로, 본 연구의 1-way 방식을 채택한 DEC를 이용한 수정란 채란 방법은 기존의 수정란 채란 방법보다 적은 양의 관류액으로도 보다 효과적으로 수정란을 채란할 수 있는 기술이다. 즉, 400 ml의 관류액만으로도 이식 가능한 수정란을 충분히 회수할 수 있으며, 적은 양의 관류액으로 효과적인 채란이 가능함에 따라 채란 시간도 기존의 2-way 또는 3-way 방식에 비해 효과적으로 단축시킬 수 있다. 뿐만 아니라, 수정란 채란을 위한 경비 또한 절감시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이러한 점은 수정란 생산에 필요한 고비용, 고도의 노동력 등의 문제점을 극복할 수 있도록 해줄 것으로 기대된다. 또한 DEC에 의한 수정란 채란과정은 지속적으로 공란우의 자궁 선단부를 자극할 필요가 없어 채란 시 스트레스를 감소시킬 뿐만 아니라, 채란 시설이 필요 없는 간편한 방법이기 때문에 현장에서서의 활용가치는 더욱 높다고 생각된다.

○ 체내 우수 수정란 생산과 수정란 이식 기술보급

1. 체내 수정란 생산

체내 수정란의 생산은 선발된 공란우에 과배란 처리 후, 선발된 종모우의 정액을 인공수정함으로써 우수한 유전자원을 보유한 체내 수정란을 다량 생산하였다. 총 3년간 실시된 반복채란 결과 총 생산된 수정란 개수와 이식가능한 수정란 개수 및 동결된 수정란의 개수를 그림 24에 그래프로 표현하였다. 회수된 수정란들의 발달단계 또한 나타내었다. 총 회수된 수정란의 경우 09~10년도에 188개, 10~11년도에 257개 및 11~12년도에 318개의 체내 수정란이 회수되었다. 연차별로 수정란 회수 개수가 계속적으로 증가하였는데, 이는 공란우 과배란 처리 방법의 안정화와 3-way 및 2-way에 의한 수정란 채란 방법에서 DEC에 의한 수정란 채란 방법의 개발과 사용으로 인한 결과이다. 채란 시간 단축 및 경비 절감으로 인하여 더 많은 수의 공란우가 이용 가능하였다. 이식가능한 수정란의 개수도 1차년도에 188개에 비하여 3차년도에 318개로 크게 증가된 것을 알 수 있는데, 이는 수정란 채란 효율의 증가에 따른 양질의 수정란 회수가 가능하였다는 것을 알려주는 사실이다.

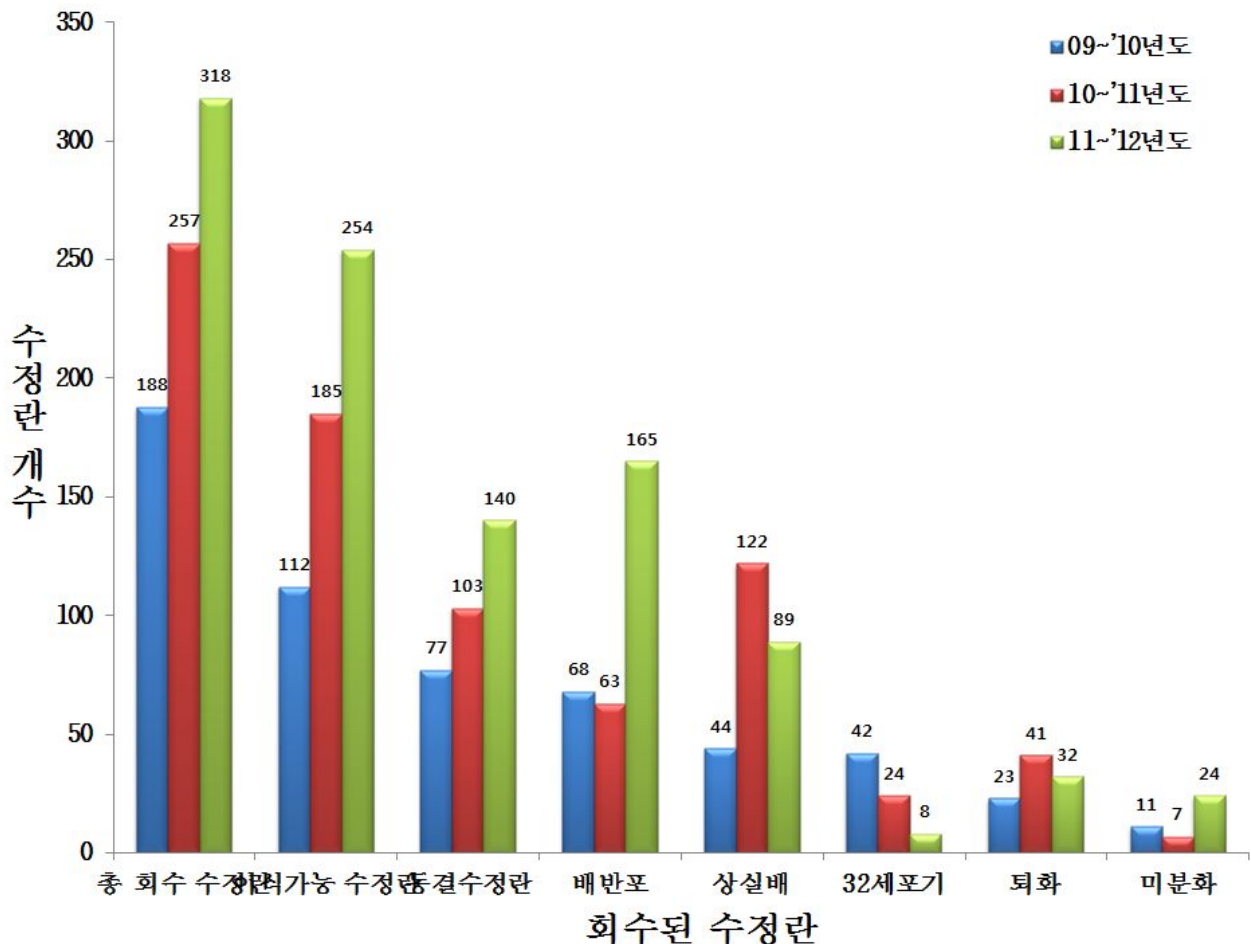


그림 24. '09년 ~'12년 기간 동안 선발된 공란우의 과배란 처리 후 채란된 수정란 개수

2. 수정란 채란 기술 개발 - Direct Embryo Collection(DEC)

- 1) 특허출원 (특허청)
- 2) 출원일자 : 2011. 02. 23
- 3) 출원번호 : 10-2011-0015913 (접수번호 1-1-2011-0129954-39)
- 4) 발명명칭 : 수정란 직접채란기 (DEC)
- 5) 주요내용
 - 공란우 과배란 처리에 의한 수정란 채란 효율 개선
 - 적은 양의 관류액 사용으로 기존의 2-way 및 3-way 방식과 동일한 효과
 - 필요 장비 및 소모품의 간소화로 인한 경비 절감 및 간편화
 - 채란시간 단축으로 인한 공란우의 부작용 감소효과
 - 간편하고 접근성이 용이하기 때문에 현장에서의 활용도가 높은 방법으로 고려됨

3. 영농활용기술 채택 (농촌진흥청)

- 1) 채택일자 : 2011. 12. 14
- 2) 성과물번호 : 2011RD0040000457909
- 3) 영농활용 제목 : 200 mg FSH 투여에 의한 한우의 과배란 유도
- 4) 활용분야 : 축산생명환경, 동물번식 생리, 수정란 채란 및 이식
- 5) 활용내용 : 한우의 과배란 처리 시 이용되는 FSH 제제의 농도를 200 mg으로 감소시켜 기존의 과배란 처리방법인 400 mg 처리 방법과 동일한 효과를 얻으면서 FSH의 처리 비용을 절감하여 체내 수정란 생산 단가를 낮출 수 있음

○ 체내 우수 수정란이식에 의한 산자생산 및 수태율 증진 기술개발

1. 수정란 이식에 의한 산자 생산 (OK 목장)

체내 수정란 이식에 의한 산자 생산을 위하여 참여기업인 OK 목장 내의 번식우를 대상으로 수정란 이식 실험을 실시하였다. 수정란은 체내 및 동결 수정란을 이용하였으며, 각 유전자 타입별로 수정란을 분배하여 실험에 이용하였다. 수정란의 발달단계가 배반포와 상실배 단계인 수정란만을 이식에 사용하였다.

표 34은 본 과제의 참여기업인 OK 목장에서 실시된 수정란 이식 실험의 결과이다. 총 41두의 수란우에 대해 수정란 이식 실험이 실시되었으나 '11년 1월경 구체역 발생으로 인한 OK 목장의 전 두 수 매물 처분에 따라 당시, 실험이 진행 중이던 수란우도 모두 함께 매물처리가 되었다. 따라서, 당시 진행중이던 실험결과만을 표 34에 표현하였다. 총 41두 중, 초음파 진단을 통한 임신확인 결과 22두가 임신을 하였으며, 수태율은 53.7%로 확인이 되었다.

표 34. OK 목장의 수정란 이식에 이용된 개체 정보

No	개체번호	공란우	정액특징	체내수정란	임신편정	비고
1	188622995	근내지방	근내지방	Blastocyst	부	
2	194501611	근내지방	근내지방	Blastocyst	가	
3	189833079	근내지방	근내지방	Blastocyst	가	
4	000565947	근내지방	근내지방	Blastocyst	부	
5	195386057	근내지방	근내지방	Blastocyst	가	
6	194718712	근내지방	근내지방	Blastocyst	부	
7	000565883	근내지방	근내지방	Blastocyst	부	
8	189974788	근내지방	근내지방	Blastocyst	부	
9	000565607	근내지방	근내지방	Blastocyst	가	
10	000565596	근내지방	근내지방	Blastocyst	가	'11년 1월 구체역 발생으로 인한 매물처분
11	000565449	도체중	도체중	Morula	부	
12	007033319	도체중	도체중	Morula	가	
13	189833529	도체중	도체중	Morula	가	
14	188268836	도체중	도체중	Morula	가	
15	197109838	도체중	도체중	Morula	가	
16	197109241	도체중	도체중	Blastocyst	가	
17	009831242	도체중	도체중	Blastocyst	가	
18	027069148	도체중	도체중	Blastocyst	부	
19	009785690	도체중	도체중	Morula	부	
20	194713045	등심단면적	등심단면적	Morula	부	
21	027091861	등심단면적	등심단면적	Morula	가	

22	000565971	등심단면적	등심단면적	Morula	부
23	000565818	등심단면적	등심단면적	Blastocyst	부
24	012951993	등심단면적	등심단면적	Blastocyst	부
25	012951651	등심단면적	등심단면적	Blastocyst	가
26	012951635	등심단면적	등심단면적	Morula	가
27	012951750	등심단면적	등심단면적	Morula	가
28	012951678	등심단면적	등심단면적	Morula	가
29	012951856	등심단면적	등심단면적	Blastocyst	부
30	012951741	종합형	종합형	Blastocyst	가
31	012966264	종합형	종합형	Blastocyst	부
32	012966328	종합형	종합형	Morula	가
33	012966640	종합형	종합형	Morula	부
34	012966703	종합형	종합형	Morula	부
35	012951660	종합형	종합형	Blastocyst	부
36	012951977	종합형	종합형	Blastocyst	가
37	031726253	종합형	종합형	Blastocyst	가
38	012951784	종합형	종합형	Morula	가
39	012951619	종합형	종합형	Morula	부
40	028446720	종합형	종합형	Blastocyst	가
41	018411646	종합형	종합형	Blastocyst	부

2. 수정란 이식에 의한 산자 생산 (횡성축협목장; 서원면 위치)

표 35. 수정란 이식에 의해 근내지방형으로 개량된 송아지 생산 내역

No	개체번호	공란우	정액특징	성별	체중 (kg)		
					생시	이유	12개월
1	031719869	174418977 (근내지방도형)	근내지방형	수	30	68	323
2	031719810	174418977 (근내지방도형)	근내지방형	수	24	68	336
3	009808465	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	수	27	89	
4	027095692	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	수	24	53	290
5	027089866	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	수	34	81	328
6	027090514	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	수	21	51	
7	027090491	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	수	19	80	
8	027090571	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	수	24	78	
9	050126165	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	수	31	85	310
10	051577557	163449822 (근내지방도형)	근내지방형	수	23	68	254
11	051061267	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	수	24	68	280
12	073101928	194708300	근내지방형	수	22		
13	031719828	174418977 (근내지방도형)	근내지방형	암	22	66	241
14	031719990	174418977 (근내지방도형)	근내지방형	암	23	64.5	188
15	027089815	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	암	27	70	268
16	027090522	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	암	16	60	181
17	051061218	162475307 (근내지방도형)	근내지방형	암	21	77	239

표 36. 수정란 이식에 의해 도체중형으로 개량된 송아지 생산 내역

No	개체번호	공관우	정액특징	성별	체중 (kg)		
					생시	이유	12개월
1	009830107	163446141 (도체중형)	도체중형	수	18.6		
2	027089632	170080444 (도체중형)	도체중형	수	24	97	304
3	009789100	162477064 (도체중형)	도체중형	수	22	42	271
4	027090580	163446141 (도체중형)	도체중형	수	29	70	
5	027090563	170080444 (도체중형)	도체중형	수	30	80	
6	027089649	170080444 (도체중형)	도체중형	암	26	112	260
7	007006883	163446141 (도체중형)	도체중형	암	28	78	
8	027091417	170080444 (도체중형)	도체중형	암	25	62	136
9	009789095	162477064 (도체중형)	도체중형	암	24	49	
10	027090547	170080444 (도체중형)	도체중형	암	29	72	264
11	053072359	170080444 (도체중형)	도체중형	암	28	89	
12	053073525	162477064 (도체중형)	도체중형	암	30	83	269

표 37. 수정란 이식에 의해 등심단면적형으로 개량된 송아지 생산 내역

No	개체번호	공란우	정액특징	성별	체중 (kg)		
					생시	이유	12개월
1	009789183	164801895 (등심단면적형)	등심단면적형	수	23	101	
2	009789191	164801895 (등심단면적형)	등심단면적형	수	27	58	218
3	009789206	164801895 (등심단면적형)	등심단면적형	수	30	116	
4	009787802	164802861 (등심단면적형)	등심단면적형	수	30	93	387
5	009788065	164802861 (등심단면적형)	등심단면적형	수	19	87	
6	009788073	164802861 (등심단면적형)	등심단면적형	수	20	77	
7	009788081	164802861 (등심단면적형)	등심단면적형	수	20	81	
8	009787798	164802861 (등심단면적형)	등심단면적형	수	29.5	50	
9	031724887	158579022 (등심단면적형)	등심단면적형	암	25	107	239
10	027075167	164801895 (등심단면적형)	등심단면적형	암	27.5	77	
11	059390557	031791759	등심단면적형	암	26	75	
12	300011411	031791759	등신단면적형	암	27	71	

표 38. 수정란 이식에 의해 종합형으로 개량된 송아지 생산 내역

No	개체번호	공관우	정액특징	성별	체중 (kg)		
					생시	이유	12개월
1	009787780	143639964 (종합형)	종합형	수	32	87	303
2	009787771	143639964 (종합형)	종합형	수	34	101	
3	031724895	162476248 (종합형)	종합형	수	26	68.5	263
4	031724926	162476248 (종합형)	종합형	수	22	76.5	296
5	031724918	162476248 (종합형)	종합형	수	24	69	279
6	031724854	182291036	종합형	수	21	71	268
7	027089753	165067450 (종합형)	종합형	수	21	62	213
8	009788090	162964574	종합형	수	30	75	
9	007006906	165067450 (종합형)	종합형	수	25		
10	027095730	162964574 (종합형)	종합형	수	24	73	315
11	027095748	162964574 (종합형)	종합형	수	28	73	325
12	027095789	165067450 (종합형)	종합형	수	24	83	
13	049373284	165067450 (종합형)	종합형	수	25	87	313
14	049373305	162964574 (종합형)	종합형	수	21	84	240
15	056030017	165067450 (종합형)	종합형	수	29	83	239
16	053072262	186311815	종합형	수	21	74	287
17	194708300	162964574 (종합형)	종합형	암	24	98	
18	009788057	162964574 (종합형)	종합형	암	23	79	
19	031724846	182291036	종합형	암	20	82	222
20	027089745	165067450 (종합형)	종합형	암	27.5	70	226
21	007006867	143639964 (종합형)	종합형	암	26	65	
22	007006859	143639964 (종합형)	종합형	암	26	49	

23	027075142	162964574 (종합형)	종합형	암	27	57	
24	031719973	162964574 (종합형)	종합형	암	16	67	207
25	031719965	162964574 (종합형)	종합형	암	17	58	195
26	027095764	162964574 (종합형)	종합형	암	22	73	214
27	027095756	162964574 (종합형)	종합형	암	24	80	245
28	027095772	165067450 (종합형)	종합형	암	22	54	212
29	046382279	162964574 (종합형)	종합형	암	22	73	224
30	046382295	162964574 (종합형)	종합형	암	24	70	225
31	046382287	162964574 (종합형)	종합형	암	20	55	201
32	046382262	162964574 (종합형)	종합형	암	23	66	233
33	049373313	162964574 (종합형)	종합형	암	26	73	218
34	049373268	165067450 (종합형)	종합형	암	26	69	219
35	027089376	167508630 (종합형)	종합형	암	21	66	234
36	027090442	162476248 (종합형)	종합형	암	22	52	213
37	027090539	162476248 (종합형)	종합형	암	26	52	248
38	027090434	186311181	종합형	암	22	58	218
39	053072650	162476248 (종합형)	종합형	암	26	84	288
40	054849392	165067450 (종합형)	종합형	암	27	84	243
41	300011340	009788057	종합형	암	27	86	

3. 수정란 이식으로 태어난 산자의 도체 성적

표 39. 수정란 이식에 의해 근내지방도형으로 태어난 산자의 도체 성적

유전자 타입		개체번호	구분	도체중	등심 단면적	등지방 두께	근내 지방도	육량지수
공관우	종모우							
근내 지방	근내 지방	031719869	비거세	469	92	6	1	68.36
근내 지방	근내 지방	031719810	거세	392	94	7	5	69.85
근내 지방	근내 지방	009808465	비거세	425	97	4	1	71.32
근내 지방	근내 지방	027095692	비거세	461	103	5	1	70.61
근내 지방	근내 지방	027089866	비거세	482	98	4	1	70.08
근내 지방	근내 지방	027090514	거세	366	81	13	8	65.03
근내 지방	근내 지방	027090491	거세	384	81	29	6	54.6
근내 지방	근내 지방	027090571	거세	431	89	14	5	63.89
근내 지방	근내 지방	031719828	암	374	78	18	7	61.32
근내 지방	근내 지방	027090522	암	319	73	9	5	67.62

표 40. 수정란 이식에 의해 도체중형으로 태어난 산자의 도체 성적

유전자 타입		개체번호	구분	도체중	등심 단면적	등지방 두께	근내 지방도	육량지수
공관우	종모우							
도체중	도체중	009830107	비거세	434	101	6	1	70.37
도체중	도체중	027089632	비거세	388	82	4	1	70.26
도체중	도체중	009789100	비거세	432	96	4	1	71.02
도체중	도체중	027090580	거세	339	91	14	9	66.35
도체중	도체중	027090563	거세	415	93	20	9	61.04

표 41. 수정란 이식에 의해 등심단면적형으로 태어난 산자의 도체 성적

유전자 타입		개체번호	구분	도체중	등심 단면적	등지방 두께	근내 지방도	육량지수
공란우	종모우							
등심단 면	등심단 면	009789183	비거세	460	82	10	1	64.78
등심단 면	등심단 면	009789191	비거세	513	95	4	1	68.95
등심단 면	등심단 면	009789206	비거세	482	111	8	1	69.27
등심단 면	등심단 면	009787802	비거세	497	97	9	3	66.47
등심단 면	등심단 면	009788065	비거세	436	98	4	1	71.19
등심단 면	등심단 면	009788073	비거세	417	88	15	2	63.47
등심단 면	등심단 면	009788081	비거세	434	95	4	2	70.84
등심단 면	등심단 면	009787798	비거세	427	96	3	2	71.77

표 42. 수정란 이식에 의해 종합형으로 태어난 산자의 도체 성적

유전자 타입		개체번호	구분	도체중	등심단면 적	등지방두 께	근내지방 도	육량지수
공란우	종모우							
종합형	종합형	009787780	비거세	471	95	3	1	70.58
종합형	종합형	009787771	비거세	517	95	5	2	68.23
종합형	종합형	031724895	비거세	419	86	6	1	68.78
종합형	종합형	031724918	거세	359	88	10	8	67.98
182291 036	종합형	031724854	거세	369	83	7	5	68.97
종합형	종합형	027089753	거세	351	80	8	6	68.39
종합형	종합형	009788090	비거세	451	98	3	2	71.45
종합형	종합형	007006906	비거세	504	94	10	1	65.28
종합형	종합형	027095748	비거세	472	90	5	1	68.66
종합형	종합형	027095789	거세	362	79	10	5	66.74

182291 036	종합형	031724846	암	289	73	8	8	68.96
종합형	종합형	027095772	암	341	72	9	9	66.96



그림 25. 선발된 공란우 및 종모우로부터 생산된 수정란을 이식하여 태어난 송아지

수정란 이식에 의한 송아지 생산은 현재도 진행 중에 있으며, 앞으로 약 130여두의 송아지가 분만 될 예정이다.

3. 수정란 이식 시, 수태율 향상을 위한 수란우 동기화 방법

수정란 이식 시, 공란우 및 수란우의 개체에 의한 요인들 외에도 체내 또는 체외 수정란의 품질이 성공적인 수정란 이식을 결정짓는다. 가축 수정란 이식의 최종 목표는 생산성 증대이며, 이를 위하여 우수한 수정란의 대량 생산과 산자 생산을 위한 수태율 향상이 요구되고 있으나, 현재까지 수태율을 높일 수 있는 최적의 조건은 명확히 확립되어 있지 않은 상태이다. 따라서 본 연구는 수정란 이식 시, 수란우의 개체요인이 수태율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시되었다.

1) 수란우의 처리 방법

수란우의 개체 요인이 수태율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3종류의 수란우 처리군을 실험에 이용하였다(표 43, 그림 26). 1 실험군은 Vit. E와 셀레늄(Se) 복합제인 토코셀을 수란우의 발정동기화 시, 경구 투여하였으며, 2 실험군은 수정란 이식 2시간 전 자궁소염제를 수란우의 자궁으로 주사하였다. 3실험군은 수정란 이식 12시간 전 HCG를 대상 수란우에 주사하여 본 실험에 이용하였다.

2) 임신진단

수정란 이식 후, 45~50일경에 초음파 관독에 의하여 임신진단을 실시하였다.

표 43. 수정란 이식을 위한 수란우의 Vit E 및 셀레늄 급여 방법

기존 수란우 처리법			1 실험군의 수란우 처리법		
일시	내용	비고	일시	내용	비고
1일째	CIDR 삽입		1일째	CIDR 삽입	Vit,Se. 급여
9일째			9일째		Vi,Se. 급여
10일째			10일째		Vit,Se. 급여
11일째	CIDR 제거	PGF _{2a} 투여 5ml	11일째	CIDR 제거	Vit,Se. 급여 PGF _{2a} 투여 5ml
12일째			12일째		
13일째			13일째		
14일째			14일째		
20일째	이식		20일째	이식	

* 비타민 E, 셀레늄 복합제 급여 (1두당 1일 25g 사료에 혼합 급여)

- 성분 함량 : Vit. E 100,000IU, Se 345mg



그림 26. 2(자궁소염제) 및 3(HCG) 실험군의 수란우 처리 방법

표 44. 수정란 이식 시, 수란우 처리방법에 따른 수태율

처리군	수란우 (두)	이식에 이용된 수정란		임신진단 (두)		수태율 (%)
		개수	발달단계	가	부	
Control	10	11	Blastocyst	5	5	50
Vit. E + Se	10	11	Blastocyst	6	4	60
자궁소염제	10	12	Blastocyst	4	6	40
HCG	10	10	Blastocyst	5	5	50

4. 개체 월령별 수정란 채란 및 이식에 따른 수정란 이식 시, 수태율 증진

본 연구는 공란우 및 수란우의 개체요인 중, 월령별에 따른 차이를 알아보려고 실시되었다. 공란우 및 수란우의 개체 월령을 각각 6단계(20-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71 이상)의 각 월령별로 세분화하여, 과배란 처리에 의한 체내 수정란 생산과 공란우의 개월령과 일치하는 수란우의 각 단계의 개월령으로의 이식 실험을 진행하였다.

표 45. 공란우의 월령일수에 따른 과배란 처리 후 체내 수정란 생산 결과

개체월령	총 회수 수정란	이식가능 수정란	Developmental stage			
			8-cell	16-cell	Morula	Blasto-
20-30	13.5±0.70 ^b	10±0.47 ^b	0.8±0.25 ^d	2.7±0.33 ^b	7.8±0.49 ^a	2.2±0.29 ^f
31-40	15.7±0.30 ^a	11.6±0.37 ^a	0.2±0.13 ^d	3.9±0.37 ^a	8.7±0.40 ^a	2.9±0.35 ^e
41-50	13.7±0.47 ^b	10.9±0.28 ^{ab}	2.5±0.22 ^b	0.3±0.15 ^c	4.2±0.33 ^c	6.7±0.33 ^a
51-60	11.2±0.36 ^d	8.7±0.33 ^c	1.6±0.31 ^c	0.9±0.23 ^c	4.2±0.29 ^c	4.5±0.37 ^b
61-70	12.1±0.38 ^{cb}	7.8±0.20 ^c	1.9±0.23 ^{bc}	2.4±0.16 ^b	3.8±0.29 ^c	4.0±0.33 ^b
71 이상	13±0.33 ^{cb}	8.5±0.27 ^c	3.8±0.25 ^a	0.7±0.30 ^c	5.5±0.34 ^b	3±0.33 ^c

(n = 10, Mean±SEM, p<0.05)

수정란 회수율의 경우 51개월에서 60개월과 61개월에서 70개월 수의 개체군 및 71개월 수 이상의 개체군이 유의적으로 낮게(8.7±0.33, 7.8±0.20 및 8.5±0.27) 나타났음을 알 수 있었다(p<0.05; 표 45). 이러한 결과로 51개월 수 이상의 개체에서는 수정란의 생산 효율이 감소된다는 것을 알 수 있으며, 또한 회수된 수정란의 개수와 등급 간 관계에서는 회수가 가능한 수정란의 개수에서는 유의적인 관계가 인정되지 않았으므로 생산되는 수정란의 개수와 등급간에는 유의적인 관계가 존재하지 않는다는 것을 알 수 있다. 회수된 수정란의 발달 단계의 경우 상실배는 20-30개월 수 및 31-40개월 수의 개체군에서 유의적으로 높게(7.8±0.49 및 8.7±0.40) 나타났으며, 배반포는 41-50개월 수의 개체군에서 유의적으로 가장 높게(6.7±0.33) 나타났다(p<0.05).

표 46. 수란우의 월령일수에 따른 수정란 이식 후 수태율

개월 수	반복수	수정란 발달단계	수정란 등급	신선란	동결란	임신여부
21-30	10	Morula	1	0		3 / 4
		Blastocyst		0		1 / 2
		Morula	2	0		0 / 2
		Blastocyst		0		2 / 2
31-40	10	Morula	1	0		2 / 2
		Blastocyst		0		3 / 4
		Morula	2	0		1 / 2
		Blastocyst		0		2 / 2
41-50	10	Morula	1	0		2 / 3
		Blastocyst		0		2 / 3
		Morula	2	0		1 / 2
		Blastocyst		0		2 / 2
51-60	10	Morula	1	0		1 / 4
		Blastocyst		0		1 / 2
		Morula	2	0		1 / 2
		Blastocyst		0		1 / 2
61-70	10	Morula	1	0		1 / 3
		Blastocyst		0		1 / 2
		Morula	2	0		1 / 4
		Blastocyst		0		1 / 2
71-80	10	Morula	1	0		1 / 3
		Blastocyst		0		2 / 2
		Morula	2	0		0 / 1
		Blastocyst		0		1 / 3

20개월부터 6단계로 개월 수를 세분화하여 총 70 두에 수정란을 이식한 결과 40두가 임신한 것으로 나타나 수태율은 57.1%로 나왔으며, 61-70개월 및 70개월 이상의 개체군에서는 36~40%의 수태율이 관찰되었다. 반면 31-40개월의 개체군에서 가장 높은 80%의 수태율을 관찰할 수 있었다(표 46). 이는 개체의 개월 수가 증가됨에 따라 수태율은 저하된다는 것을 보여주는 예라고 생각되며, 이러한 결과를 토대로 수정란 이식 효율은 31-40개월의 공란우 및 수란에서 생산된 수정란을 이식하였을 때에 수태율 증진 효과를 얻을 수 있을 것이라고 생각된다.

[제2세부과제명 : 한우 우수 유전자원의 보급을 위한 성 분리 및 번식생리 조절 기술 개발]

본 연구과제에서 정자와 수정란의 성 분리에 의해 생산된 수정란을 이용하여 한우농가에서 암소 생산증가로 인한 경제적 이익을 도모하고, 수정란 이식 시 수태율을 향상시키기 위한 수란우의 난소 및 자궁환경의 분석 및 조절기술을 개발하기 위하여 다음과 같은 내용을 수행하였다.

○ FACs를 활용한 한우 정자의 선택적 성 분리기술 개발

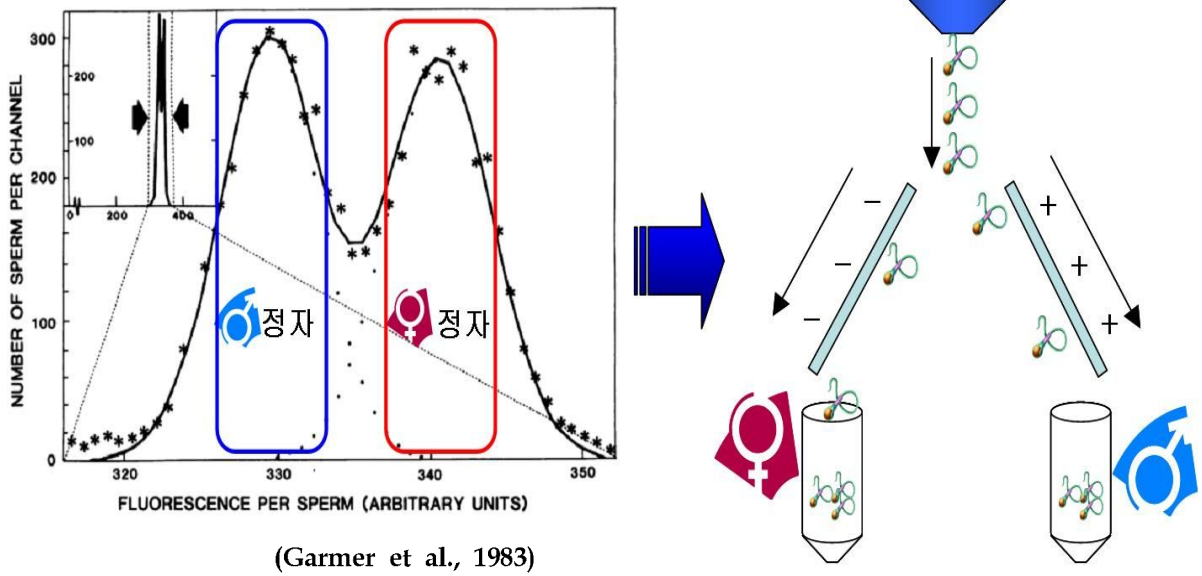
1. 재료 및 방법

1) FACs를 이용한 정자 성 분리

FACs를 이용한 정자 성(sex) 분리 원리는 성을 결정하는 X염색체와 Y염색체의 DNA 함량 차이를 이용하여 살아있는 정자의 DNA를 Hoechst33342로 형광 염색하여 FACs로 형광 감도를 측정하고 감도 차에 따라 정자 성(sex) 비율 분석 및 Sorter를 이용한 성(sex) 분리를 실시하게 된다. 그러나 DNA 함량을 측정하기 위해 사용되는 Hoechst33342의 형광을 분석하는데 UV laser를 필요로 하여 정자 성 분리 과정 중, UV에 노출된 정자의 손상이 발생하고 있다. 이에 본 실험은 정자의 효과적인 성 분리과정을 위해 대안 마련에 초점을 두고 진행되었다. FACs를 이용하여 소 정액의 성비를 분석하던 중 세포의 크기별 DNA 함량의 차이가 나타나는 점을 데이터 분석 시 확인 할 수 있었다. 아래 그림은 FACs를 이용한 정자 성 분리 과정과 세포 크기별 DNA 함량의 차이를 설명해주고 있다.

그림 27에서와 같이 정자크기에 따라 각각의 Hoechst33342의 형광 감도를 측정한 결과 크기가 작을수록 형광 감도가 크게 나타나는 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 결과를 통하여 X염색체를 가진 정자와 Y염색체를 가진 정자의 크기가 다르다는 것을 추측해 볼 수 있었다. 이와 같은 결과를 이용하면 정자 분리 시 발생하는 UV laser에 의한 정자 손상을 방지할 수 있으며, 보다 안정된 정자 성 분리가 가능할 것이라고 생각된다.

(1)



(2)

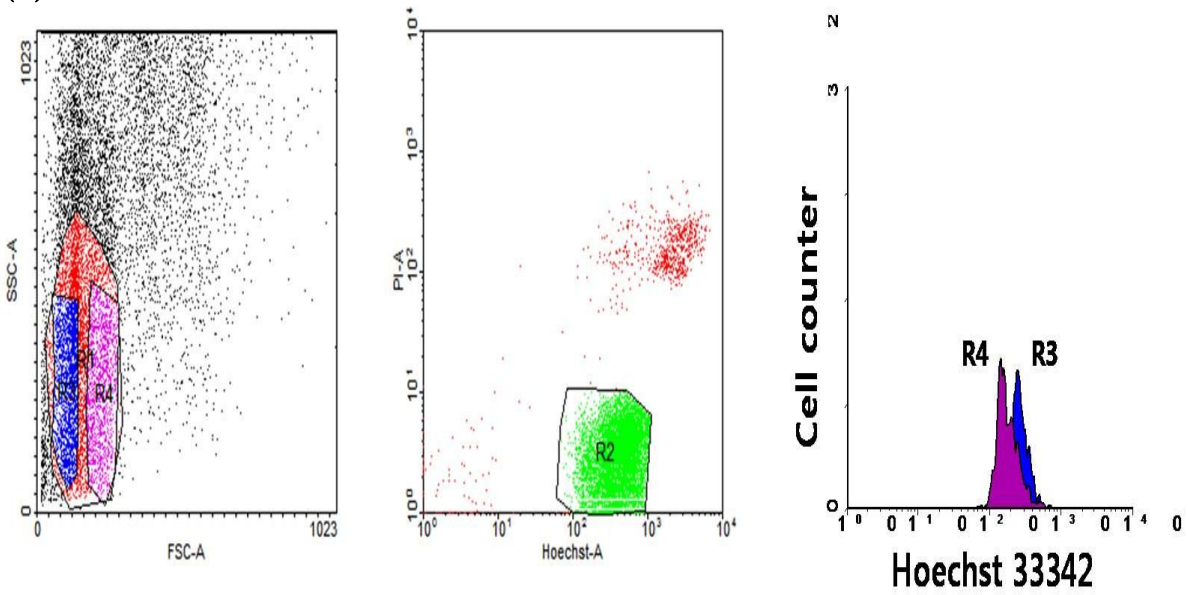


그림 27. FACs를 이용한 소 정자의 성(sex) 분리 원리 (1)와 정자 내 X염색체와 Y염색체 간의 DNA 함량 차이와 세포 크기의 상관관계 (2)

2) 정액의 채취와 동결보존

정액은 인공질법을 이용하여 채정된 정액에 Triladyl(+20% egg-yolk) 동결배양액을 1:1로 첨가하여 2시간 이내로 실험실로 운반하여 실험에 이용하였고, 육안을 통해 70% 이상의 운동성과 80% 이상의 생존율을 확인할 수 있는 정액만을 사용하였다. 정액의 동결은 4°C까지 slow-cooling 된 1차 희석정액을 1.0×10^7 /ml 의 정자 농도로 희석시켜 0.5 ml straw에 로딩하여 실시하였다. 로딩된 straw는 10분간 예비동결을 실시한 후, LN₂에 침치하여 실험에 이용할 때까지 동결보존하였다.

3) HEPES sheath fluid의 조건 하에서 정자 생존율 및 운동성 보존 방법 모색

성 분리에 앞서 본 연구실에서 성 분리에 이용 중인 FACs는 FACs Aria II 모델로 세포분리와 분석을 보완한 기기를 이용하였다. 그러나 본 기기를 이용한 정자 성 분리 사례가 미약하여 정자 분리과정 중 sheath buffer로 인한 정자 손상과 UV 레이저로 인한 정자 손상에 초점을 맞춰 분리된 정자의 생존율을 높여 체외수정율을 향상시키고자 노력하였다. 성 분리과정에서 정자의 생존율에 영향을 미치는 인자로는 pH, 온도, 형광시약의 독소, 레이저 충격 등을 들 수 있어 우선적으로 pH와 온도의 충격을 줄이기 위해 sheath buffer 조건을 잡기위한 실험을 진행하였다.

① HEPES 농도별 단순배양 후 생존율 측정

표 46에 표시된 조성 중 HEPES를 제외한 기본적인 sheath fluid 완충액에 0, 2.5, 5, 7.5 및 10 mM의 HEPES(pH 7.2) 농도된 실험군을 사용하였다. 동결정액은 38°C 항온 수조에서 45초간 용해하여 1,500rpm에서 5분간 원심분리하여 동결액을 제거하고 2×10^7 sperm/ml의 농도로 맞추어 각각 0, 2.5, 5, 7.5 및 10 mM HEPES가 함유된 완충액에서 배양하였다. 또한 각 농도 처리군마다 0, 30, 60 및 120분 동안 세부 처리군을 두어 정자의 생존율을 조사하였다. 한편, 유속세포기를 사용하여 정자 성 분리 분리실험 시 온도에 의한 영향을 확인하기 위하여 냉장 온도인 4°C, 실내 온도인 20°C와 한우의 체내 온도와 비슷한 38°C에서 농도 및 시간별 생존율을 검토하였고 총 3회에 걸쳐 반복 실험하였다.

② Hoechst 33342 염색을 통한 정자 성 분리

유속세포분리를 실시하기 위하여 한우의 동결정액을 38°C에서 45초간 용해한 후 원심분리(1,500rpm에서 5분) 후 상층액을 제거하고 제조한 HEPES buffer로 재부유시켜 정자를 세정하였다. 정자의 농도는 2×10^7 sperm/ml가 되도록 희석한 후, 40 uM의 Hoechst 33342로 DNA를 형광 염색하여 정자를 전처리 하였다. 정자 성 분리 시, FACs Aria II 기기 자체의 온도조절 기능을 통해 4, 20 및 37°C로 온도를 설정한 뒤 정자 성 분리를 실시하였다.

2. 연구 결과

1) Flow cytometry를 이용하여 성 분리된 정자의 생존율

그림 28은 FACs를 통해 실제 성 분리과정을 거친 정자의 정상검사 중 하나인 생존율을 나타낸 것으로 Hoechst 33342에 의해 분리된 정자보다 크기에 의해 분리된 정자의 생존율이 유의적으로 높게 나타나는 것을 알 수 있다($p < 0.02$). 이는 성 분리 시, 정자의 크기에 의한 분리는 UV laser에 의한 정자의 손상을 감소시킬 수 있으며, 이러한 사실은 보다 안정적인 성 분리의 가능성을 뒷받침해줄 수 있는 근거라고 생각한다.

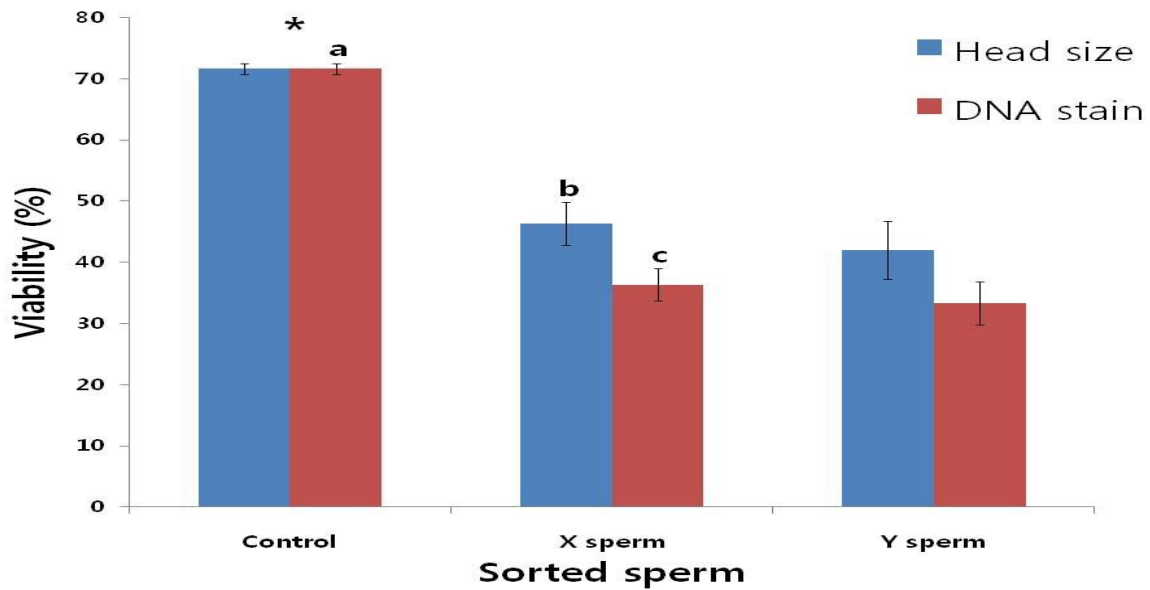


그림 28. Hoechst 33342 형광염색을 통해 성 분리된 정자와 크기에 의해 분리된 정자의 생존율 (* : $p < 0.05$; a,b,c : $p < 0.02$)

표 47. Flow cytometry를 이용한 한우 정자의 성 분리 시 이용되는 sheath fluid buffer 조성

Compound	Concentration (g/L)
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.14
KCl	0.37
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.03
NaCl	6.54
Na-pyruvate	0.02
Lactic acid (60%)	3.51
HEPES	1.19
NaHCO ₃	0.42
Penicillin G	0.058
Streptomycin sulfate	0.05

표 48. 성 분리 후 정자의 생존성, 운동성 및 저장성에 대한 첨가제들의 효과

Effect	Peroll (preparation)	Egg yolk (collection)	BSA (preparation, collection)	Seminal plasma (collection)
Viability	Increased	increased	reduced	-
Motility	reduced	increased	-	increased
Storage	reduced	increased	reduced	-

정자의 생존성과 운동성을 증가시키기 위한 실험의 일환으로 flow cytometry 내에서 사용되는 sheath fluid buffer의 조성과 여러 첨가제들을 사용하여 정자 성 분리 실험에 이용하였다. Sheath fluid buffer의 경우, PBS, FACs flow buffer(BD, USA) 및 Tris가 첨가된 배양액을 이용하였었지만 성 분리 후 정자가 모두 사멸되는 결과를 얻을 수 있었으며, 표 47에 표시된 HEPES sheath fluid buffer에서만 한우 정자가 생존하는 결과를 얻을 수 있었다. 다음으로 이루어진 실험에서 정자 성 분리 전처리에 percoll과 0.4 % BSA를 이용하는 방법과 성 분리 정자가 회수되는 tube에 0.1 % egg yolk와 10% 돼지 정장액을 이용하여 성 분리 정자의 생존성과 운동성 및 저장성을 증진시키고자 하였다(표 48). 실험결과, percoll을 전처리 방법은 정자의 생존성이 증가되는 경향이 나타났으며 돼지 정장액의 첨가는 육안을 통해 정자의 운동성이 증가되는 경향을 관찰할 수 있었다. 0.1 % egg yolk는 성 분리된 정자가 보관된 튜브에 첨가하였을 때에 눈에 띄게 생존성과 운동성 및 저장성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 본 결과를 토대로 이후의 정자 성 분리 실험에는 HEPES sheath fluid buffer를 이용하여 정자 성 분리가 진행되었으며 0.1 % egg yolk 첨가가 이루어져 실시되었다.

2) HEPES 농도 및 온도가 정자의 생존성에 미치는 영향 분석

서로다른 온도에서 정자의 HEPES를 농도 별로 처리한 뒤 분석한 결과를 그림 29~31에 나타내었다. 모든 온도에서 HEPES의 처리 시간이 길어질수록 정자의 생존율은 낮아지는 경향을 보여 주었으며 그림 32에서 나타낸 바와 같이 4°C에서 정자를 60분 동안 배양했을 때 5mM HEPES가 2.5mM을 제외한 다른 처리구에 비해 생존율이 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 20°C에서 정자의 생존율을 측정된 결과 보관 전에는 5mM, 배양 30분 후에는 대조군 그리고 배양 60분 후에는 2.5mM과 5mM의 HEPES에서 유의적으로 높은 생존율을 보였다($p < 0.05$). 그림 31의 38°C에서 처리시간이 경과함에 따라 각 HEPES 농도별 처리군의 생존율이 4°C 및 20°C 온도 처리군에 비해 완만하게 하락하는 경향을 보였으며 5mM HEPES는 60분에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.

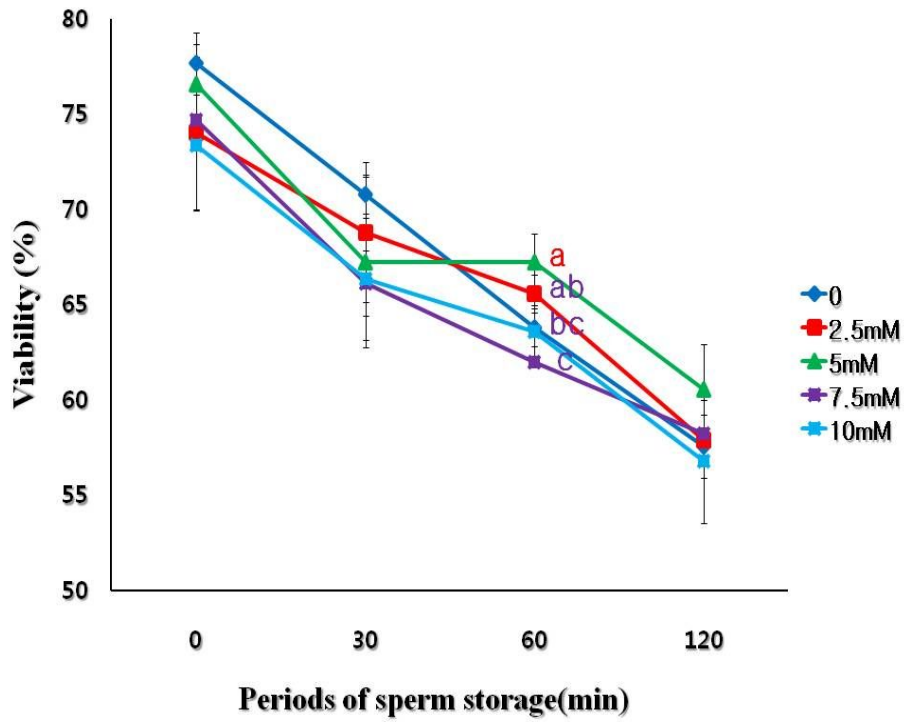


그림 29. 한우 정자에서 4°C 온도조건일 때 HEPES 농도별 및 배양시간에 따른 생존율 변화 ($p < 0.05$)

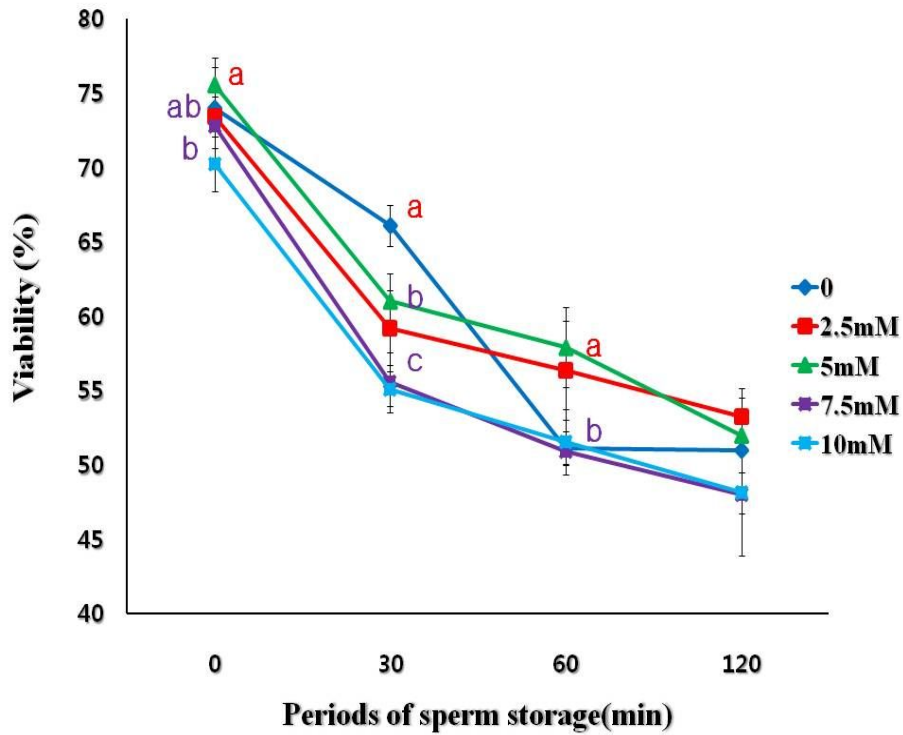


그림 30. 한우 정자에서 20°C 온도조건일 때 HEPES 농도별 및 배양시간에 따른 생존율 변화 ($p < 0.05$)

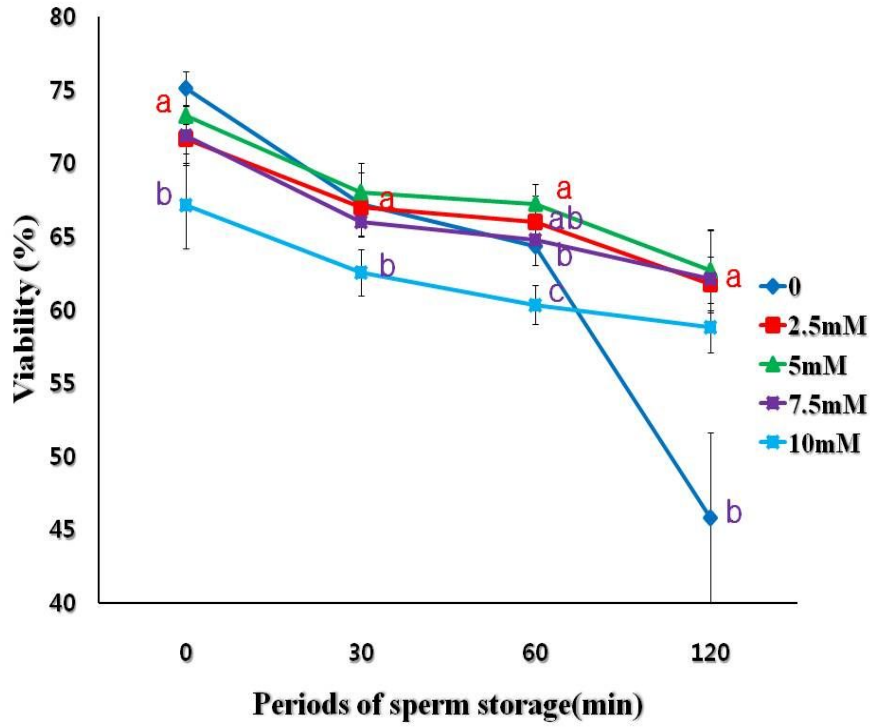


그림 31. 한우 정자에서 38℃ 온도조건일 때 HEPES 농도별 및 배양시간에 따른 생존율 변화 ($p < 0.05$)

실제 flow cytometry 상에서의 온도를 다르게 설정한 뒤 정자를 성 분리한 결과, 정자는 각각 X-정자와 Y-정자 구분하여 생존율을 검사하였다(그림 32와 33). X-정자의 생존율은 그림 32에서 나타낸 바와 같이 37℃는 대조군과 유의적 차이가 인정되지 않았으나 4℃ 및 20℃에서는 유의적으로 낮았다. 한편 Y-정자의 성 분리에서 온도 차이에 따른 생존율에 유의적인 차이는 인정되지 않았다($p < 0.05$).

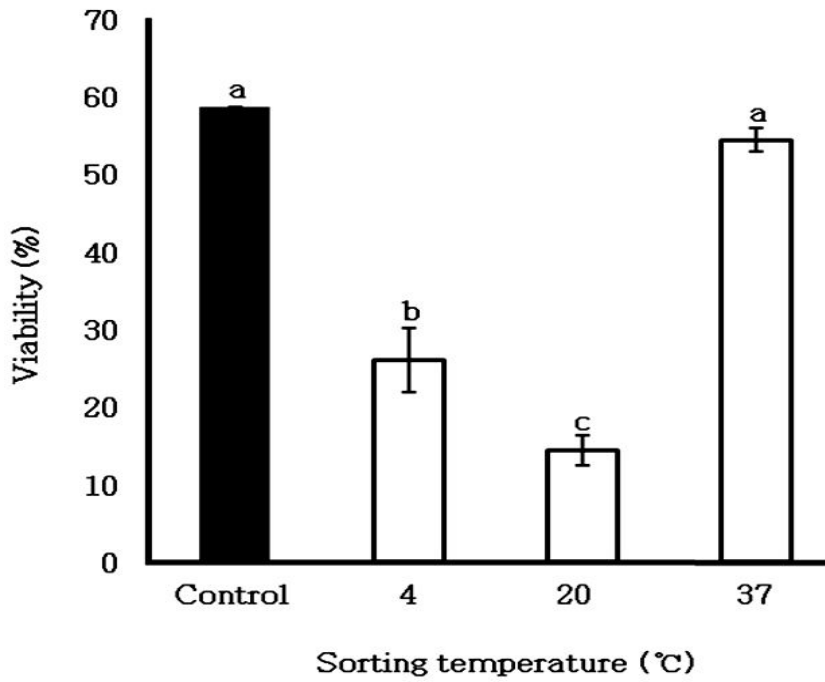


그림 32. 여러 가지 온도 조건 (4, 20 및 37°C)에서 Flow cytometry를 이용하여 분리된 X-정자의 생존율 ($p < 0.05$)

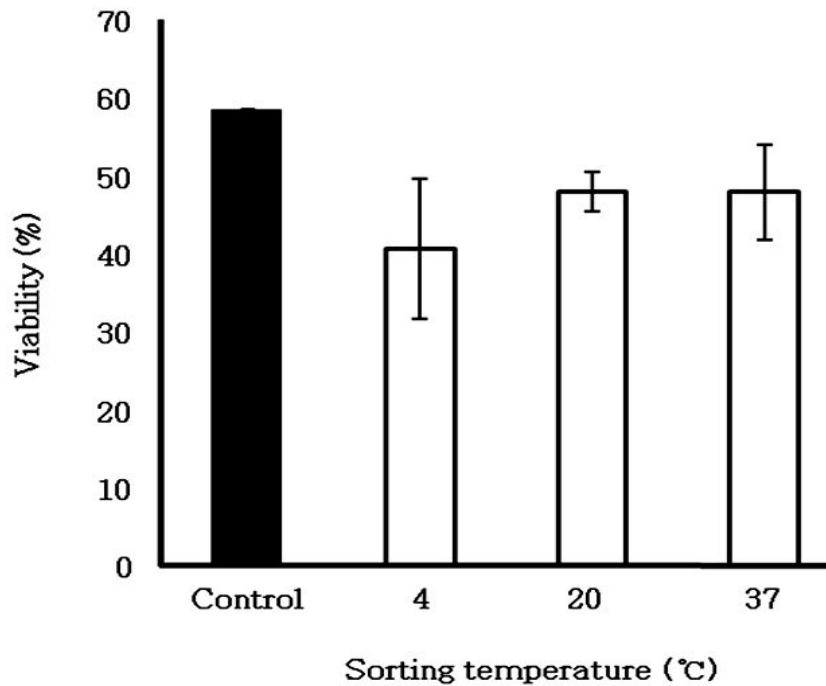


그림 33. 여러 가지 온도 조건 (4, 20 및 37°C)에서 Flow cytometry를 이용하여 분리된 Y-정자의 생존율 ($p < 0.05$)

한우 정자의 성 분리 효율을 예측하는 것은 한우 산업에 성 분리를 상업적으로 적용하기 위해서 상당히 중요한 요소이다. 본 실험에 이용한 FACs AriaII 유속세포분리기에서 sheath fluid는 흐르는 가속도에 의한 수압으로 central core를 통해 모인 세포를 일렬로 나열하는 유체역학적 노즐 효과에 결정적인 역할을 하게 된다(그림 34). 이때 central core를 빠져나온 세포들은 sheath fluid와 직접적인 접촉이 이루어지기 때문에 이 용액이 불안정하면 정자가 손상을 입을 가능성이 있다. 성공적인 정자 성 분리는 반드시 염색, 레이저 노출, 압력 상승에 대한 민감성과 성 분리 과정동안 일어날 수 있는 배양액의 몇몇 조성 변화를 고려해야만 한다. 이러한 요소들 가운데 sheath fluid에 초점을 맞춰 본 연구를 진행한 이유는 완충액의 조성을 보완하는 것이 간편하고 경제적이어서 장비가 달라도 적용이 용이하기 때문이다. 실험의 결과 정자의 생존율을 HEPES의 농도와 상관없이 시간이 지남에 따라 감소하는 양상을 보였으나 38°C에서는 다른 온도에 비해 완만하게 감소하는 것으로 나타났다. 한편, 38°C에서 HEPES를 첨가하지 않은 대조구는 HEPES가 첨가된 그룹에 비해 60분에서 120분 사이에 생존율이 매우 급격하게 하락했다. 유속세포분리 시 한 마리의 정액을 모두 성 분리하는데 소요되는 시간은 60분에서 120분 사이이다. 이와 같이 정자의 성 분리에 소요되는 시간을 기준으로 비교했을 때 5mM의 HEPES가 첨가된 배양액을 사용하였을 경우 생존율이 유의적으로 높게 나타났고($p < 0.05$), 특히 38°C에서 처리 시간에 따른 생존율의 감소폭이 적게 나타나 유속세포분리 시 적용 할 수 있는 적정 온도라 여겨진다. 5mM HEPES를 sheath fluid로 사용하여 성 분리한 후의 생존율은 X-정자가 Y-정자보다 온도에 민감하게 반응하였으며, 따라서 X-정자와 Y-정자 모두 대조구와 유의차가 없었던 37°C에서 분리하는 것이 가장 적당한 조건이라고 생각된다. 농도실험과 달리 유속세포분리를 통한 실험에서 온도를 37°C로 설정한 이유는 기계 설정에 38°C가 없었기 때문이다. 그러나 37°C에서 유속세포분리를 실시해도 생존율에 있어서 대조구와 유의차는 없는 것으로 보아 5mM HEPES가 포함된 sheath fluid를 이용하여 37°C에서 성 분리를 할 경우, 유속세포분리로 인한 피해가 줄어들어 성 분리 효율의 증진을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

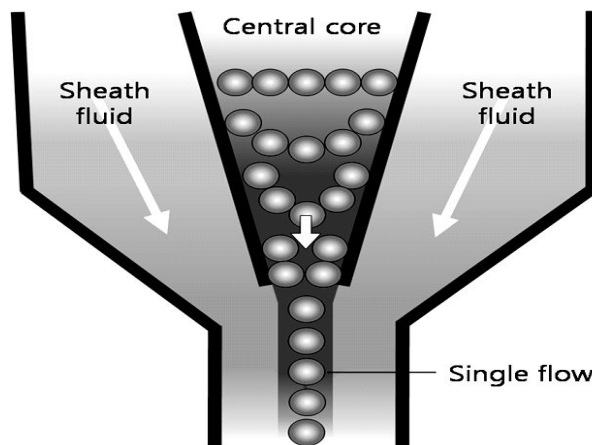


그림 34. Flow cytometry 내에서의 sheath fluid의 hydro-dynamic focusing 효과

○ 실용적인 정자 성 분리 기술 및 성 판별을 통한 선택적 수정란 생산

1. 재료 및 방법

1) Flow cytometry에 의한 정자 성 분리

한우의 정액은 황성축협내 농장의 종모우로부터 인공질법으로 채정된 정액을 사용하였다. 채정즉시 정액은 Triladyl에 20%의 egg yolk가 함유된 희석액에 1:1비율로 희석하였다. 그 후 실험실로 운반된 정액은 2차희석을 하였고 0.5ml straws에 넣어 액체질소에 보관하였다. 실험에 사용하기위해 동결된 정액은 37℃로 가온된 수조에서 45초간 용해하여 사용하였다. 65% Percoll을 사용해서 15분간 1,700rpm에서 원심분리를 실시하였다. 그 후 pellets은 1ml의 HEPES sheath flow buffer를 넣고 Hoechst33342를 40μM분주하여 38℃에서 30분간 형광염색을 실시하였다. 마지막으로 1,500rpm에서 5분간 원심분리 한 뒤 flow cytometry에 사용하였다. 그림 35에서와 같이 flow cytometry상에 나타난 정자의 dot plot을 Hoechst33342 형광염색에 의해 R3와 R4구역으로 나누어 정렬하였다. 그 결과 각 영역이 독립적으로 별도의 X와 Y염색체로 구분하여 실험을 진행하였다. 이를 바탕으로 Flow cytometry를 이용하여 성 분리를 진행하였고 그림 36와 같이 DNA의 양과 FSC에 근거하여 X와 Y정자를 분리하였다. 정자는 초당 50~200마리가 분류되게 하였고 100μm의 노즐과 20psi의 HEPES sheath fluid 압력을 사용하여 정렬시켰다. 정자는 0.4%BSA 용액에 최소한 $1\sim5 \times 10^6$ ml의 최종농도로 분류되도록 5ml tube에 모았다. 성 분리를 마친 정자는 1,500rpm에서 7분간 원심분리 하였고 pellet은 HEPES buffer에 2% egg yolk가 함유된 배양액에 재부유하여 실험에 사용하였다.

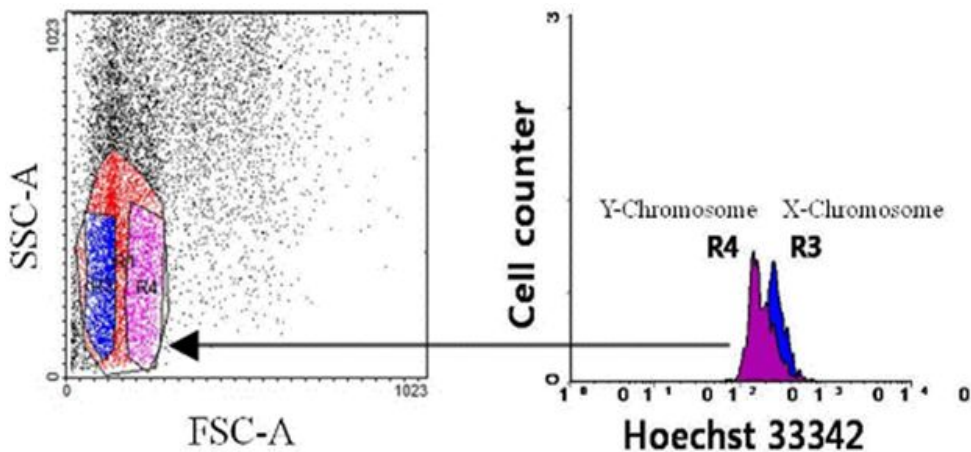


그림 35. 히스토그램 상의 R3 및 R4 구역이 dot plot상에서 분할되어 분포되어 있는 모습. R3와 R4 구역은 Hoechst 33342 형광염색에 의하여 독립적으로 발견되어 있는 구역으로 관찰

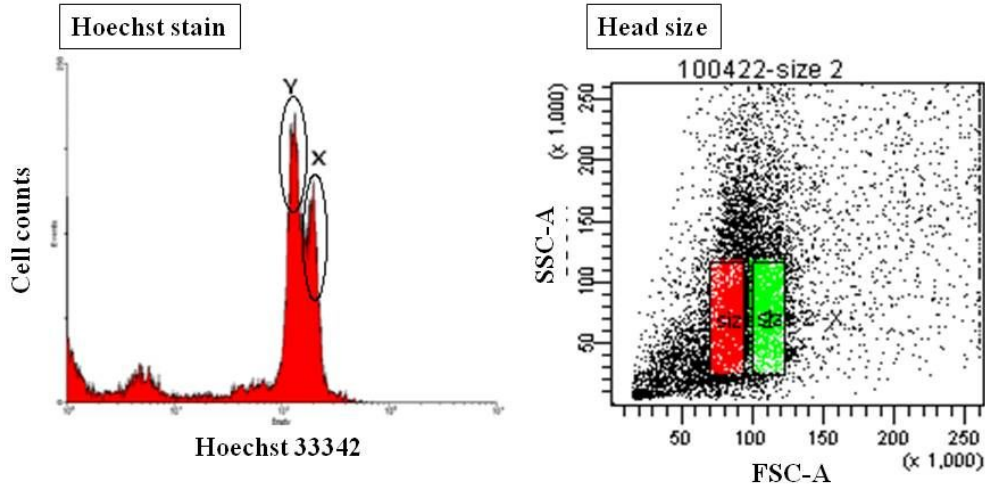


그림 36. Hoechst 33342에 의해 분리된 X- 및 Y-염색체와 dot plot상에서의 FSC-A에 의해 구획화된 X- 및 Y-정자의 선택모습.

2) 성 분리된 정자의 정상검사 및 체외수정을 통해 생산된 수정란의 성비 조사

성 분리된 정자는 정상검사와 체외수정을 통한 수정란의 성비를 조사하였다. 먼저 정상검사는 그림 37과 같이 생존율과 기형율, 침체반응율 및 강도 검사를 실시하였다.

정자의 생존율 분석을 위해서 LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit를 사용하였다. 살아있는 정자는 SYBR-14로 염색되어 녹색형광을 띄고 죽어있는 정자는 PI로 염색되어 붉은 형광을 띄게 된다. 정액 샘플은 PBS에 희석하였고 여기에 SYBR-14를 넣어 37°C에서 5~10분간 배양후 PI를 분주하여 5~10분간 37°C에서 배양하였다. 그 후 형광현미경하에서 정자의 생존율을 검사하였다.

정자의 기형율 분석을 위해 정액샘플을 PBS에 희석한 뒤 1,500rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 뒤 정자는 유리 슬라이드에 균일하게 분주한뒤 5~10분동안 건조시킨뒤 rose bengal을 이용하여 염색하였다. 광학현미경하에서 평균 300마리이상의 정자 기형율을 분석하였다.

정자 침체반응율의 분석은 Coomassie Brilliant blue G-250 (CBB)염색방법을 사용하였다. 먼저 슬라이드에 고정된 정자를 CBB형광시약에 5분간 담가 배양한 뒤 슬라이드를 증류수로 씻어내었다. 광학 현미경하에서 온전한 침체를 가지는 정자는 정자두부의 위부분이 파란색으로 염색이되었고 침체반응이 일어난 정자는 두부의 윗부분에 염색이 되지 않는 방법을 이용하였다. 침체반응율은 침체반응의 유도 전후의 침체상태의 차이 비율을 분석하였다.

정자의 hypo-osmotic swelling test (HOST)검사는 저삼투압 용액에 정자를 넣고 30분동안 정자가 저 삼투압환경에서 세포내 삼투상태를 유지하는 정자의 비율을 분석하기 위한 방법으로 세포막내 삼투압펌프의 기능에 대해 평가하기 위한 방법이다. HOST용액과 정액을 혼합하고 30분간 37°C에서 배양하였다. 유리 슬라이드에 분주한 뒤 광학현미경하에서 정자의 꼬리부분의 형태 변화를 통해 강도검사를 실행하였다.

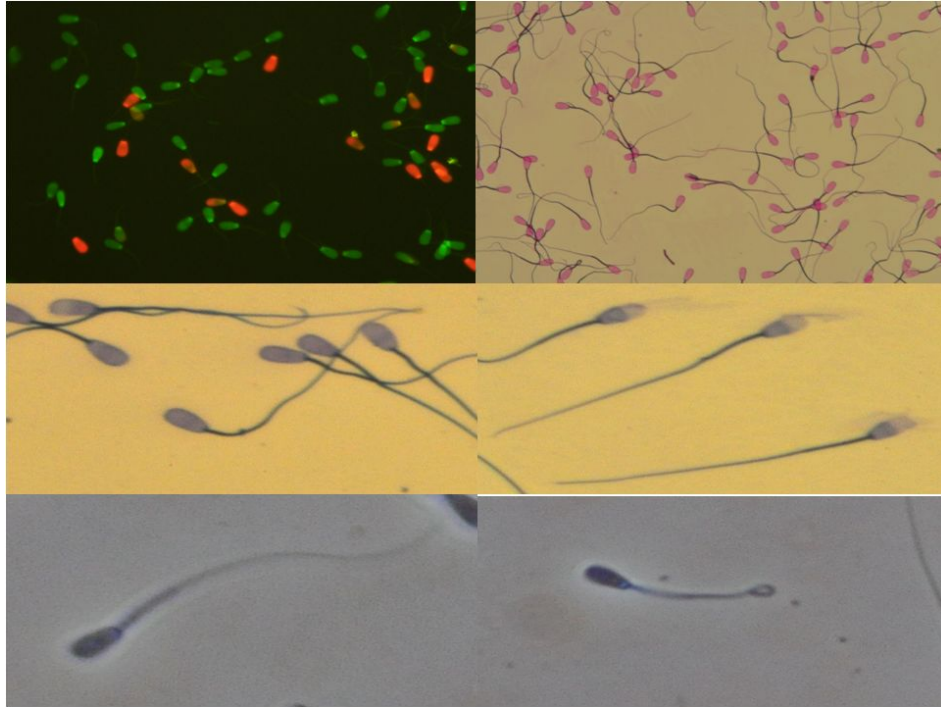


그림 37. 성 분리된 정자의 생존율, 기형율, 침체반응율 및 강도 검사

다음으로 성 분리된 정자의 수정란의 성비 조사를 위해서 먼저 체외수정을 실시하였다. 실험에 사용한 난소는 도축장의 소로부터 수집하여 실험실로 운반하였다. 난자는 18-gauge 주사기를 통해 수집하였다. 수집된 난자는 선별하여 성숙 media에 옮기고 미네랄 오일로 코팅하여 38.5°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 20~22시간 성숙 배양한 난자는 hyaluronidase 사용하여 난구세포를 제거하였고 Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP-Fer)로 세척하여 난자를 TALP배양액에 넣어 인공수정에 사용되기전까지 인큐베이터에 저장되었다. 사용된 정자는 성 분리된 정자 샘플을 TALP-SP배양에 워싱한 뒤 채부유하여 난자가 배양된 drop에 넣어주었다. 16시간동안 IVF를 거친 후, 난자의 수정media를 제거하고 CR1aa media에서 옮겨 체외 배양을 진행하였다.

성 분리방법을 사용하여 얻은 정자로 IVF를 한 후 생산된 16~32cell단계의 수정란의 S4유전자 영역을 찾기위해 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용하였다. 수정란의 투명대를 제거한 뒤 세포질을 PBS로 3번 세척하였으며 DNA extract tubes에 옮겼다. 먼저 DNA 추출을 위해 proteinase K와 섞어 주고 세척 한 뒤 8,000rpm에서 원심분리하고 추출된 genomic DNA를 PCR mixture tube로 옮겼다. 프라이머는 S4BF과 S4BR을 사용하였다. forward primer 5'- CAA GTG CTG CAG AGG ATG TGG AG -3' 와 reverse primer 5'- GAG TGA GAT TTC TGG ATC ATA TGG CTA CT -3'. 두 성에서 전부 나타나는 것이 145bp, 남성에서는 특이하게 178bp에서 증폭하도록 설계되었다. PCR 반응 조건은 denaturation을 위해 95°C에서 5분간 반응 시킨 뒤 35 cycle을 95°C에서 5분간 denaturation, 54°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension시켰다. 그리고 추가적으로 72°C에서 5분간 extension시켜주었다. 증폭 후 PCR반응물은 2% agarose gel 및 1x TAE buffer에 전기영동 되었다. gel은 0.5 µg/ml EtBr에 착색한 뒤 증폭된 DNA 밴드는 자외선 조명에서 시각화 되었다. 아래 그림 38은 성 판별을 위한 DNA 추출 및

PCR 조건을 나타낸 것이다.

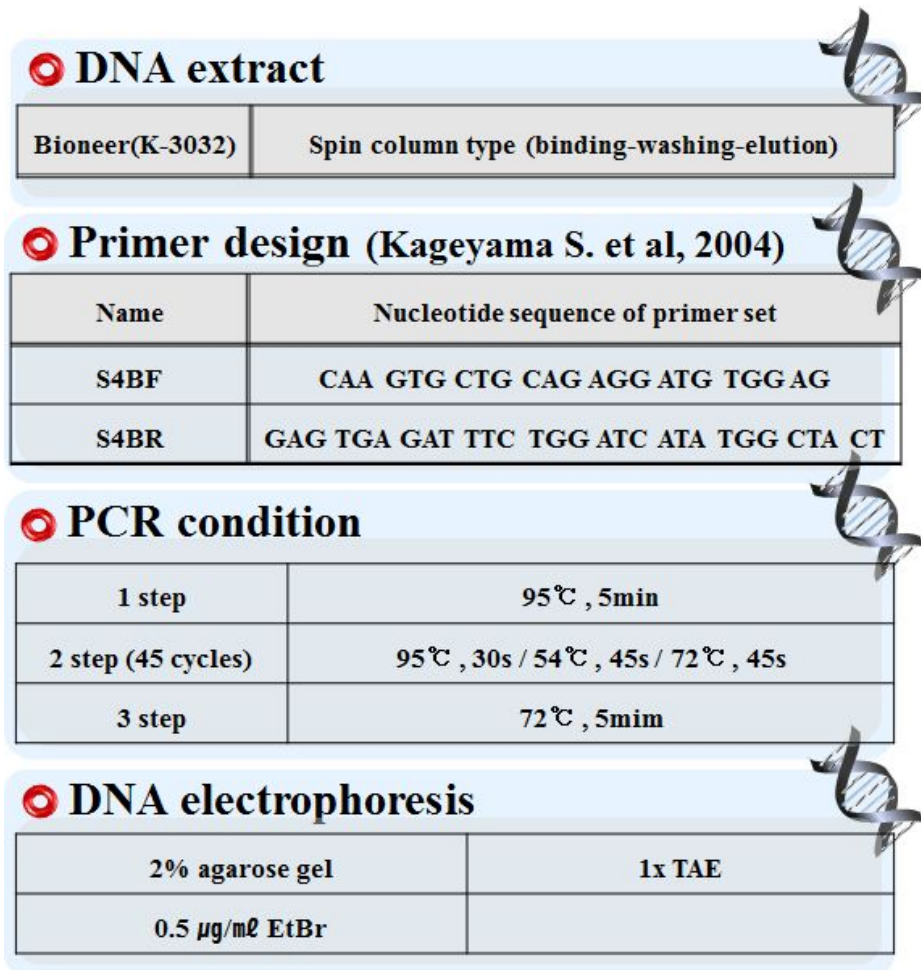


그림 38. 성 판별을 위한 DNA 추출 및 PCR 조건

2. 연구결과

1) 성 분리 정자의 성상 검사

성 분리 정자의 성상 검사 결과를 그림 39와 표 49에 나타냈다. 먼저 신선 및 동결 정액을 이용한 정자 성 분리 후의 생존율에서 신선정액의 경우 크기를 이용한 분리가 Hoechst를 이용하여 DNA함량차이로 분석한 것 보다 높은 생존율을 보였다. 또한 컨트롤 그룹에서 DNA의 함량차이에 의한 분리보다 상당히 높은 생존율을 보였다. 신선정액과 동결 용해 후 정액 사이의 비교에서는 동결 용해후 성 분리를 실시한 정자가 신선정액보다 높은 생존율을 보였다(그림 39). 이러한 결과는 성 분리 시 살아있는 정자만을 선택하여 성 분리를 실시하였기 때문에 실험에 이용된 control에 비해 높은 생존율을 나타낼 수 있었다.

정자의 강도검사에서 성 분리 된 정자 중 X 정자의 막 강도가 유의적으로 높게 나타났으며, 침체 상태에서 보면 Y 정자의 침체 손상이 유의적으로 낮게 나타났다(표 49). 분리 형태에 따른 유의적 차이는 없었다.

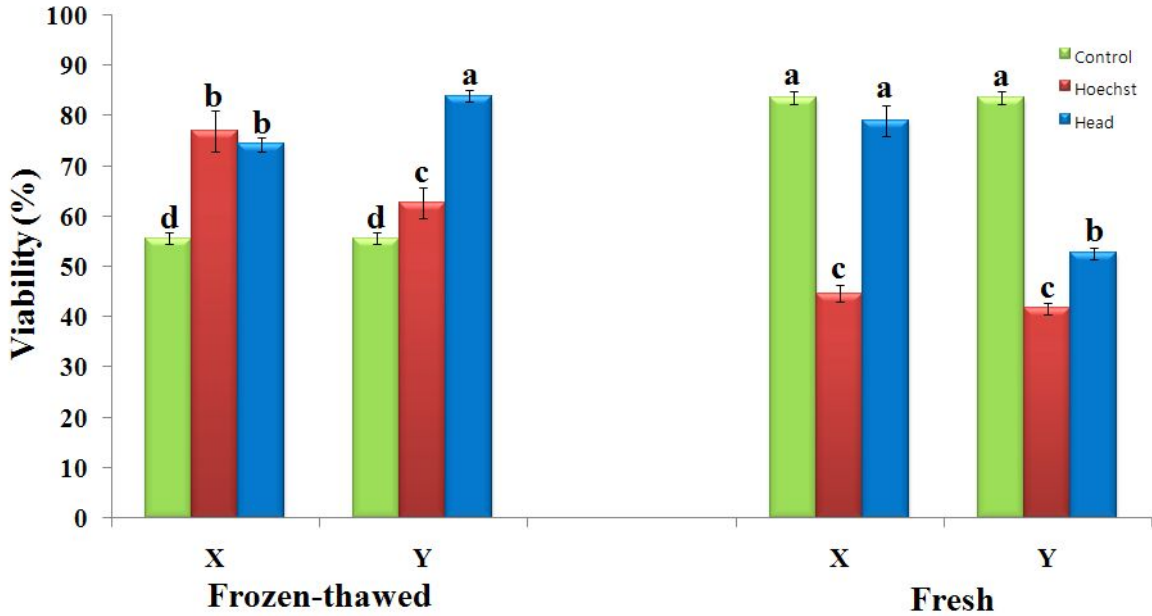


그림 39. 신선 및 동결 정액을 이용한 정자 성 분리 후의 생존율

표 49. 성 분리된 정자의 강도, 기형을 및 첨체반응을 검사 결과

Treatment	HOST	Abnormality	Acrosome reaction
Control	31±2.08 ^a	9±0.58	53±2.08 ^a
Head size X	24.33±1.2 ^b	8.67±0.88	55±1.73 ^a
Head size Y	19.66±1.2 ^c	6.33±0.66	36.67±2.02 ^c
Hoechst X	25.67±0.88 ^b	8.67±1.45	45±1.53 ^a
Hoechst Y	13.67±1.2 ^d	6.67±0.33	32.33±0.88 ^c

2) 정자 성 분리 효율 및 생산된 체외 수정란의 성비 분석

성 분리 효율을 입증하기 위하여 분리된 정액을 사용하여 체외 수정을 한 뒤 수정란을 이용하여 그림 40과 같이 PCR을 이용하여 성관별을 실시하였다. 표 50에 나타난 바와 같이 분리 정 밀도와 실제 성비 비율사이에는 많은 오차가 존재하였다. X나 Y비율에서 DNA함량이나 FSC사이에 유의적 차이는 없었다(표 50). FSC방법을 이용하여 성 분리를 실시한 뒤 PCR에 의한 수정란의 X와 Y의 비율은 66.03±3.31%과 70.56±2.42%로 나타났다. Hoechst33342를 사용하여 분리 한 뒤 성분리 비율을 본결과 X의 비율은 69.37±1.41%, Y의 비율은 56.11±3.09%이다. 또한 모든 성 분리된 정자는 낮은 수정율을 나타냈다. 여러 실험에서 성 분리된 소 정자에서 체외수정 한 뒤 분할율은 유사했지만 blastocyst는 감소하였다고 보고하였다. 또한 성 분리 되지 않은 정자에 비해 성 분리된 정자를 사용하였을 때 낮은 임신율을 보인다는 보고들이 있었다. 실험 결과, 성 분리 된 정자에서 22~37%의 낮은 수정율이 나타났는데 이것은 수정란 생산을 위한

IVF protocol이 적합하지 못하거나 또 다른 수정을 저하 요인이 발생했을 거라고 생각된다. 일반적으로 성 분리의 효율성은 MoFlo(Beckman, USA) 라는 장치에서 많이 개발되었고 사용하고 있어 FACsAriaII model을 이용하여 정자의 성 분리를 효율적으로 진행한 연구는 미비한 상태이다. 본 연구에 사용된 모델은 분리를 위한 정자 세포의 정렬에 대한 제한점을 나타내고 있어 정확한 성 분리 이루어지지 않았고 성 분리 후 IVF에서 생산된 수정란의 성비율의 정확도에서도 오류가 발생하였을 것이라 생각된다.

결론적으로 FSC 및 Hoechst 33342를 이용한 성 분리 기술에서 FSC에 의한 성 분리 가능성을 성 분리된 정자수, 정자의 생존율, 운동성 및 수정능력 등의 성상검사를 통하여 알 수 있었지만 성 분리 효율에 대한 문제점이 노출되었다. 이는 정자 성 분리 시에 소프트웨어를 통한 flow cytometry에 대한 분리 명령이 실질적으로 정렬이 제대로 이루어지지 않은 정자 세포의 분리와 100% 일치되지 못하는 기계적 한계점으로 판단이 되며, 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 기계 장치 내의 노즐(성 분리를 위한 정자 세포의 배열에 가장 핵심적인 장치)에 대한 개선이 이루어져야 가능할 것으로 생각된다. 하지만 이러한 작업은 장시간을 요하는 복잡한 과정이라 본 연구의 수행과정 동안에는 실행할 수가 없었다.

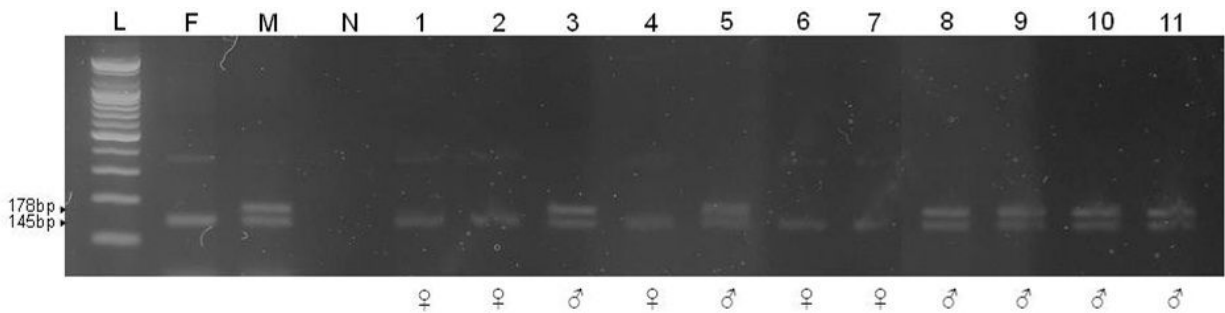


그림 40. S4BF/R primer set에 의한 수정란의 성 판별 결과. 178 bp: male, 145 bp: female, L: 100 bp DNA ladder, F: positive control of female oocyte, M: positive control of male sperm, N: negative control, 1~11: bovine embryos.

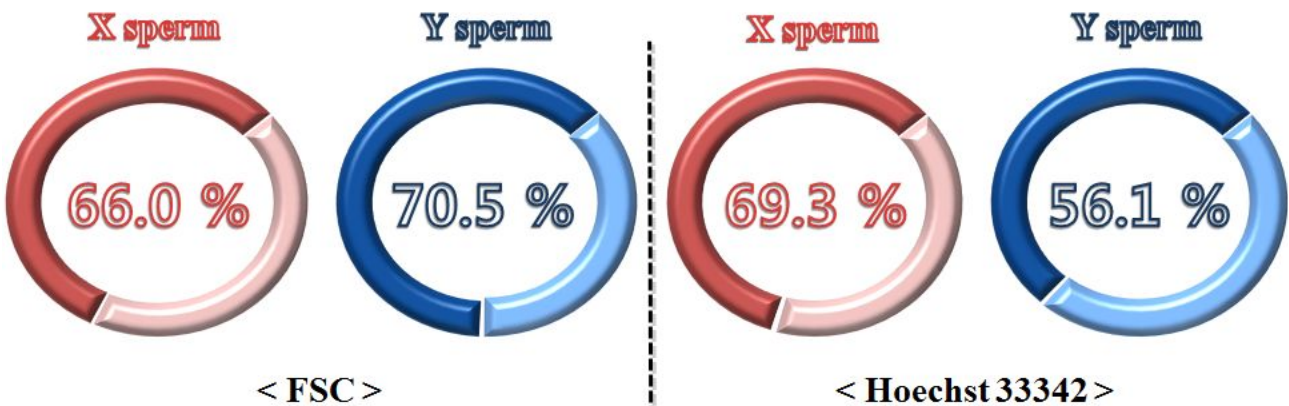


그림 41. FSC 및 Hoechst 33342 염색에 의해 성 분리된 정자를 이용하여 생산된 체외 수정란의 성비

표 50. 한우에서 성 분리된 정액을 이용하여 생산된 체외 수정란의 성비 비교

Sperm group	No. of oocytes	Cleavage rate (%)	Sorting efficiency ¹⁾ (%)	Percentage of males	Percentage of females
FSC-x ²⁾	120	22.49 ± 0.46 ^c	97 ± 0.57	33.97 ± 3.31	66.03 ± 3.31
FSC-y ³⁾	121	27.17 ± 1.42 ^b	96 ± 0.33	70.56 ± 2.42	29.44 ± 2.42
H-x ⁴⁾	115	30.93 ± 1.27 ^b	96 ± 0.67	30.63 ± 1.41	69.37 ± 1.41
H-y ⁵⁾	121	37.53 ± 1.24 ^a	97 ± 1.33	56.11 ± 3.09	43.89 ± 3.09

(Mean ± SEM, $p < 0.05$)

¹⁾ This parameter indicates correctly separated ratio of sperm in flow cytometry.

²⁾ FSC-x: Sorted X sperm without near UV laser beam in flow cytometry.

³⁾ FSC-y: Sorted Y sperm without near UV laser beam in flow cytometry.

⁴⁾ H-x: Sorted X sperm using differences in DNA content by Hoechst 33342.

⁵⁾ H-y: Sorted Y sperm using differences in DNA content by Hoechst 33342.

○ 자궁 내 환경의 변화에 의한 수태율과 수정란이식 적기 결정에 영향을 미치는 요인 분석

1. 발정시기에 따른 번식 생식기 조직 내 분비 물질 분석

소에 있어서 수정적기를 찾는 것은 매우 중요하다. 인공수정시간과 횟수에 있어서 경제적으로나 노동력의 절감에 중요한 요인으로 여기진다. 그러한 이유들로 수정의 적기를 찾기위해 CIDR와 같은 호르몬제제와 co-synch방법같은 발정동기화방법을 통해서 수태율을 향상시키기 위해서 많은 연구가 되어지고 있다. 이에 2차원 전기영동법을 이용하여 발정주기동안에 자궁경관점액의 변화나 발현되는 단백질,또는 일정시기에 새롭게 나타나는 단백질을 찾아보고 특히 수정적기로 여겨지는 시기의 자궁경관점액내에 단백질의 변화를 알아보하고자 다음과같은 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

발정시기에 따른 생식기 분비물의 변화를 분석하기 위해 아래와 같은 실험 계획하에 실험을 진행하였다. 실험은 발정주기가 일정한 10두의 한우 암소를 이용하였으며, 그림 42에서와 같이 발정일 2일 전(PGF2 α 주사일)부터 재발정일까지 2일 간격으로 자궁경관점액을 채취하여 자궁경관점액의 pH와 자궁경관점액 내 단백질 변화를 분석하였다.



그림 42. 자궁경관점액 채취 일정

1) 자궁경관점액의 pH

자궁경관점액의 pH분석을 위해 발정일 2일전(PGF2 α 주사일)부터 재발정일까지 자궁경관내에서 직접 점액을 채취하여 pH별로 색깔이 변하는 리트머스종이를 이용하여 자궁경관점액의 pH를 분석하였다.

2) 자궁경관점액내 단백질 분석

자궁경관점액내 단백질 분석을 위해 발정일 2일전(PGF2 α 주사일)부터 재발정일까지 자궁경관내에서 직접 점액을 채취하였다. 채취된 샘플은 lysis buffer로 M-PER를 사용하여 단백질을 추출하

였고 4°C 12,000 × g에서 30분간 원심분리한 뒤 상층액만 걸어서 사용하였다.

Clean-up kit를 이용해 단백질을 정제하고 Bradford method를 이용하여 총 단백질양이 300µg/µl가 되도록 정량하여 Rehydration buffer에 용해하여 총 300µl가 되도록 하였다. 이것을 18cm, pH 3~11 NL IPG strip을 이용하여 20°C에서 16시간동안 흡수시켰다. 단백질의 등전점을 찾아주기 위하여 Isoelectric Focusing(IEF)를 실시하였다. 500V에서 1시간, 1,000V에서 1시간, 8,000V에서 4시간 30분, 10,000V에서 4시간으로 토탈 10시간 30분동안 실시해 주었다.

IEF가 끝난 IPG strip은 equalibration buffer 5ml에서 1,4-dithiothreitol (DTT) 0.08g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 반응시킨 뒤, equalibration buffer 5ml에 Iodoacetamide (IAA) 0.1g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 반응시켜 평형시켰다. SDS-PAGE는 10% acrylamide gel에 IPG strip을 sample로 이용하여 50mA에서 7시간동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 silver staining kit를 이용하여 염색한 후 육안으로 검토하였다. 자궁경관점액의 2차원 전기영동에 대한 전체적인 모식도를 그림 43과 그림 44에 나타냈다.

Sampling




Extraction	Fixed quantity	Purification
		
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lysis buffer : M-PER buffer ▪ Rotation : 4°C, 30min ▪ Centrifugation : 12000g, 4°C, 30min ▪ Supernatant collection ▪ Store : -80°C 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bradford method ▪ Total protein : 300µg 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2-D Clean-Up Kit ▪ Buffer: rehydration sol. ▪ Final volume: 300µl ▪ 18cm, NL pH 3-11 IPG strip ▪ Rehydration : 16h

그림 43. 자궁경관점액 sampling 과정

Electrophoresis




IEF(Isoelectric focusing) <ul style="list-style-type: none"> ▪ 18cm, NL pH 3-11 IPG strip ▪ 500V 1hr, 1000V 1hr, ▪ 8000V 4.5hr, 10000V 4hr total 10.5hr 	2D- electrophoresis <ul style="list-style-type: none"> ▪ DTT 15min, IAA 15min ▪ 10% polyacrylamide gel ▪ 150V 10min, 50mA 4.5h 	Silver staining <ul style="list-style-type: none"> ▪ Silver staining kit
		

그림 44. 자궁경관점액의 2차원 전기영동

2. 연구 결과

자궁경관점액의 pH를 분석한 결과를 그림 45과 표 51에 나타냈다. 그 결과 인공수정시기인 2일차의 pH가 유의적으로($p < 0.05$) 낮게 떨어졌으며, 수정란이식시기인 10일차의 경우에서도 pH가 낮아졌으나 개체별 점액의 pH변화가 너무 크게 나타나 수정 적기나 수정란 이식적기를 나타내는 지표로 사용하기에는 부적합하다는 결론을 얻었다. 자궁경관점액 내 단백질 변화 분석은 2차원 전기영동을 통해 분석을 실시한 결과 그림 46, 47에서와 같은 단백질의 분포를 보였다.

발정시기에 따른 번식 생식기 조직 내 분비 물질 분석을 하기 위하여 자궁경관점액의 pH와 자궁경관점액내 단백질의 분석을 실시하였다. 자궁경관점액의 pH의 변화는 개체간의 pH변화가 너무 크게 나타나서 수정적기나 수정란 이식적기를 나타내는 지표로서 사용하기에 부적합하다고 여겨졌다. 자궁경관점액의 단백질 분석을 위해 2차원 전기영동을 실시한 결과에서도 실험의 재현성을 얻기가 힘든 결과를 보였다. 기본적으로 자궁경관점액의 점성 때문에 단백질의 정제와 정량을 함에 있어서 정확한 수치를 얻을 수 없었다. 단백질의 정제와 정량값이 재현성을 가지지 못했기 때문에 2차원전기영동 후 gel의 이미지가 재현성을 가지지 못했다. 시료 채취과정에서 개체간의 자궁경관점액의 점성과 이물질등의 제거과정을 거쳤지만 정제, 정량이 정확이 이루어지지 않았다.

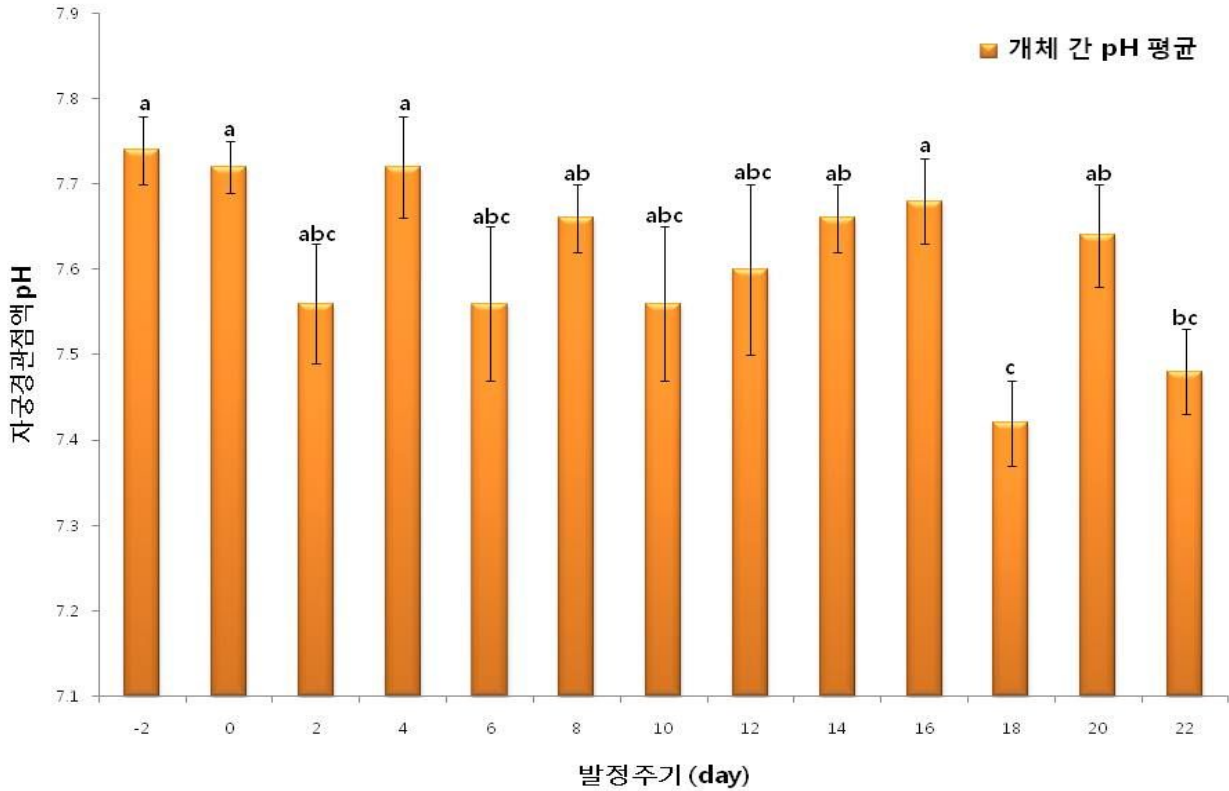


그림 45. 한우의 발정주기 동안 자궁경관점액 pH의 변화 ($p < 0.05$)

표 51. 한우의 발정주기 동안 자궁경관점액의 pH변화

발정주기 (day)	개체번호									
	56	52	47	50	23	16	34	31	27	22
-2	7.8	7.8	7.8	7.4	7.8	7.6	7.8	7.8	7.8	7.8
0	7.8	7.6	7.6	7.6	7.8	7.6	7.8	7.8	7.8	7.8
2	7.8	7.6	7.6	7.6	7.2	7.2	7.8	7.8	7.6	7.4
4	7.8	7.8	7.8	7.6	7.8	7.2	7.8	7.8	7.8	7.8
6	7.2	7.2	7.8	7.8	7.2	7.8	7.8	7.8	7.8	7.2
8	7.8	7.4	7.6	7.6	7.8	7.6	7.6	7.6	7.8	7.8
10	7.8	7.8	7.2	7.8	7.8	7.6	7.4	7.8	7.2	7.2
12	7.2	7.8	7.8	7.8	7.8	7	7.8	7.8	7.8	7.2
14	7.8	7.6	7.4	7.8	7.6	7.8	7.6	7.6	7.8	7.6
16	7.6	7.8	7.8	7.8	7.8	7.6	7.8	7.8	7.4	7.4
18	7.6	7.4	7.4	7.4	7.6	7.4	7.4	7.6	7.2	7.2
20	7.8	7.4	7.6	7.4	7.4	7.8	7.8	7.6	7.8	7.8
22	7.8	7.2	7.6	7.4	7.4	7.6	7.4	7.4	7.6	7.4

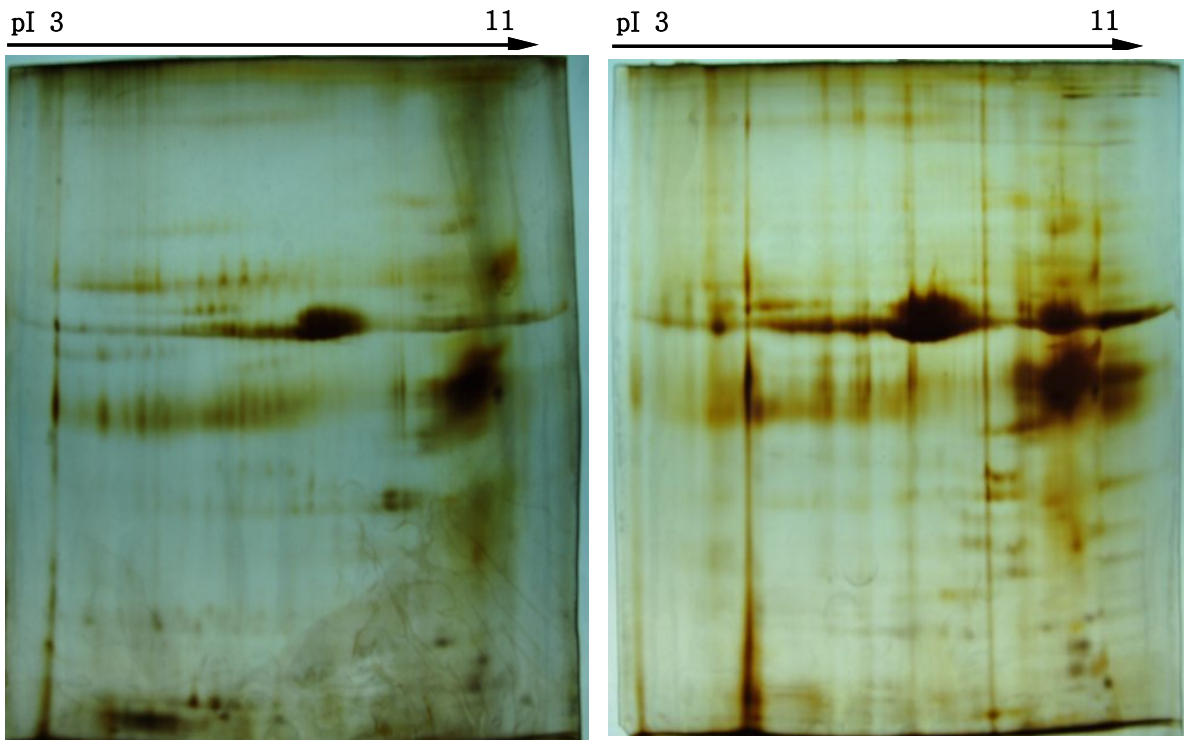


그림 46. 자궁경관점액의 Two-dimensional SDS-PAGE 분석 결과
(a) No.52 (10/23) ,(b) No.52 (10/25)

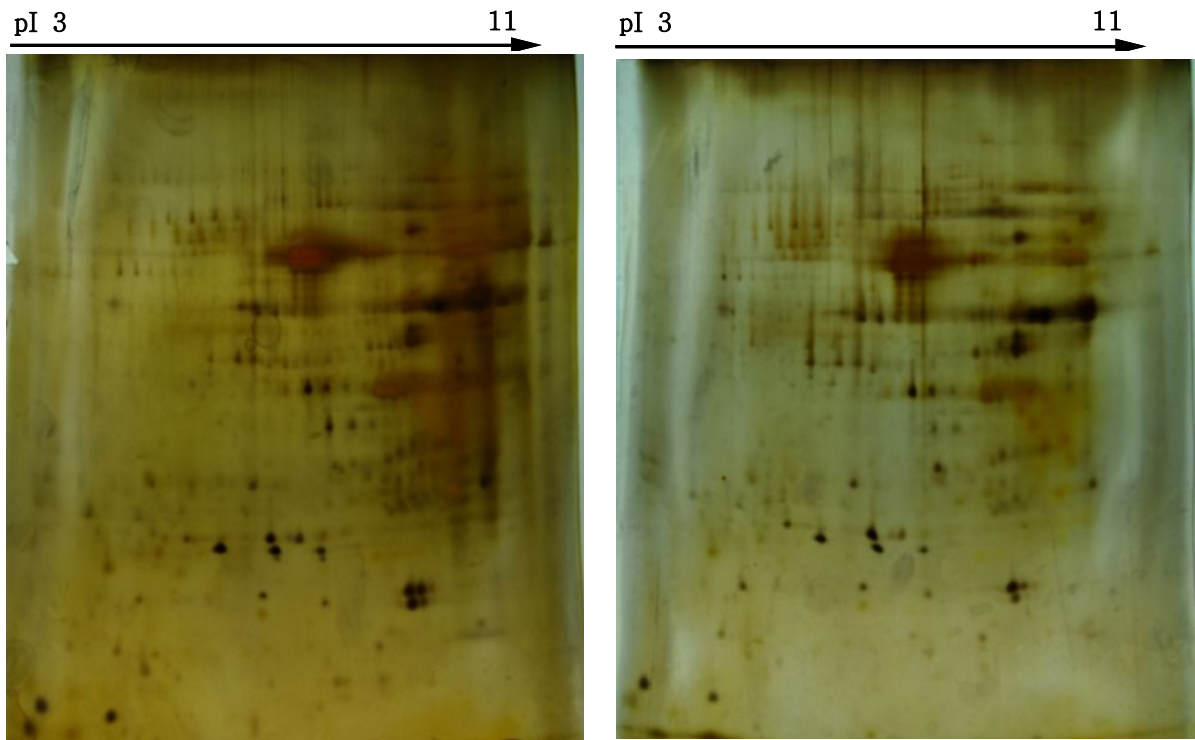


그림 47. 자궁경관점액의 Two-dimensional SDS-PAGE 분석 결과
(a) No.27 (10/23) ,(b) No.27 (10/25)

○ 수태율에 영향을 미치는 자궁 내 물질의 분석과 이를 통한 자궁환경 조절 기술 개발

1. 연구 개요

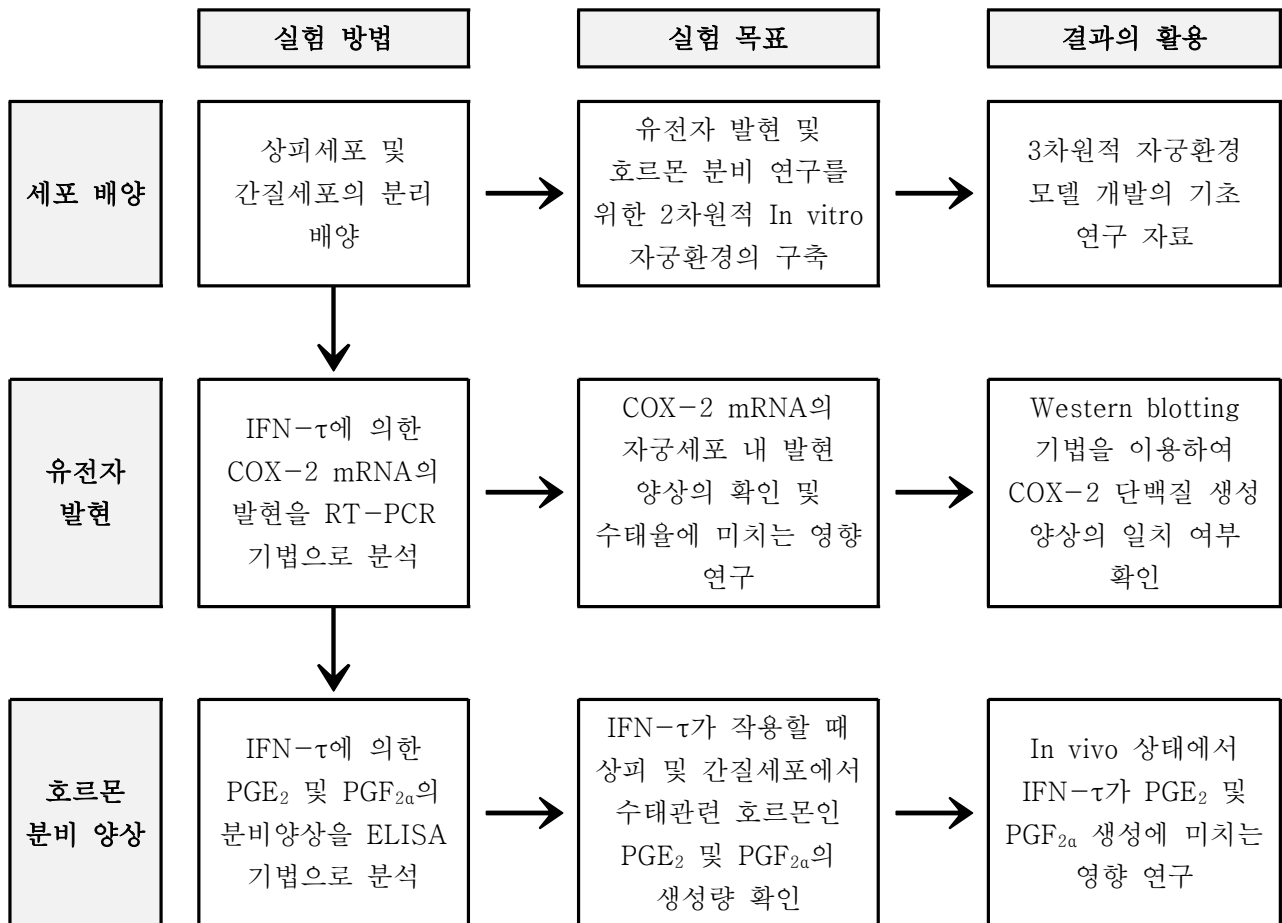


그림 48. 수태율에 영향을 미치는 자궁 내 물질의 분석과 이를 통한 자궁환경 조절 기술 개발에 관한 연구 개요

2. 재료 및 방법

1) 연구 표본

도축장에서 도살된 후 30분을 넘기지 않은 한우의 자궁을 얻어 차가운 얼음이 담긴 아이스 박스로 옮겨 담은 뒤 1-1.5시간 이내에 실험실로 운반하였다. 자궁의 발정주기는 선행 연구결과를 참조하여 (Ireland et al., 1979) 난소의 형태를 통해 판단하였고 5-10일차의 황체기만을 사용하였다 (표 52). 본 실험에 사용할 세포를 회수하기 위하여 황체기 난소와 동측성의 자궁각을 이용했으며 이를 통해 배양한 세포는 Passage가 0-3사이의 것만을 이용하였다. 총 3마리의 한우 자궁이 본 실험에 사용되었다.

표 52. 발정 주기의 단계 (Ireland et al., 1979)

Stages of estrous cycle	Appearance of corpus luteum (CL) ^a	Estimated range of days spanned by each stage of cycle ^b
I	Surface of CL red, follicle recently ruptured (.5–1.5 cm in diameter)	1–4
II	Point of rupture of follicle covered over, apex of bisected CL red or brown (1.6–2 cm) vasculature visible on surface of CL	5–10
III	Bisected CL is orange or yellow and has no red or brown color remaining, vasculature prominent on surface of CL (2 cm)	11–17
IV	Vasculature absent from surface, large follicle present	18–20

^a See Ireland et al. (1979) for further descriptions.

^b Length of each stage relative to estrous cycle was estimated by multiplying the percentage of heifers within each stage by 20 (average length of estrous cycle).

2) 연구 방법

A. 세포 배양 및 분리

소 자궁 상피세포(Epithelial cell) 및 간질세포(Stromal cell)를 회수하는 방법은 선행연구에 서술된 실험과정을 변형하여 수행하였다 (Murakami et al., 2003). 실험실로 가져온 자궁각을 70% 알콜에 적신 거즈로 표면을 닦아 소독한 뒤 지퍼백에 밀봉하여 클린벤치로 옮긴다.

자궁각의 난관쪽으로 polyvinyl catheter를 삽입하여 포셉으로 고정하고 catheter를 통해 100 IU/ml penicillin (Sigma; P3032), 100 µg/ml streptomycin (Sigma; S9137) 및 0.1% BSA (Qbiogene; BSASG100)가 첨가된 HBSS (Hanks' balanced salt solution, sterile Ca²⁺- and Mg²⁺-free)를 흘려 보내며 자궁강을 3회 세척한다. 세척이 완료되면 나머지 한 쪽도 단단히 묶은 뒤 20 mM EDTA·2Na (Sigma, St, Louis, MO, USA; E5134), 117 mM NaCl (Sigma; S5886), 2.7 mM KCl (Sigma; P5405), 6.8 mM Na₂HPO₄ (Sigma; S0876) 및 1.5 mM KH₂PO₄ (Sigma; P5379)로 조성된 0.76 % EDTA·4Na buffer로 자궁강을 가득 채운다. 그 다음 0.85% saline을 채운 비커에 saline이 자궁강 내로 새들어가지 않도록 고정시키고 37~38 °C의 항온수조에서 50분 동안 배양한다.

배양이 끝난 자궁각의 포셉을 풀어 0.76 % EDTA·4Na buffer를 50ml 튜브에 모은 다음 항생제와 0.1% BSA가 첨가된 HBSS로 자궁강을 3회 washing한다. 멸균된 가위를 이용하여 자궁 내막이 노출되도록 길게 잘라주고 의학용 칼날로 표면을 조심스럽게 긁어 상피세포를 HBSS가 담긴 50ml 튜브에 회수한다. 간질세포를 얻기 위해 자궁내막을 의학용 칼로 얇게 벗겨낸 뒤 근층 조직을 HBSS가 담긴 50ml 튜브에 수집하여 작은 조각(1mm³)이 될 때 까지 멸균된 가위로 여러 차례 가위질한다. 수집을 완료한 상피 및 간질세포가 포함된 튜브에 HBSS를 총 50ml가 되도록 맞춰준 뒤, Collagenase (Worthington, collagenase type IV)를 상피세포는 500ul, 간질세

포는 1000ul를 분주하여 37~38 °C의 항온수조에서 상피세포 10분, 간질세포는 30분간 배양한다.

배양을 완료한 상피 및 간질세포는 70um cell strainer (BD Falcon, Cat.No. 352350)로 필터하여 1500rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 흡인한 후 남아있는 세포펠렛에 HBSS 15ml를 넣어 다시 1500rpm에서 5분간 원심분리한다. 이러한 HBSS washing 과정을 약 2~3회 반복한 뒤 혈액을 제거하기 위하여 Tris-NH₄ buffer 25ml를 첨가하고 약 10분간 방치해줬다가 1500rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거한다. 혈액이 제거되었으면 DMEM+ 0.1% BSA용액 5ml를 첨가한 뒤 피펫팅하여 현탁액으로 만들고 1500rpm, 5분 원심분리한다. 모든 과정을 완료한 세포는 4well dish(Nunc, Cat.No. 176740)에 1.5×10^5 cells/well의 농도로 분주한 뒤 37°C, CO₂ 5% 조건의 인큐베이터에서 배양한다. 이후 cell confluency 80% (배양 6-7일 후)가 될 때까지 배양액을 2일에 한 번씩 교체해준다.

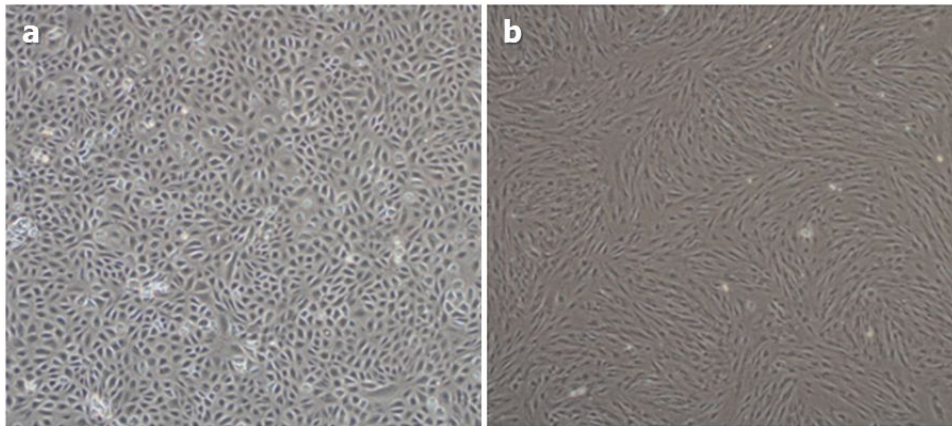


그림 49. 소 자궁내막세포의 형태 (a) 상피세포, (b) 간질세포

B. IFN- τ 의 처리

소의 상피세포 및 간질세포에서 IFN- τ 가 COX-2의 발현 및 PGF_{2 α} , PGE₂의 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 confluency가 80%이상인 세포를 Recombinant ovine interferon-tau (PROSPEC, Cat.No. CYT-377)에 24시간 동안 농도를 달리 하여(0.02, 0.2 및 2 ug/ml) 노출시켰다. IFN- τ 를 처리하지 않은 배양액을 음성대조군으로 사용하였고, 1.5 IU/ml의 hCG (CHORULON)가 함유된 배양액을 양성대조군으로 이용하였다 (Lin et al., 2005). 24시간 후 배양액은 회수하여 ELISA에 사용하기 위해 -20°C에 보관하였고 세포는 RT-PCR을 수행하기 위해 끊어모아 RNAiso Plus(Takara, Cat.No. 9109)에 균질화 하였다.

C. RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction)

① RNA extraction

Trizol(RNAiso Plus)과 Chloroform을 이용하여 RNA extraction을 실시하였다. Trizol에는 Phenol과 GITC(Guanidium thiocyanate)가 함유되어 있다. 세포를 이 용액에 넣으면 산성을 띄는 Phenol에 의해 단백질이 변성되고 지질이 녹으며 세포막이 파괴된다. 이 때 알칼리에서 안정하던 DNA가 산성을 띄는 Trizol 용액에 노출되면 탈푸린화(depuration)가 일어난 부분이 조각나기 때문에 산성에서 안정한 RNA만을 온전하게 추출할 수 있다. Trizol에 함유된 GITC는 RNA나 DNA를 추출할 때 세포나 바이러스 입자를 용해하는 역할을 한다. GITC의 가장 중요한 역할은 RNase와 DNase의 활성을 방해함으로써 추출하고자 하는 핵산의 변성을 막아주는 것이다. 만약 추출과정 중에 GITC가 작용하지 않으면 RNase와 DNase와 같은 효소에 의해 얻고자 하는 핵산이 손상될 수 있다. Chloroform은 비극성이기 때문에 Trizol의 Phenol 성분을 녹여 수층에 있는 RNA와 분리할 수 있다 (그림 50).

4well dish에서 세포를 긁어모아 LN₂ 증기에 노출시켜 세포막을 손상시킨 뒤 400ul RNAiso Plus (TAKARA, Cat.No. 9109)를 분주하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨다. Trizol과 Chloroform (J.T.Baker, Cat.No. 9257-68)의 비율이 4:1이 되도록(각 400ul, 100ul) 첨가하여 vortexing한 뒤 4°C에서 12000rpm으로 10분간 원심분리하여 RNA가 추출된 수층만을 회수한다. 회수한 RNA수층과 동량으로 Isopropyl alcohol (DAEJUNG, Cat.No. 5035-4405)을 첨가하여 RNA를 침전시키고 12000rpm으로 10분간 원심분리하여 RNA를 가라앉힌다. 상층액을 제거하고 70% Ethanol (DAEJUNG, Cat.No. 64-17-5) 1ml을 첨가하여 pipetting한 뒤 12000rpm으로 5분간 원심분리하여 RNA를 washing해준다. 원심분리가 끝나면 상층액을 거둬내고 알콜을 모두 증발시킨다. DEPC (BIONEER, Cat.No. C-9030)로 RNA를 희석한 뒤 Nano drop 2000c (Thermo scientific)으로 정량하여 Total RNA를 0.1~1ug으로 맞춰준다.

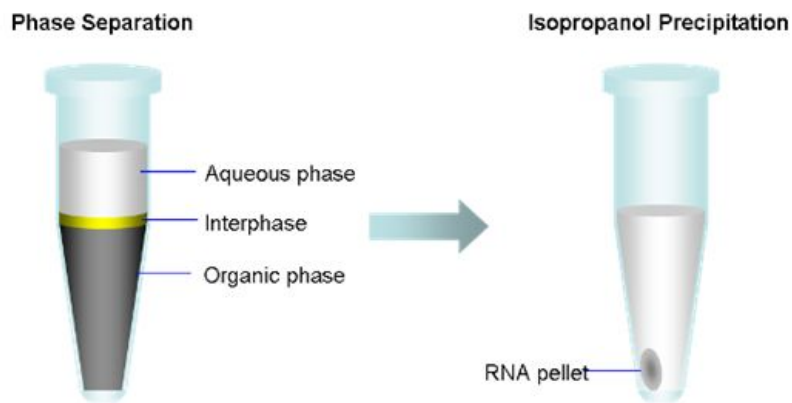


그림 50. Trizol과 Chloroform에 의한 층 형성 및 Isopropanol에 의한 RNA 침전

② RT (Reverse transcription)

정량을 마친 Total RNA 0.1-1ug을 넣고 DEPC를 이용해 Total reaction volume을 20ul로 맞춰 준 다음 RT PreMix Kit (iNtRON, Cat.No. 25081)에 넣어 MyGenie32 Thermal Block (BIONEER)에서 45°C로 60분간 cDNA를 합성하고 95°C에서 5분간 RTase를 불활성화 시켰다.

③ PCR (Polymerase chain reaction)

RT과정에서 역전사된 cDNA는 AccuPower[®] PCR PreMix (Bioneer, Cat.No. K-2016)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 세포 내 항존유전자(Housekeeping gene)인 β -actin을 내부표준물질로 삼아 반정량적으로 결과를 도출하였다. 실험에 사용된 유전자의 Primer 정보는 표 53과 같고 PCR 조건은 다음과 같다. COX-2는 94°C에서 7분간 DNA polymerase를 활성화시킨 뒤 denaturation 94°C에서 1분, annealing 54°C에서 1분 및 extension 72°C에서 2분간 44 cycle을 반복하였다. β -actin은 94°C에서 30초간 DNA polymerase를 활성화시킨 뒤 denaturation 94°C에서 30초, annealing 60°C에서 30초 및 extension 72°C에서 1분간 29cycle을 반복하였다. 두 유전자 모두 72°C에서 5분간 추가적으로 extension과정을 실시하였다 (표 54). 각각의 PCR 산물은 Ethidium bromide (BIONEER, Cat.No. C-9009)가 첨가된 2% Agarose gel (BIONEER, C-9100) 상에서 100bp DNA Ladder (Bioneer, Cat.No. 1030)와 함께 전기영동을 실시한 뒤 UV조명을 비춰 사진을 찍었다. 각 band의 강도는 Multi gauge V3.0 software를 통해 분석하였다.

표 53. PCR 과정에 사용된 Primer sequence 정보

Primer	sequence	Length (bp)	References
COX-2	F: 5'-TCCAGATCACATTTGATTGACA-3'	449	Okuda et al. (2004)
	R: 5'-TCTTTGACTGTGGGAGGATACA-3'		
β -actin	F: 5'-AACTCCATCATGAAGTGTGACG-3'	233	Kliem et al. (2009)
	R: 5'-GATCCACATCTGCTGGAAGG-3'		

표 54. COX-2와 β -actin의 PCR 실행 조건

Gene	PCR condition (Time/Temp.)				
	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Elongation
COX-2	94°C, 7min	94°C, 1min	54°C, 1min	72°C, 2min	72°C, 5min
	1 Cycle	44 Cycle			1 Cycle
β -actin	94°C, 30sec	94°C, 30sec	60°C, 30sec	72°C, 1min	72°C, 5min
	1 Cycle	29 Cycle			1 Cycle

D. ELISA

배양액에 존재하는 PGF_{2α}와 PGE₂의 농도는 enzyme immunoassay를 통해 분석하였으며 Enzo사의 PGF_{2α} EIA kit (Enzo, Cat.No. ADI-900-069)와 PGE₂ EIA kit (Enzo, Cat.No. ADI-900-001)를 이용하였다. 각각의 표준곡선(standard curve)의 범위는 PGF_{2α}가 0.003 ng/ml에서 50 ng/ml, PGE₂가 0.0391 ng/ml에서 2.5 ng/ml까지이며 각각의 ED50 (Effective dose 50) 수준은 PGF_{2α}가 0.23 ng/ml, PGE₂가 0.166 ng/ml 이다 (그림 55와 56).

사용할 Kit를 실험시작 30분 전에 실온으로 맞춘 후 사용할 well의 개수를 정하고 나머지 well은 다시 냉장보관 한다. NSB (Non specific binding)와 Bo well에 미리 제조한 standard diluent (Assay buffer)를 넣는다. 희석을 완료한 Standards는 반드시 60분 이내로 준비하여 흡광도를 측정하였다. 적당한 well에 표 54와 같이 희석한 standard를 1번부터 차례대로 100ul씩 분주한다. NSB well에는 Assay buffer를 50ul씩 분주한다. 그런 다음 TA (total activity)와 Blank well을 제외한 각각의 well에 blue conjugate 50ul를 분주한다. Yellow antibody는 TA, Blank 및 NSB well을 제외한 각각의 well에 50ul씩 분주한다. 이 단계까지 완료하면 NSB는 파랑, Blank와 TA는 색이 없고 나머지 well은 모두 녹색을 띈다. 분주가 끝난 plate는 sealer로 봉인한 뒤 실온에서 250rpm으로 2시간 동안 교반하였다. 교반이 끝난 plate는 흡입기를 이용하여 반응을 마친 시약을 제거하고 wash solution을 300ul 분주하여 세척하는 과정을 3회 반복하였다. Plate를 세척하기 위해 사용된 wash solution은 증류수를 이용해 20배 희석하여 사용하였고 wash solution 5ml + Deionized water 95ml) 제조한 wash solution은 실험을 실시하기 전 하루 동안 실온보관이 가능하고 제조 후 3개월 이내의 것만을 사용하였다. 종이타월 위에 plate를 가볍게 털어 물기를 제거한 뒤 TA well에만 5ul의 blue conjugate를 첨가한 뒤, 모든 well에 200ul의 pNpp substrate solution을 분주하여 실온에서 45분간 교반 없이 배양하였다. 45분 뒤 모든 well에 50ul의 stop solution을 넣은 뒤 곧바로 405nm파장을 이용해 흡광도를 측정하였다.

표 55. PGF_{2a}와 PGE₂의 standard제조를 위한 희석 배율 표

std.	PGF _{2a} Standard			PGE ₂ standard		
	Assay Buffer Vol. (ul)	Vol. Added (ul)	PGF _{2a} Conc. (pg/ml)	Assay Buffer Vol. (ul)	Vol. Added (ul)	PGE ₂ Conc. (pg/ml)
1	900	100, Stock	50000	950	50, Stock	2500
2	750	250, Std. 1	12500	500	500, Std. 1	1250
3	750	250, Std. 2	3125	500	500, Std. 2	625
4	750	250, Std. 3	781.25	500	500, Std. 3	313
5	750	250, Std. 4	195.31	500	500, Std. 4	156
6	750	250, Std. 5	48.83	500	500, Std. 5	78.1
7	750	250, Std. 6	12.2	500	500, Std. 6	39.1
8	750	250, Std. 7	3.05	—	—	—

표 56. PGF_{2a} 및 PGE₂의 분석 과정 흐름도

Assay protocol flow	Blank	TA	NSB	Bo	Stds.	Samples
Assay Buffer	---	---	150ul	100ul	---	---
Std. and/or Sample	---	---	---	---	100ul	100ul
Conjugate	---	---	50ul	50ul	50ul	50ul
Antibody	---	---	---	50ul	50ul	50ul
Incub. 2 hours RT, shaking	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒
Asp. & Wash 3 × 300ul	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒
Conjugate	---	5ul	---	---	---	---
Substrate	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul	200ul
Incub. 45min. RT	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒	⇒⇒⇒⇒
Stop solution	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul	50ul

*Term: TA (Total Activity), NSB (Non specific binding), Stds. (Standards), Incub. (Incubation), RT (Room temperature), Asp. (Aspiration)

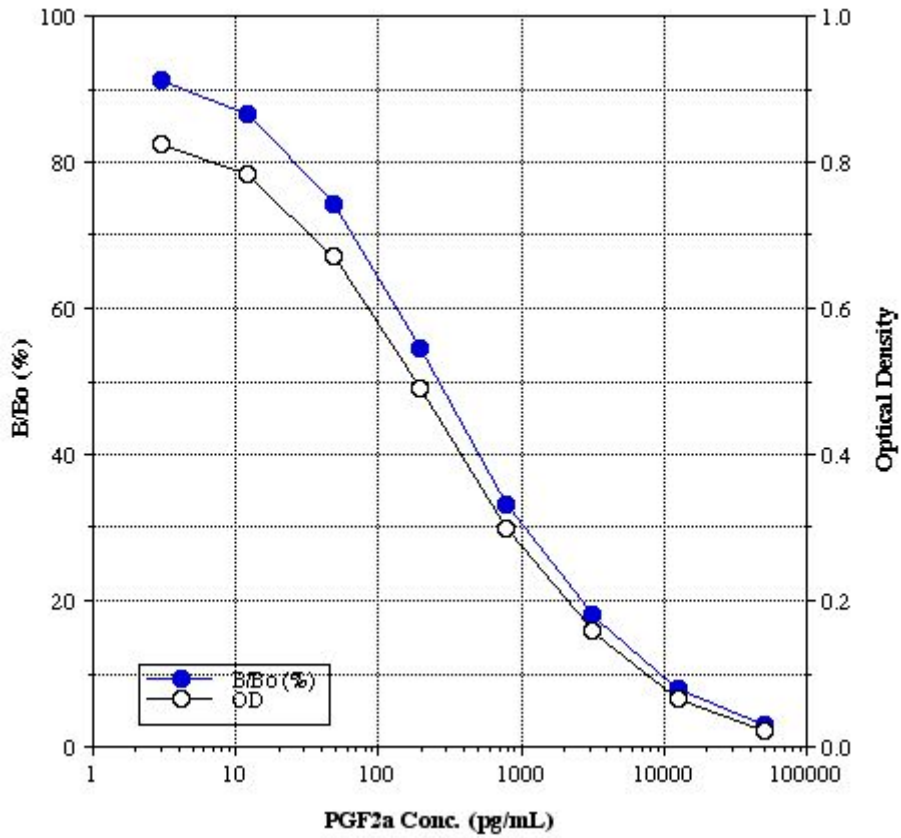


그림 51. PGF_{2α}의 표준곡선 (www.enzolifesciences.com)

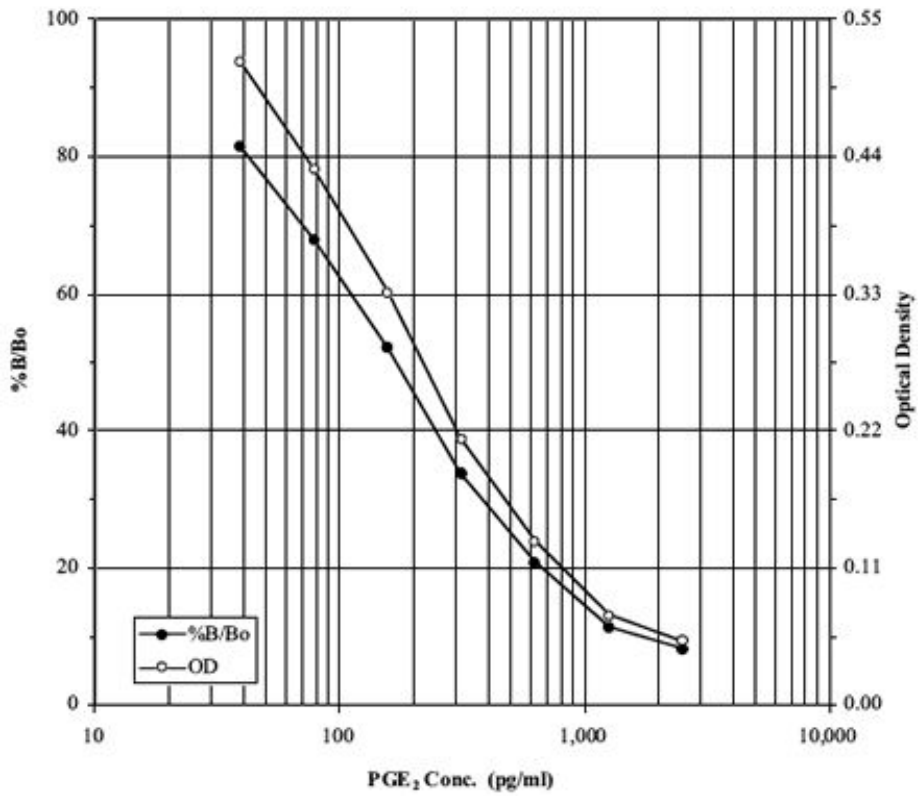


그림 52. PGE₂의 표준곡선 (www.enzolifesciences.com)

3. 연구 결과

1) IFN- τ 에 의한 COX-2 발현 양상

소의 자궁내막세포 (상피 및 간질세포)에 여러 가지 농도의 IFN- τ 를 처리했을 때 발현된 COX-2 유전자는 RT-PCR 기법을 이용하여 증폭시킨 다음 이를 전기영동하여 이미지를 분석하였다. 전기영동을 완료한 후 얻은 이미지상의 밴드를 함께 전기영동 했던 Marker와 비교한 결과 449bp에서 관찰되었다. 또한 β -actin은 내부표준물질로서 사용되었으며 모든 표본의 233bp에서 일정한 양의 밴드가 관찰되었다.

상피세포 내 COX-2의 발현은 대조군에서 0.65 ± 0.06 , IFN- τ 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.75 ± 0.04 , IFN- τ 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.79 ± 0.08 , IFN- τ 2 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.57 ± 0.11 , hCG에서 1.36 ± 0.17 로서 IFN- τ 를 처리한 모든 그룹에서 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$). 양성대조군으로 사용된 hCG의 COX-2 발현 또한 음성대조군(IFN- τ 0 $\mu\text{g/ml}$)과 비교했을 때 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$, 그림 53, A).

간질세포 내 COX-2의 발현은 대조군에서 1.30 ± 0.02 $\mu\text{g/ml}$, IFN- τ 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.28 ± 0.22 , IFN- τ 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.98 ± 0.12 , IFN- τ 2 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.81 ± 0.04 , hCG에서 0.99 ± 0.08 로서 IFN- τ 를 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리했을 때만 유의적으로 낮은 COX-2 발현을 보였다 ($p < 0.05$, 그림 53, B).

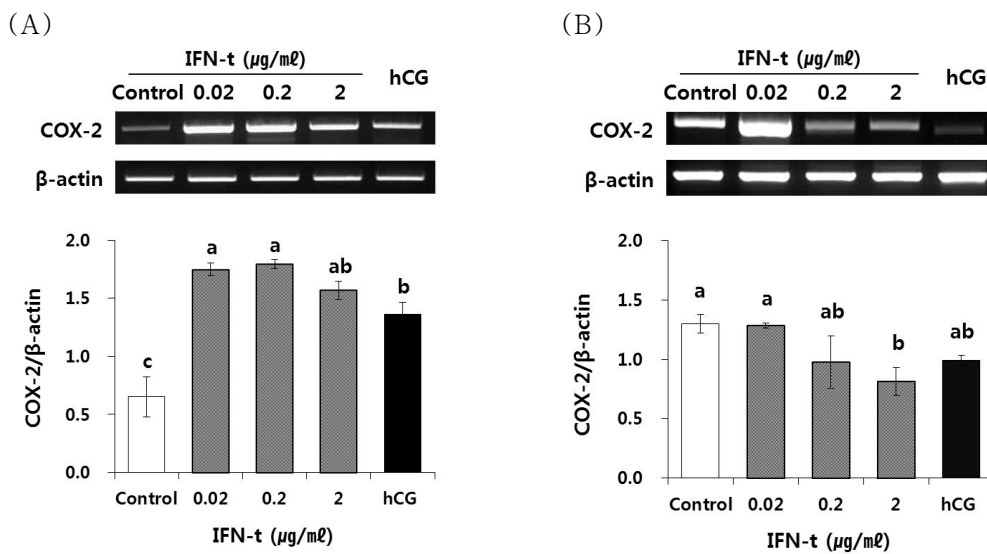


그림 53. 자궁내막세포에서 IFN- τ 의 농도 별 처리에 의한 COX-2의 mRNA 발현
(A) 상피세포, (B) 간질세포 (Mean \pm SEM, $p < 0.05$)

이러한 결과는 IFN- τ 가 자궁 상피세포 및 간질세포에서 작용하는 메커니즘이 다를 수 있음을 의미하며 특히 상피세포에서 IFN- τ 에 의한 COX-2의 발현양이 유의적으로 증가하는 양상을 보였다 ($p < 0.05$). 또한 상피세포에서 발현되는 COX-2의 양은 IFN- τ 의 농도에 따른 유의차가 없었다. 간질세포에서는 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 IFN- τ 를 처리했을 경우를 제외하고 대조군을

비롯한 모든 그룹에서 유의차가 없었다. COX-2 (Cyclooxygenase-2)는 Oxytocin에 의한 황체 퇴행 뿐만 아니라 모체의 임신인지에 필요한 IFN- τ 에 즉각적으로 반응하는 유전자로 밝혀진바 있다 (Krishnaswamy et al., 2009).

IFN- τ 는 자궁 내에서 부유하는 배아의 영양외배엽(Trophoblast)에서 분비되는 단백질이기 때문에 TP-1 (Trophoblastic protein-1)이라고도 불린다. 약 18000~20000 Da의 작은 단백질인 IFN- τ 는 배란 후 13에서 21 사이에 분비되며 소나 양에서 모체가 임신을 인식하기 위해 반드시 필요한 물질이다. 배아로부터 분비된 IFN- τ 는 자궁내막세포에 작용하여 Oxytocin receptor의 생산을 억제하여 PGF_{2a}의 생산이 촉진되는 것을 방해한다. 또한 수정란의 착상과 임신에 필요한 물질을 분비하는 자궁샘 (Uterine glands)의 침단부에 결합하여 착상 전 배아의 생존에 필수적인 단백질을 촉진한다. 따라서 상피세포에서의 COX-2발현이 유의적으로 높아진 것은 IFN- τ 가 자궁샘 침단부가 존재하는 상피세포에 결합하여 COX-2의 발현을 촉진하였기 때문이라 생각된다. 이는 배아의 생존에 필요한 여러 가지 단백질을 분비하는 신호가 되어 수정란 이식에 있어 착상환경을 개선할 수 있을 것이라 판단된다.

2) IFN- τ 에 의한 Prostaglandin의 분비

그림 51과 52는 24시간 동안 소의 자궁내막세포에 IFN- τ (0.02-2 ug/ml)를 처리했을 때 생산되는 Prostaglandin F_{2a}와 E₂의 분비량을 ELISA기법으로 분석한 뒤 흡광도를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

간질세포에서의 PGF_{2a}의 양은 대조군에서 25.27±5.15, IFN- τ 0.02 ug/ml에서 17.37±0.61, IFN- τ 0.2 ug/ml에서 15.69±2.28, IFN- τ 2 ug/ml에서 14.88±1.38, hCG에서 22.52±1.91로서 IFN- τ 를 0.2 ug/ml 이상 처리하였을 때 유의적으로 낮은 분비량을 보였다 ($p < 0.05$). 한편 상피세포에 IFN- τ 를 처리했을 때 분비된 PGE₂의 양은 대조군 7.14±0.01, IFN- τ 0.02 ug/ml에서 6.52±0.39, IFN- τ 0.2 ug/ml에서 7.24±0.51, IFN- τ 2 ug/ml에서 7.27±0.40, hCG에서 7.20±0.92로서 간질세포와는 달리 모든 처리군에서 유의적인 차이는 없었다.

흰색 막대그래프로 나타낸 상피세포에서의 PGF_{2a} 발현양은 간질세포에 비해 낮은 수준으로 변화 없이 유지되었다. 이는 IFN- τ 가 상피세포에서 PGF_{2a}의 분비를 촉진하는 역할을 하지 않거나 혹은 상피세포에서는 PGF_{2a}의 분비가 활성화되지 않기 때문일 것이다. 따라서 중심 착상(Central implantation)을 하는 소에서 착상을 준비하는 배아와 가장 근접한 부위인 자궁내막상피세포에서는 IFN- τ 의 존재 여부에 상관없이 PGF_{2a}의 분비가 일정함을 관찰할 수 있었다. 또한 대조구의 PGF_{2a}분비량이 IFN- τ 처리군과 유의차가 나지 않는 것은 황체기의 자궁내막세포를 실험에 이용하였기 때문이라 판단된다. 한편 간질세포에서는 0.2 ug/ml 이상의 IFN- τ 를 처리하였을 경우 PGF_{2a}의 양이 유의적으로 감소하였는데 이는 IFN- τ 가 황체퇴행을 유도하여 자궁환경을 변화시키는 PGF_{2a}의 영향을 감소시켜 배아가 착상하기 적합한 환경으로 유도한다고 유추할 수 있다.

(A)

(B)

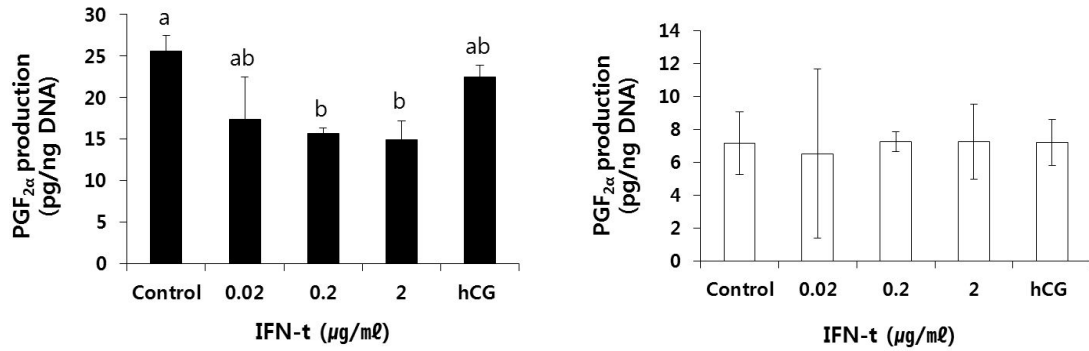


그림 54. 소 자궁내막세포에 IFN- τ 의 농도 별 처리에 따른 PGF_{2 α} 의 분비 양상
(A) 간질세포, (B) 상피세포 (Mean \pm SEM, $p < 0.05$)

IFN- τ 를 처리한 간질세포의 PGE₂ 분비량은 대조군에서 636.73 \pm 167.99, IFN- τ 0.02 ug/ml에서 144.63 \pm 12.68, IFN- τ 0.2 ug/ml에서 84.11 \pm 5.74, IFN- τ 2 ug/ml에서 83.79 \pm 1.83, hCG에서 275.78 \pm 22.43으로서 아무것도 첨가하지 않은 음성대조군을 제외한 모든 처리군에서 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 상피세포에서 IFN- τ 에 의한 PGE₂ 분비량은 대조군에서 1.66 \pm 0.003, IFN- τ 0.02 ug/ml에서 1.06 \pm 0.13, IFN- τ 0.2 ug/ml에서 4.56 \pm 1.55, IFN- τ 2 ug/ml에서 2.21 \pm 0.17, hCG에서 0.83 \pm 0.07로서 0.2 ug/ml의 IFN- τ 를 처리한 그룹을 제외한 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다.

상피세포에서의 PGE₂ 분비량은 PGF_{2 α} 와 비슷한 경향을 보였다. 0.2 ug/ml의 IFN-t를 처리한 그룹에서 유의적으로 높은 PGE₂ 분비량을 보였으나($p < 0.05$) 수치상으로는 큰 차이를 보이지 않았으며 이를 제외한 나머지 그룹에서 대조군과의 유의차 없이 매우 낮은 수준으로 유지되고 있었다. 본 연구결과로 미루어볼 때 상피세포는 모체가 임신인식을 위한 물질(IFN- τ)을 받아들일 때 이로 인한 PGF_{2 α} 와 PGE₂의 분비에 있어서 큰 영향을 받지 않는 것으로 판단된다.

PGE₂는 난소, 자궁 및 배막 (Embryonic membrane)에서 분비되는 착상과 밀접한 관계가 있는 호르몬이다. 사람에서는 모체의 임신인지 물질은 hCG이며 간질세포를 탈락막세포(Decidua)로 분화시키는 역할을 하는데 COX-2를 상향조절 함으로써 분화를 일으켰고 이는 PGE₂의 증가양상과도 관련이 있었다 (Tang and Gurpide, 1993; Han et al., 1996). 쥐에서는 COX-2유전자가 수태 초반에 착상된 배아에 의해 조절된다는 연구결과가 발표되었다 (Chakraborty et al., 1996). IFN- τ (반추동물), Placental lactogens (설치류), estrogen과 prolactin (돼지) 및 hCG (영장류)와 같은 펩타이드들은 모두 착상 전의 자궁에서 PG 조절에 있어 같은 효과를 나타낸다. 착상 전에 PG의 역할은 동물 종에 따라 역할이 다르지만 COX-2 유전자 발현을 통한 PGE₂의 조절작용은 대부분의 포유류에서 공통적인 메커니즘을 갖는다.

본 연구에서 나타난 간질세포에서 생산되는 PGE₂의 양은 IFN- τ 를 첨가했을 때 유의적으로 감소하는 경향을 보였다 ($p < 0.05$). 이는 앞서 설명한 선행 연구결과와는 상반되는 경향이다. 이러한 연구결과가 나온 이유는 간질세포에서 IFN- τ 에 의한 COX-2 발현양과 연관이 있다고 생각한다. 비록 유의차는 없었지만 수치상으로 IFN- τ 의 농도가 높아질수록 COX-2의 발현양

이 줄어드는 경향을 보였고 그렇기 때문에 PGE₂의 분비량 또한 줄어드는 것으로 보인다. 또한 COX-2 유전자의 Inhibitor가 작용했을 가능성도 있다. 하지만 PGE₂의 감소양상은 COX-2에 비해 매우 큰 차이를 보이기 때문에 추후 COX-2의 단백질 발현과 PGE₂의 분비양상을 추가적으로 분석할 필요가 있다고 판단된다.

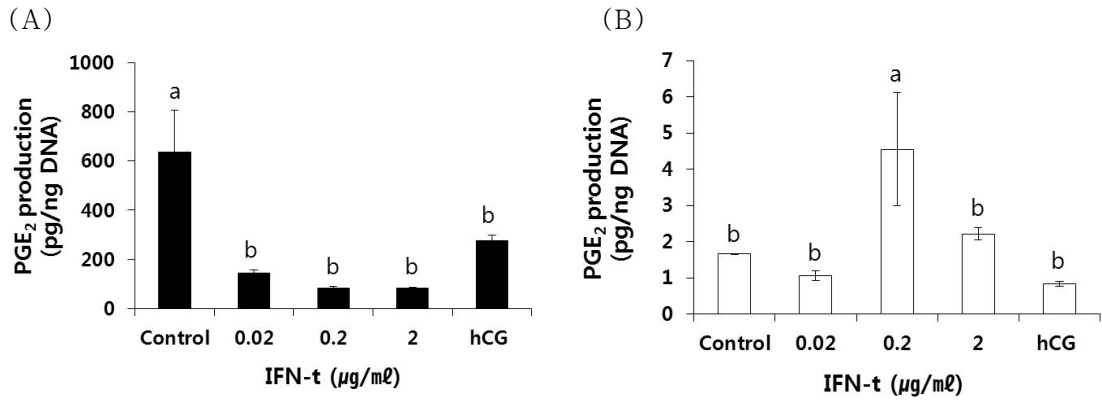


그림 55. 소 자궁내막세포에 IFN- τ 의 농도 별 처리에 따른 PGE₂의 분비 양상 (A) 간질세포, (B) 상피세포 (Mean \pm SEM, $p < 0.05$)

○ 화학적 분석방법을 통한 정장물질의 구성 성분 및 기능 분석

사정에 의하여 체외로 배출된 정액에서 정자를 제외한 액상부분을 정장(seminal plasma)이라 한다. 포유동물의 정장에는 각각이 특수한 기능을 가진 다양한 화학물질이 함유되어 있다. 정장물질은 정자가 웅성생식도관을 통과하여 체외로 배출되는 사정과정과 자성생식기관으로 주입되는 과정에서 액상운반매체로 작용한다. 정장에는 정자의 에너지대사에 이용되는 다양한 대사기질이 함유되어 있어서 결과적으로 정자의 운동성을 향진시킨다. 또한, 수정능과피인자와 단백질분해효소억제제, IgA와 아연등 정자를 보호하고 정액내 세균이 증식되는 것을 억제하는 등의 인자들을 포함하고 있다. 이에 한우 정장액 내 단백질을 2차원 전기영동법을 이용하여 단백질을 분석하여 정장액내 단백질중 수태율과 관련성이 있는 단백질을 찾는 데 목적이 있다.

1. 재료 및 방법

1) 샘플 수집

정액은 5마리의 한우에서 인공질법을 이용하여 수집하였다. 정장액의 분리를 위해 1ml의 정액을 4°C, 10,000 × g에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리된 정액중 상층액을 채취하여 -80°C에서 동결건조 시켰다. 정장액내 단백질을 추출하기 위하여 동결건조된 정장액 파우더를 M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo, USA)를 이용하여 녹였다. 단백질을 정제하기 위하여 clean-up kit (GE Healthcare, USA)를 하였고 Bradford method를 이용하여 총 단백질양이 300µg가 되도록 정량하였다.

2) 2차원 전기영동

정제된 단백질은 Rehydration buffer에 용해하여 18cm, pH 3~11 NL IPG gel strip 을 이용하여 20°C에서 16시간 동안 흡수시켰다. Isoelectric Focusing (IEF) 는 Protein IEF cell (Bio-rad)을 이용하여 250V에서 2시간, 8,000V에서 3시간, 그리고 마지막으로 80,000V가 될 때까지 시행하였다. IEF가 끝난 IPG strip을 equalibration buffer 5ml에서 1,4-dithiothreitol (DTT) 0.08g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 반응시킨 뒤, equalibration buffer 5ml에 Iodoacetamide (IAA) 0.1g을 섞은 용액에 침지하여 실온에서 15분간 반응시켜 평형시켰다. SDS-PAGE는 12% acrylamide gel에 IPG strip을 sample로 이용하여 25mA에서 전기영동을 실시하였다. 그림 56은 2차원 전기영동법에 대한 모식도로서 먼저 등전점 전기영동(IEF)를 통해 단백질을 등전점에 위치하게 하고 SDS-electrophoresis를 실시하여 크기별로 분리하는 방법이다.

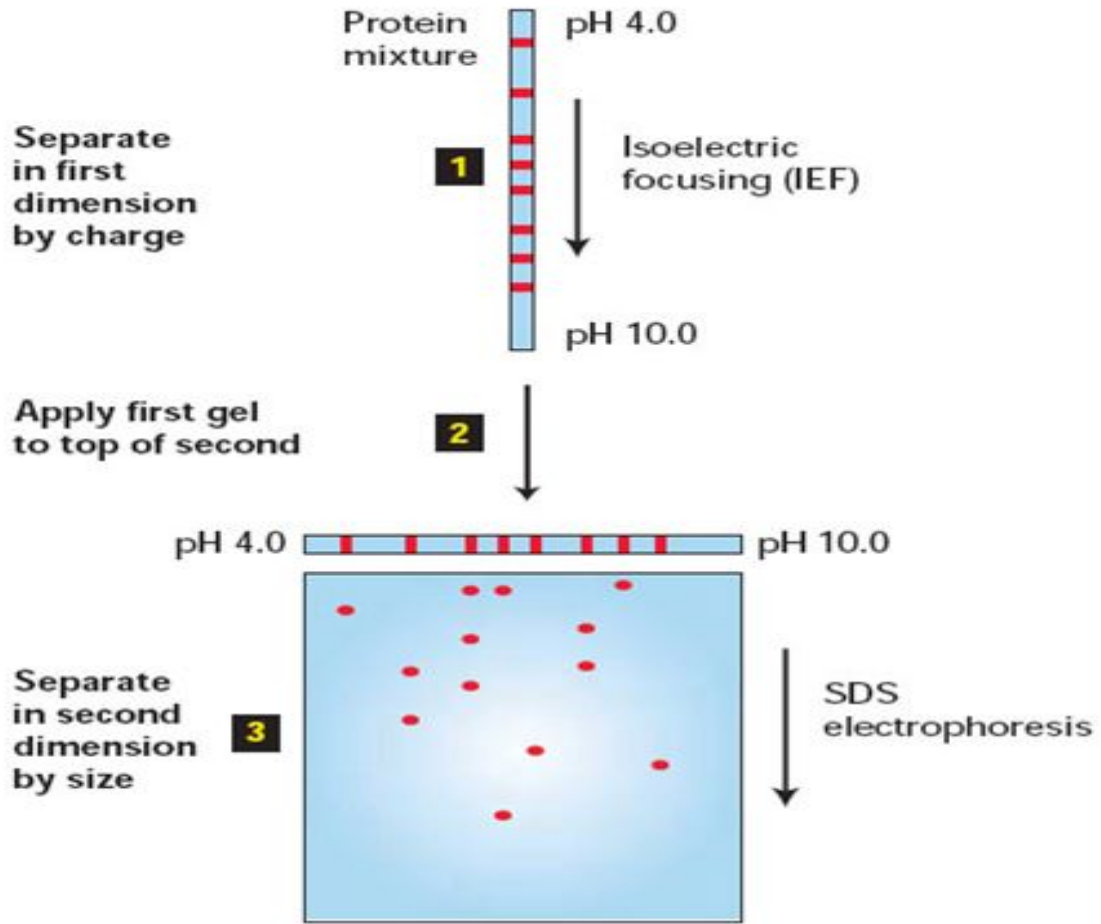


그림 56. 2차원 겔 전기영동의 과정

3) 단백질 동정

전기영동이 끝난 gel은 Comassie Brilliant Blue (CBB) 와 Silver Staining Kit를 사용하여 염색을 실시하였다. 염색한 gel은 Image Scanner (Amersham Biosciences)과 Phoretix Expression software v.2005 (Nonlinear Dynamics, UK)을 이용하여 이미지 분석을 실시하였다. gel의 단백질 spots을 떼어내어 트립신을 제거해주었다. Xcise (Shimadzu biotech Co, Japan)은 탈염 및 도금등 gel의 제거를 위해 사용되었다. 탈염을 위해서 ZipTip C18 (Millipore, USA)을 사용했고 도금을 위해 4-hydroxy- α -cyano-cinnamic acid (HCCA)에 용해하여 MALDI-TOF MS에 이용하였다. MALDI-TOF MS를 통해 얻어진 스펙트럼을 이용하여 MASCOT program으로 NCBI에서 database검색을 실시하였다.

2. 연구 결과

이 연구는 2차원 전기영동법을 사용하여 한우정액의 정상물질내 단백질을 분석하기위하여 실행하였다. 정상액 내 단백질을 2차원 전기영동에 의해 분리 한 결과는 그림 57과 같이 CBB와 silver stain된 gel로 나타났다. 이미지 분석한 결과 CBB염색을 한 gel의 경우 32개의 단백질

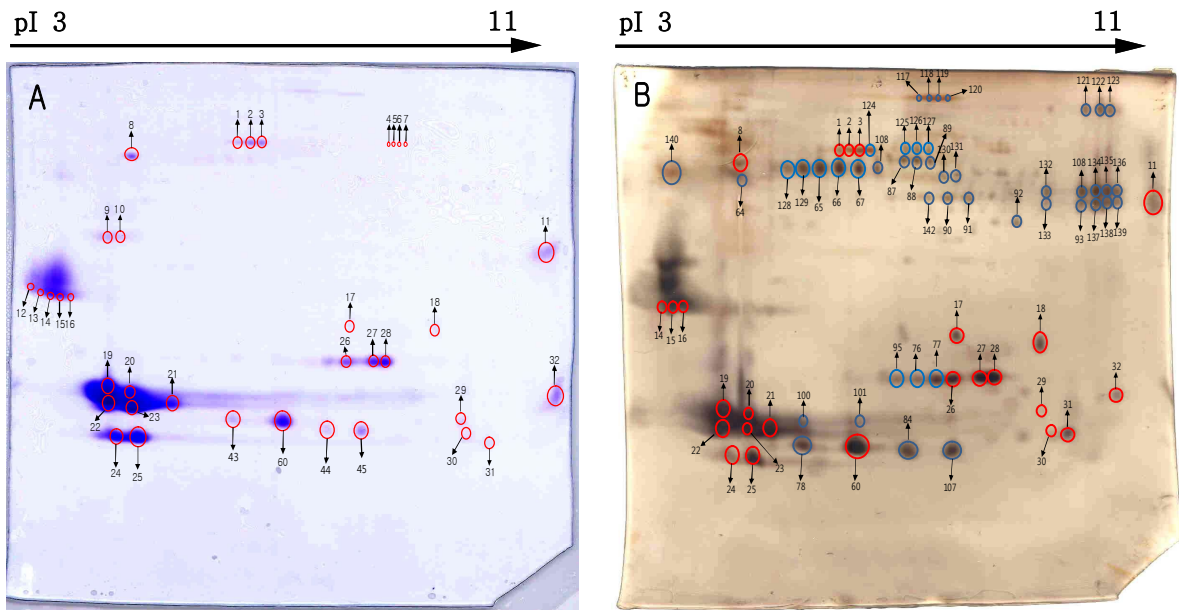


그림 57. 한우 정장액 단백질의 2차원 전기영동한 겔 이미지. 12% SDS-PAGE 겔은 (A) CBB stain 또는 (B) silver stain 기법으로 염색하였다. A: 붉은 원은 CBB로 염색된 spot들을 의미함; B: 푸른 원은 오직 silver stain 기법으로 염색된 spot들을 의미하며, 붉은 원은 CBB와 silver stain 모두 염색된 spot을 의미한다. 2차원 전기영동 겔에 분주된 단백질의 양은 총 300 μ g 이다. 1차원 전기영동은 18 cm, pH 3~11 NL strip을 이용하였고 2차원 전기영동에는 12% acrylamide gel이 사용되었다.

spot을 확인하였고, silver 염색을 통해 71개의 단백질 spot을 확인 하였다.

그 중 CBB 염색에 의해 확인된 32개의 단백질 spot을 MALDI-TOF로 아미노산 서열 분석을 실시한 결과 표57 과 같은 결과가 나왔으며, 32개의 spot중 동일 단백질도 확인 되어 총 20개의 단백질들이 확인되었으며, 그들 중 8개는 이미 타 연구를 통해 알려진 단백질로 정자의 수정능력 획득과 침체반응에 연관성을 가지는 단백질과 항산화 기능을 가진 단백질로 알려져 있다. 나머지 12개의 spot는 타 연구를 통해 소 정장액에서 발견된바 없었던 단백질로 생식기상에서의 기능이 알려지지 않은 단백질로 판명 되었다.

단백질 spot 1,3은 Serum albumin으로 나타났으며 이것은 정자에서 수정능획득에 영향을 미칠수 있으며 원형질막의 콜레스테롤을 조절하는 것으로 알려졌다. 단백질 spot 12~16과 19~21, 23, 31은 BSP proteins (BSP 30kDa and A1/A2) 복합체들로 나타났다. BSP 30kDa는 정자 막으로부터 콜레스테롤의 유출을 유발하는 것으로 알려져 있고 정액의 수정능획득에도 연관되어있다고 연구되었다. BSP A1/A2는 이전에 PDC 109라고 알려져 있는 소 정장액내 주요 heparin결합 단백질이라고 한다. 이것은 사정시 정자의 choline-phospholipids로 바인딩되고 콜레스테롤 및 인지질의 유출에 의해 수정능획득을 유도한다. 단백질 spot 24, 25는 acidic seminal fluid protein (aSFP)로서 산화스트레스를 억제한다고 보고되어져있다. 또한 단백질 spot 43~45, 60역

시 spermadhesin family로 나타났다. 사출된 정자에서 발생하는 aSFP의 결합은 수정능 획득 후 손실되고, 돼지 spermadhesins와 달리 소 aSFP는 정자와 난자의 상호작용에 관여하지 않았다. 단백질 spot 9, 10은 Clusterin으로 소 부정소미에서 보고되었다. Clusterin은 정장액의 구성으로서 다기능적이고 정자의 산화손상으로부터 예방을 하며, 소와 사람에서 비정상적 정자에 바인딩되어 단백질 침전의 독성효과로부터 정자를 보호한다고 보고되었다. clusterin은 보완 유발된 정자 용해를 억제하는 기능을 가지고 있다. 단백질 spot 27, 28은 TIMP-2로 소와 인간의 정자 세포막에 연관되어 있고, 햄스터에서 수정 융합을 촉진하는 침체반응 하는 동안에 정자에서 metalloproteinases (MMPs)의 억제제를 감소시키는 역할을 하고 쥐에서는 수정융합을 방해한다고 보고되었다. 단백질 spot 8은 nucleobindind으로 뼈세포, 치아 모세포등에 의해 각기 세포외 매트릭스의 구조적인 요소로 분비되는 것이 발견되었다. 그러나 정자 생리적 기능에 대해서는 아직 알려지지 않았다. 단백질 spot 2, 4~7, 11, 17, 18, 22, 26, 29, 30 그리고 32는 아직 이전에 수행된 정장액 실험에서 밝혀지지 않은 것들 이었다. 이들은 정장액에 발현된 새로운 단백질이다. 단백질 spot 2는 소 미토콘드리아 격리된 ATP 합성효소에 해당하는 화학적이고 구조적으로 최고의 특성화 ATP 합성효소이다. 소의 심장이 이 효소에 의해 심장근육에 높은 농도로 나타난다. 단백질 spot 5는 Transmembranes protein 214에 해당하고, 이러한 단백질은 박테리아세포 또는 진핵생물의 원형질막의 내부 세포막에 존재하며 때로는 외부 세포막에 존재한다. 단백질 spot 6, 17은 E3ubiquitin-protein ligase BRE1A로 이들이 histone H2B와 H#의 메틸화의 유틸퀴틴화에 필요한 유비퀴틴 연결효소이다. 단백질 spot 32은 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1로 단백질 분해효소 억제제이다. 이밖에 기능이 알려지지 않은 소 정장액내 단백질은 spot 2, 7, 11, 18, 22, 26, 29 그리고 30번이 있다.

본 연구를 통해 알려진 단백질의 기능들은 대부분 정자의 수정능 획득과 침체 반응 그리고 정자의 운동성 향상에 연관성을 가지고 있었음, 몇몇 단백질은 에너지대사(ATP대사), 항산화와 단백질 분해효소 억제제 등이 포함되어 있었다.

표 57. 한우 정장액으로 부터 분석된 단백질의 정보

Spots No.	Protein Name	Accession No.	Coverage (%)	MW (Da)	pI
1, 3	Serum albumin	P02769	10.4	69294	5.8
2	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P00829	11.2	54806	6.2
4	Protein MAK16 homolog	Q1RML7	17.1	35289	5.3
5	Transmembrane protein 214	A4FV45	11.5	77017	9.4
6, 17	E3ubiquitin-protein ligase BRE1A	A2VDP1	4.9	113659	5.7
7	Dual serine/threonine and tyrosine protein kinase	Q4TVR5	4.7	104805	6.4
8	Nucleobindin-1	Q0P569	28.3	54983	5.1
9, 10	Clusterin	P17697	15.7	51114	5.7
11	Tissue factor pathway inhibitor 2	Q7YRQ8	36.8	26675	9.1
12, 13, 14, 15, 16	Seminal plasma protein BSP-30 KDa	P81019	41.5	21269	5.7
18	Alpha-actinin-4	A5D7D1	6.7	104929	5.3
19, 20, 21, 23, 31	Seminal plasma protein PDC-109	P02784	32.8	15481	4.9
22	RUN domain-containing protein 3B	Q08E29	16.1	47034	5.3
24, 25	Spermadhesin-1	P29392 (2.72e+9)	73.9	15036	5.1
26	Catenin alpha-1	Q3MHM6	8.5	100134	5.9
27, 28	Metalloproteinase inhibitor 2	P16368	30.9	24355	7.4
29	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase2	P51176	10.6	77113	5.1
30	Plakophilin-1	Q28161	5.5	80181	9.2
32	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	Q0VCM5	4.1	101238	7.0
43, 44, 45, 60	SpermadhesinZ13	P82292	46.6	13383	5.6

○ 실질적인 정장물질의 주입을 통한 방법이 수태율에 미치는 영향 조사

1. 연구 개요

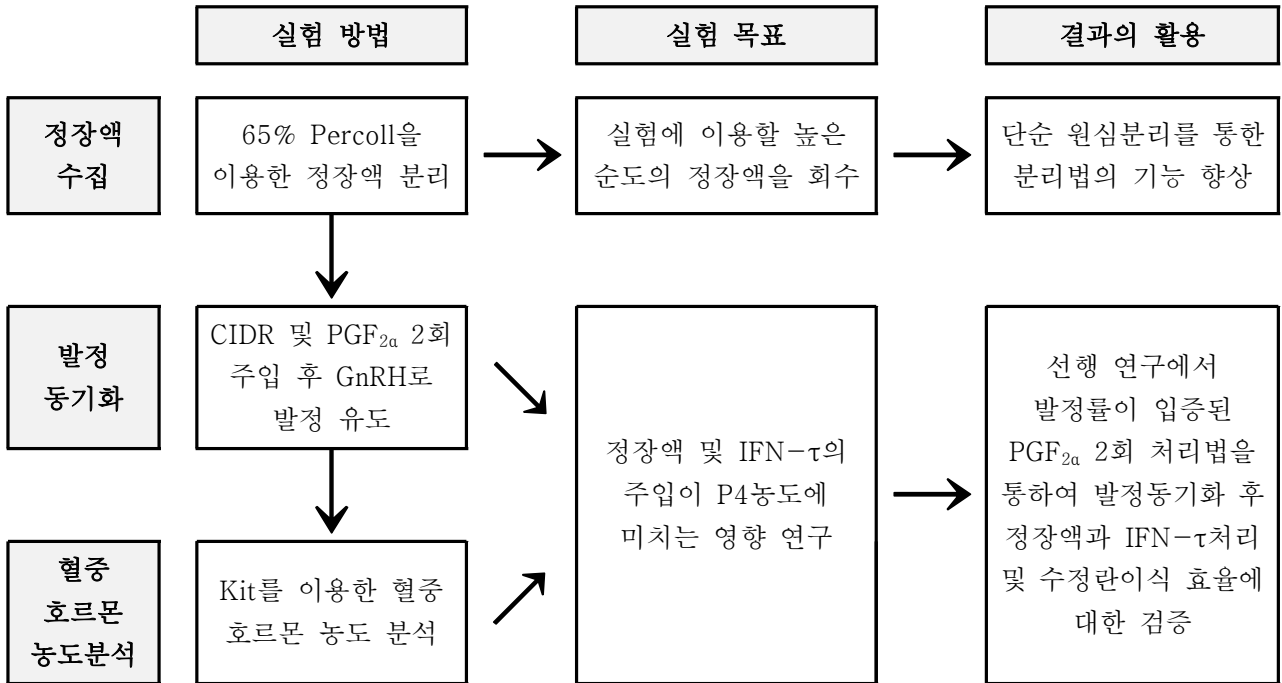


그림 58. 실질적인 정장물질의 주입을 통한 방법이 수태율에 미치는 영향에 대한 연구 개요

2. 재료 및 방법

1) 정장물질의 주입에 의한 수태율 향상 분석

정장물질 내에는 정자의 수정 능력을 향상시켜주는 물질과 자성생식도관을 자극하여 정자 수송을 돕는 물질 그리고 아직까지 밝혀지지 않았지만 자궁벽을 자극하여 수정 및 수태과정에서 결정적인 역할을 하는 자극 및 전달인자를 가지고 있을 것으로 생각된다. 이에 정장물질이 수태율에 미치는 영향을 알아보고 그 성분을 분석하여 어떤 물질이 수태율에 영향을 미치는지를 연구하고자 하였다.

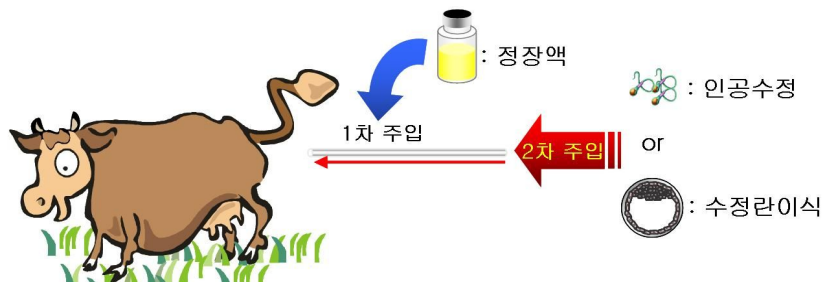


그림 59. 정장액을 이용한 인공수정 및 수정란 이식과정

① 정장액의 준비

황성축협외의 보증종모우로부터 채취한 정액으로부터 정장액을 분리하여 실험에 사용하였다. 인공질법을 통해 회수한 원정액을 실험실로 운반한 뒤 65% Percoll 위에 분주한 뒤 3000rpm에서 10분간 4°C로 유지하며 원심분리 하였다. 원심분리 후 튜브의 바닥부터 정자, Percoll, 정장액 순으로 정렬되는데 맨 위의 정장액층만을 회수하여 다시 4°C, 12000rpm 조건으로 15분간 원심분리하여 이물질들을 가라앉혔다. 튜브 바닥에 가라앉은 이물질을 제외한 정장액을 조심스럽게 회수하여 실험 전까지 -80°C에서 보관하였다.

② 정장액이 혈중 호르몬 변화에 미치는 영향

질 내 CIDER 삽입과 GnRH (100ug, 1cc) 주사를 1일 (실험 개시일)로 하여, 7일 후 CIDER 제거와 함께 PGF_{2α} (25mg, 5cc)를 주사함으로써 황체퇴행과 발정을 유도한다. 그로부터 2일 후 (PGF_{2α} 주사 48시간 후)인 9일에 GnRH (100ug, 1cc)를 주사 하고 10일 (GnRH주사 24시간 후)에 정장액(10배 희석 정장액 5ml)을 자궁경관에 주입하였을 때를 기점으로 2일 간격으로 (10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 및 30일) 오전에 혈액을 채취하여 혈액 내 호르몬의 변화 (progesterone)를 분석하였다 (그림 60).

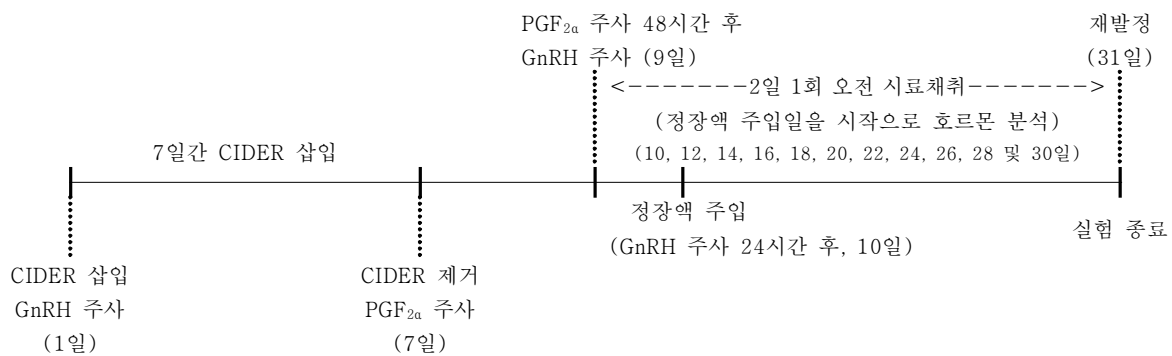


그림 60. 정장액의 처리 후 혈중 호르몬 분석을 위한 실험일정표

③ 정장액 및 IFN-τ가 혈중 호르몬 변화에 미치는 영향

질 내 CIDER 삽입과 GnRH (100ug, 1cc) 주사를 1일 (실험 개시일)로 하여, 7일 후 CIDER 제거와 함께 PGF_{2α} (25mg, 5cc)를 주사함으로써 황체퇴행과 발정을 유도한다. 그로부터 2일 후 (PGF_{2α} 주사 48시간 후)인 9일에 GnRH (100ug, 1cc)를 주사 하고 10일 (GnRH주사 24시간 후)에 정장액 (10배 희석 정장액 5ml)를 자궁 경관에 주입 후 17일 경 (정장액 주입 7일 후) 자궁 내에 INF-τ 주입 (1ug, 1cc)을 실시한다. 혈액 채취는 정장액을 자궁경관에 주입하였을 때를 기점으로 2일 간격으로 (10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 및 30일) 오전에 혈액을 채취하

여 혈청 분리 후 혈액 내 호르몬의 변화 (progesterone)를 분석하였다 (그림 61).

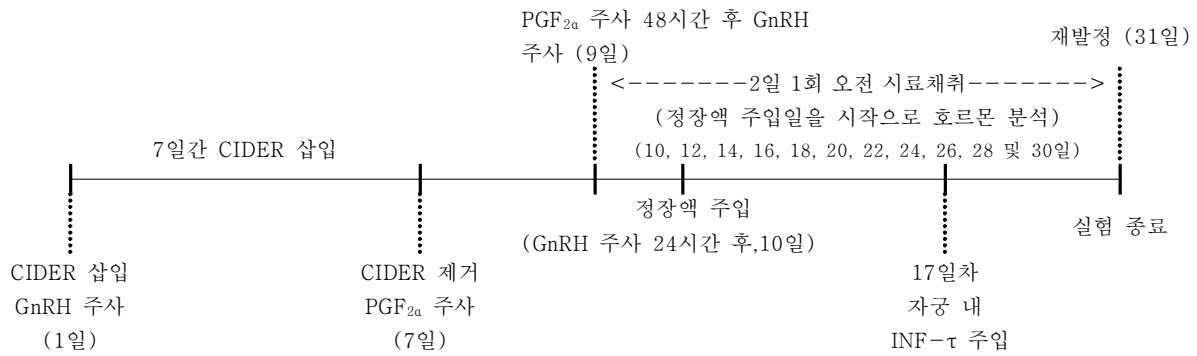


그림 61. 정장액 및 IFN- τ 주입 후 혈중 호르몬 분석을 위한 실험일정표

2) 정장물질 중 수정란 착상과 정자 수송에 영향을 미치는 물질 연구 규명

정장물질을 처리했을 때 자궁세포에서 수태 관련 호르몬의 변화를 알아봄으로써 정장물질 중 수태율에 영향을 주는 물질을 알아내고 그 물질의 추출이나 대체 물질들을 연구함으로써 수태율 향상인자를 만들어 인공수정 및 수정란이식 성공률을 향상시키고자 실시하였다.

소의 상피세포 및 간질세포에서 정장액이 COX-2의 발현 및 PGF_{2α}, PGE₂의 분비와 같은 수태 관련 인자의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 confluency가 80%이상인 세포를 24시간 동안 서로 다른 농도(0, 50, 125 및 250 ul/ml)의 정장액을 첨가한 배양액에 노출시켰다. 24시간 후 배양액은 회수하여 ELISA에 사용하기 위해 -20°C에 보관하였고 세포는 RT-PCR을 수행하기 위해 큐어모아 RNAiso Plus에 균질화 하였다.

3. 연구 결과

1) 정장물질의 주입에 의한 수태율 향상 분석

① Progesterone의 혈중 농도 변화

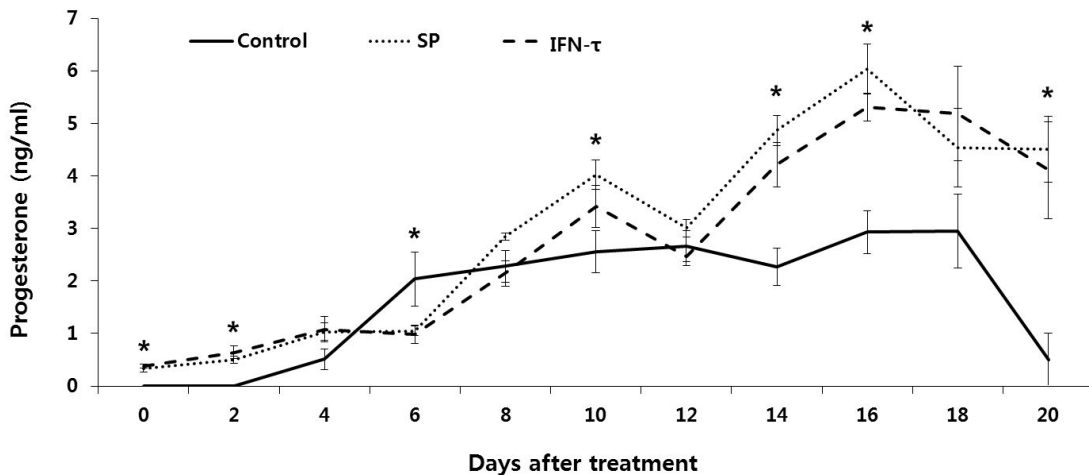


그림 62. 정장액(Seminal plasma, SP) 및 IFN- τ 에 의한 한우의 혈중 Progesterone 변화 ($p < 0.05$, *표시는 SP와 IFN- τ 를 처리한 그룹 모두가 Control과 유의차가 있음을 의미)

그림 62는 발정주기가 일정한 한우 암소 5두에 정장액(Seminal plasma, SP) 및 IFN- τ 를 주입한 뒤 혈중 호르몬농도를 측정하여 분석한 것이다. 발정동기화를 마친 암소에 정장액을 주입한 시점을 그래프에 0일로 나타내었으며 IFN- τ 처리군은 0일차에 정장액을 주입한 뒤 7일째가 되는 날 IFN- τ 를 주입하였다. 두 처리군 모두 Progesterone의 혈중 농도가 대조군에 비해 2일차까지 유의적으로 높게 분석되었으며 4-12일까지는 대조군에 비해 낮아지다가 높아지는 농도를 반복하며 불규칙적으로 증가하는 패턴을 보였다 ($p < 0.05$). 하지만 14일이 지난 후 두 처리군 모두 대조군보다 Progesterone농도가 유의적으로 증가하며 재발정이 일어나기 하루 전인 20일차까지 정장액 및 IFN- τ 처리군 모두에서 유의적으로 높음을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$). 다발정성 동물 (Polyestrous animal)인 소는 연 1회 발정이 일어나는 단발정성 동물 (Monoestrous animal)과는 달리 일정한 주기로 1년에 여러 번 반복하여 발정이 발현된다. 소와 같은 다발정성 동물의 발정주기는 발정기, 발정후기, 발정정지기 및 발정전기로 나누어지며 착상이 이루어지지 않는 한 이러한 발정주기가 21일마다 반복 된다 (그림 63, A).

발정기(Estrus)는 약 하루 동안 지속되며 발정 개시로부터 29~32시간 후 또는 발정 종료 후 8~11시간에 배란이 일어난다. 이 시기에는 Estrogen (E2)의 농도가 최고조를 이루며 배란을 유도하는 반면 임신유지 호르몬인 Progesterone (P4)의 농도는 낮게 유지된다. 발정후기(Metestrus)에는 배란이 일어난 난포가 약 1-5일간 출혈체를 거쳐 황체로 변하면서 P4가 분비되기 시작하지만 그 농도가 낮다. 발정정지기(Diestrus)에 도달하면 황체가 성숙하고 P4가 우세하게 분비되며 자궁은 임신이 유지될 수 있는 최적의 환경을 갖게 된다. 발정정지기는 임신이 되면 분만이 일어나기 전까지 지속되며 임신이 되지 않을 때에는 5-17일 동안 유지된다. 이 시기의 황체는 Prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a})에 의한 퇴행작용이 가능하기 때문에 수태중일 경우 이 물질에 인위적으로 노출되면 유산의 가능성이 있다. 하지만 임신이 일어나지 않으면 체내에서 PGF가 분비되며 황체퇴행을 일으키고 E2의 농도가 증가하며 새로운 우세난포가 발달할 수 있도록 한다. 이러한 발정전기(Proestrus)는 약 3일 동안 유지되며 새로운 발정주기를 준비한다 (그림 63, B).

한우의 생산효율을 높이기 위한 대표적인 보조생식술에는 종모우의 정액을 인공적으로 주입하는 인공수정(Artificial insemination, AI)과 체내 또는 체외에서 만들어진 수정란을 수란우에 이식하는 수정란 이식(Embryo transfer, ET)이 있다. 이러한 보조생식술을 수행하는데 있어서 발정주기가 갖는 의미는 매우 중요하다. 배란 시기나 난자의 수정능 보유 시간과 같은 수정 적기에 영향을 미치는 요인, 수란우의 혈중 P4 농도와 같이 수태율에 영향을 미치는 요소들을 고려하기 위해서는 발정주기를 잘 알아야 하기 때문이다. 수정률을 높이기 위한 인공수정의 적기는 난자가 노화되기 전인 배란 후 5~6시간 이내로 매우 짧다. 한편 수정란이식을 할 때에는 발정동기화를 통해 일괄적으로 발정을 유도하기 때문에 인위적인 시기조절이 가능하지만 P4의 농도가 지속적으로 높게 유지되어야 성공적인 수태율을 기대할 수 있다.

본 연구에서는 발정동기화를 위해 2차 PGF_{2a}주입 24시간 후를 발정일(0일)로 설정하고 정장액을 주입하였는데(그림 65, SP) 자연적인 발생과정에서 배아가 자궁으로 내려가는 시기인 발정

7일째를 기점으로 정장액 및 IFN- τ 를 처리한 그룹 모두 P4의 농도가 유의적으로 높아지는 현상을 보였다 ($p < 0.05$). 또한 자궁을 부유하던 배아가 착상을 준비하는 시기인 20일째까지도 정장액 및 IFN- τ 처리군의 P4의 농도가 대조군과 비교했을 때 매우 높게 유지되는 것을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$). 특히 유의차는 없었으나 소에서 임신을 인식하는 인자로 알려진 IFN- τ 처리군의 P4농도가 정장액 처리군보다도 높게 유지되었다(그림 65, IFN- τ). 이렇듯 정장액 및 IFN- τ 의 처리에 의해 높게 유지되는 P4의 농도는 자궁으로 하여금 내막을 두텁게 유지하고 자궁유를 형성하도록 유도함으로써 수태율 향상에 도움을 줄 것이라 예상된다. 하지만 IFN- τ 처리군은 0일차에 정장액을 주입한 뒤 7일째가 되는 시점에 추가적으로 IFN- τ 를 주입했기 때문에 정장액의 영향을 받았을 것이므로 향후 IFN- τ 만을 처리하여 경향을 살펴볼 필요가 있다고 생각된다.

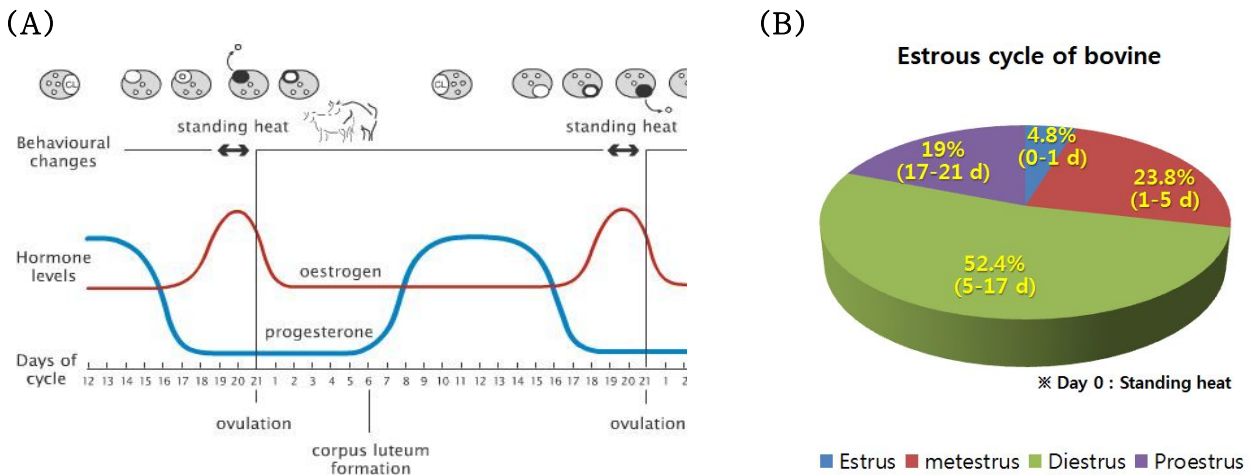


그림 63. 소의 발정주기

(A) 날짜에 따른 난소 형태, 행동 변화 및 호르몬 수준의 변화, (B) 발정주기의 단계 및 기간
(그림 (A): www.partners-in-reproduction.com)

표 58. 임신 인식인자와 임신을 인식하는 기간 및 배의 착상시기 (포유동물 생식세포학, 임경순 외, 2001)

동물	임신 인식인자	인식기간 (배란 후)	착상시기 (배란 후)
소	bIFN- τ (bTP-1)	15~18 일	18~22 일
면양	oIFN- τ (oTP-1)	12~14 일	15~18 일
돼지	Estradiol (E2)	11~12 일	14~18 일
말	3Protein/Estradiol	12~14 일	36~38 일

2) 정장물질 중 수정란 착상과 정자 수송에 영향을 미치는 물질 연구 규명

그림 67은 80%의 confluency를 갖는 소의 간질세포(1.5×10^5 cells/well)에 여러 가지 농도의 정장액(0, 50, 125 및 250 ul/ml)을 처리한 후 24시간이 지났을 때 세포의 모습을 나타낸 그림이다. 정장액이 첨가되지 않은 일반 배양액 (D/F)에서 자란 간질세포는 형태학적으로 이상이 없는 모습을 나타내고 있다 (그림 64, A). 하지만 정장액의 첨가량이 증가할수록 세포의 손상정도가 점차 커지는 양상을 보였다 (그림 64, B-D). 특히 가장 높은 농도의 정장액 (250 ul/ml)을 첨가한 D의 경우는 손상 정도가 매우 심각했다.

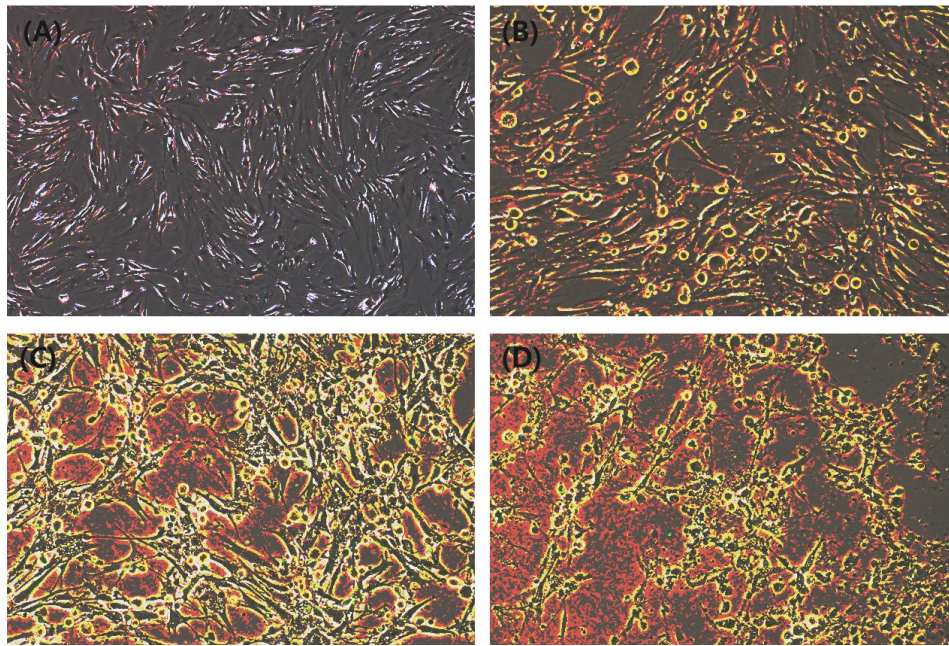


그림 64. 정장액 처리 24시간 후 소 간질세포의 형태학적 변화

(A) 일반 배양액 (B) 정장액 50 ul/ml (C) 정장액 125 ul/ml (D) 정장액 250 ul/ml

그림 65에 나타난 RT-PCR결과는 그림 64에 나타냈던 세포에서 mRNA를 추출하여 역전사 시킨 cDNA를 주형으로 증폭된 β -actin유전자의 발현양을 나타낸 것이다. Housekeeping gene으로 이용된 β -actin의 양이 정장액 (Seminal plasma, SP)을 처리한 세포에서 두드러지게 줄어드는 양상을 보였다.

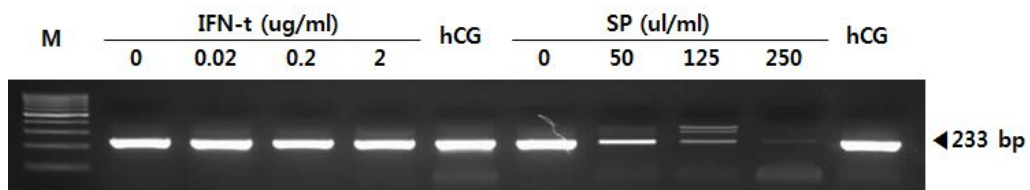


그림 65. 소의 간질세포에서 IFN- τ 와 정장액의 농도별 처리에 따른 β -actin 발현양

Housekeeping gene이란 어떤 세포에서 항상 발현되고 세포의 생명활동에 필수적인 기능을 수행하는 유전자를 총칭하는 것이다. 형질발현이나 DNA 복제, 세포분열, 에너지 대사, 물질대사 등에 관여하는 유전자들이 이에 속하는데 β -actin은 모든 세포를 구성하고 있는 골격의 한 성분으로서 앞서 언급한 Housekeeping gene의 조건을 충족하는 유전자이다. 따라서 RT-PCR에서 Housekeeping gene인 β -actin의 발현양은 실험에 사용된 sample이 동일하게 정량되었는지 확인하는 기준이 될 수 있다. 하지만 그림 n에서 나타났듯이 50, 125 및 250 ul/ml의 정장액을 처리한 처리구에서는 농도가 높아질수록 β -actin 밴드가 약하게 나왔고 이는 정장액 처리구의 sample양이 적어지고 있음을 의미한다. 일정한 농도의 간질세포 (1.5×10^5 cells/well)를 배양하였음에도 불구하고 PCR수행 시 sample양이 달라진 이유는 정장액의 농도가 짙어짐에 따라 세포가 손상을 입었기 때문이라고 추측한다 (그림 64). 또한 sample조건이 동등하지 않았기 때문에 COX-2의 발현양 및 PGF_{2a}와 PGE₂의 생산량을 비교할 수 없었다.

정액에서 정자를 제외한 나머지 액상부분인 정장물질을 분리하기 위해 기존의 연구자들은 오직 원심분리만을 이용하였지만 본 연구에서는 65%의 Percoll을 사용하여 정장액을 분리하였다. 정장액은 cytokine인자를 함유하고 있으며 수정과 수태에 유용한 물질을 함유하고 있어 In vivo 상에서 수태에 긍정적인 결과를 나타냈다. 선행연구에 의하면 In vitro실험을 수행할 경우 돼지에서는 인간에서는 50배로 희석하여 정장액을 사용했을 때 수태 및 면역에 관련된 인자들을 유도하는 효과가 있었다 (Sales et al., 2002; Madej et al., 2011). 한우에서도 이와 같은 농도로 정장액을 희석하여 처리한다면 세포에 손상을 입히지 않으면서 수태율과 관련된 인자들에 긍정적인 영향을 미칠 것이라 예상한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1) 연구개발의 목표달성도

연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발의 내용
○ 황성한우 도체성적 유전 모수 추정 및 우량공란우 선발 및 활용	100 %	- 유전능력평가에 의한 형질별 우량공란우 선정 - 선발지수를 활용한 한우의 계통분류 - 표준편차 단위 1이상 암소선발 - 우량 공란우 선발 체계 확립
○ 황성한우 유전능력 추정 및 개량도 평가	100 %	- 황성한우 형질별 개량도 평가 및 개량효율 향상 방안 분석 - 형질별 최적 공란우 선발 및 활용
○ 고급육 종모우 생산 및 사양관리 기술개발	100 %	- 우수한 개체만 종모우 선발기술 확립 - 종모우 정액생산 및 동결보존 시스템 구축 - 농가에 사양관리 기술 및 종모우 동결정액 보급 - 정자의 생존율, 기형율, 침체상태, 침체반응율, 정자 강도, DNA 단편화, 미토콘드리아, 체외수정율 검사 실시
○ 정자 및 수정란의 성 분리에 의한 수정란 생산기술 개발	70 %	- FACs에 의한 한우 정자의 성 분리 - 인공수정을 이용한 성 분리된 수정란의 생산 - 수정란의 실용적인 성판별 및 이식
○ 저비용 수정란 대량생산 및 보급 체계확립	100 %	- 발정동기화 및 수란우 선발 최적화 기술 개발 - 다배란 유기에 의한 수정란 회수기술 개발 - 체내 우수 수정란의 대량생산 체계 확립
○ 수태율 향상을 위한 자궁 내 환경 및 정장물질 분석	70 %	- 자궁조직의 분석 - 수태율에 영향을 미치는 자궁 분비물질의 분석 - 자궁 내 호르몬 변화 분석 - 정장물질의 구성 성분 분석
○ 체내 우수 수정란 이식에 의한 산자생산	100 %	- 체내 우수 수정란이식에 의한 산자 생산
○ 인공수정 및 수정란이식 시 수태율 향상기술 개발	90 %	- 정장물질의 분석 및 주입에 의한 수태율 향상 분석 - 정장물질 중 수정란 착상과 정자 수송에 영향을 미치는 물질 연구 규명 - 체내 우수 수정란이식에 의한 수태율 조사
○ 개량효율 향상기술 개발	100 %	- 생산 송아지 계통별 능력검정 - 체내 우수 수정란 생산과 수정란 이식 기술보급

- ① Flow cytometry에 의한 정자 성 분리 : 체외수정 및 인공수정을 위한 성 분리된 정자수, 정자의 생존율, 운동성, 수정능력 등의 성상 유지에 대한 목표는 달성하였지만 성 분리 효율에 대한 문제점이 남아 있다. 이는 정자 성 분리 시에 소프트웨어를 통한 flow cytometry에 대한 분리 명령이 실질적인 정자 세포의 분리와 100% 일치하지 않는 기계적 한계점으로 판단이 된다. 새로운 완충제의 개발이나 실험적인 기술로 해결이 불가능하며 기계 장치 내의 노즐(성 분리를 위한 정자 세포의 배열에 가장 핵심적인 장치)에 대한 개선이 이루어져야 가능할 것으로 생각된다. 하지만 이러한 작업은 장시간을 요하는 복잡한 과정이라 과제수행 기간 중에는 완료할 수 가 없었다.
- ② 자궁 환경 분석 : 자궁 세포의 배양을 통한 조직 내 분비 물질에 대한 실험은 당초 계획대로 진행되었으나 정상물질 및 INF- γ 의 처리에 의한 혈중 호르몬 및 자궁 내 분비물질의 분석을 위해 암소 실험군을 대상으로 실시한 in vivo 실험은 실험기간 중 구제역 발생으로 인한 중단과 구제역 해제 후의 실험군 확보 및 방역에 의한 제한적 실험 조건으로 당초 계획대로 진행되지 못하였다.

구분	특허		논문		학술발표		기타
	출원	등록	SCI	비SCI	국내	국외	
계획 목표	1	1	2	7	•	•	
달성	1	•	•	7	1	4	

- SCI 논문 준비

- “Damage Differences in X- and Y- Bearing Sperm Treated with Methyl-Beta-Cyclodextrin (MBCD) in Cryopreserved Bovine Spermatozoa”
-> Reproduction in Domestic Animals에 투고완료 후 심사 중 (2012.02.03.~)
- “Effect of Interferon- γ on the release of prostaglandins and cyclooxygenase 2 by bovine endometrial cell”
-> Reproduction in Domestic Animals에 투고 예정 (2012년 4월 이내)

2) 해당분야 학문발전의 기여도

- 육질 초음파를 이용한 조기 종모우 선발에 관한 연구
- 우량 종모우 선발 체계의 단순화 및 종모우 선발 기간 단축
- 지역 브랜드 차별화 전략을 위한 종모우 선발 기준 제시
- 계절에 따른 한우 정액 성상 변화 분석
- 정자 성 분리 방법의 개선에 영향을 미치는 각종 요인의 규명

- 수정란의 이식 시 수태율에 미치는 난소 및 자궁의 생리학적 요인의 규명
- 고능력 한우를 대량으로 생산하기 위한 번식기술의 체계적인 연구 수립

3) 연구수행과정을 통한 연구 인력 양성 효과 등

- 현재 이 분야에서 국내의 연구는 효과적으로 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구과제 수행을 통하여 구축된 연구 인력의 지속적인 활용과 양성이 가능하다.
- 본 연구과제를 통하여 양성된 연구 인력은 가축뿐만 아니라 의학의 응용분야 연구를 위해서도 활용이 가능하다.
- 현재 외국에서 이 분야에 대해 매우 활발히 연구를 수행하고 있는 연구기관과 연구원의 파견 및 교류가 가능하므로 이 분야의 연구에 대한 경쟁력이 확보될 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 산업발전 및 경제적 측면

- 저비용 과배란유도제 처리에 의한 수정란 채란 기술 확립
- 수태율(50% 이상)의 증진
- 체내수정란 생산 및 이식기술의 실용화
- 우수유전자를 갖고 있는 한우의 수정란 이식을 통한 품종개량 및 대량생산
- 고능력 한우의 개량 체계 확립으로 한우사육 농가의 경쟁력 강화 및 산업화 가능
- 고능력 한우의 균일화된 고급육 제품 생산으로 농가 고소득 창출
- 농가단위의 우수 한우유전자원 확보 및 경쟁력 증대에 기여
- 개량촉진과 한우 브랜드육 생산기반 구축에 기여

2. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 각 지자체의 요구에 부합되는 특성 있는 종모우 선발을 위한 체계도 제시
- 종모우 생산의 기반이 되는 우량 공란우의 선호도 증가에 부합한 기준 제시
- 저비용으로 고능력 한우 수정란의 생산 및 보급
- 고급육 생산에 의한 농가 소득 증대
- 정자 및 수정란의 성판별 후 이식에 의한 농가 소득 증대
- 농가에서 이용할 수 있는 저비용 고능력 한우 생산 기술체계 보급

3. 기대성과

- 고능력 한우의 수정란 이식을 통한 품종개량 및 대량생산
- 고능력 한우의 수정란 생산비용의 절감
- 고능력 한우의 균일화된 고급육 제품 생산으로 농가소득의 증대
- 농가단위의 우수유전자원 확보 및 경쟁력 증대
- 한우의 유전적 다양성 보유로 지역단위 브랜드산업의 육성과 미래 한우산업의 발전에 기여
- 종모우 두수의 증가로 근친에 의한 피해를 최소화하고 한우농가의 원활한 기술공급 역할 기대
- 지방 고유의 맛을 살려내는 지방 특유의 종모우 개발로 인한 지자체별 특성화 기대
- 지자체별 우량 공란우 육성과 다량의 체내수정란 생산 및 이식을 통한 다량의 검정우 생산 및 검정기간 단축으로 인한 개량효율의 극대화

4. 교육지도, 홍보 및 기타

- 수정란 이식 기술 보급을 위한 한우지역 농가를 대상으로 수정란 이식과 개량에 대한 교육 실시 예정
 - 현재 횡성지소 한우협회와 협의 완료 후, 세부 강의 일정 조율 중에 있음.
- 기사제목 “횡성한우의 명성을 위한 연구센터”(뉴시스 경제, 2009.10.27)
- 동영상 링크 : “횡성 명품한우 이렇게 만들어 진다”(네이버/동영상, 2009.10.24.)
- 2011년도 수정란이식학회 춘계학술대회 우수포스터상 수상 (충북대학교, 2011.05.27)
발표제목 : “Direct Embryo Collection(DEC)에 의한 한우 수정란의 채란 기술 개발”

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 신생 한우의 초기사육 프로그래밍을 이용한 고급육 생산방법

내용 : 세 종류의 아미노산을 이용하여 신생한우에게 feed & feeding imprinting 기법을 적용하여 육질을 개선한 고급육 생산과 비육효과를 증대시키는 생산방법에 관한 것으로서, 상기 feed & feeding imprinting 기법은 상기와 같은 3종류(K1, K2, K3)의 아미노산 복합체를 1:1:1로 혼합하여 3회를 분할하여 1 회 투여시 잘 희석되어진 아미노산 합제 300mg을, 생후 1일째부터 총 900mg (1일 총 투여량)을 초유에 섞어서 10일 동안 초유와 혼합하여 경구 투여함을 특징으로하는 신생 한우의 초기사육 프로그래밍을 이용한 고급육 생산방법

표 58. 아미노산 투여에 따른 성장률

처리군	생후 월령 (month)						
	2	4	8	12	16	20	24
아미노산 급여							
Mean	1.02	1.14	1.16	1.19	1.21	1.22	1.23
SD	0.09	0.17	0.19	0.31	0.25	0.22	0.12
대조군							
Mean	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
SD	0.12	0.09	0.11	0.21	0.15	0.31	0.21

대조군 한우의 체중은 생후 5개월령에서부터 24개월령까지 직선형으로 증가하고 있으나 일당 증체량은 곡선적으로 증가하였다. 그러나 아미노산 투여군에 있어서 체중의 증가 곡선의 기울기가 상승하여 도체시 체중이 25% 까지 증가하였으며, 일당 증체량도 대조군에 비해 10% 이상 증가하는 것으로 나타났다.

2. 연구 논문

- 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 prostaglandin의 영향 (J. Embryo Transfer, 22:15-19(2007)의 논문발표에서 PGF2 α 및 PGE2의 첨가가 소 수정란의 hatching에 영향을 미치며, 이들 농도에 따라 서로다른 영향을 미칠 수 있다는 사실이 규명되었다.
- 논문 "Regulation of Prostaglandin Biosynthesis by Interleukin-1 in Cultured Bovine Endometrial Cell" (Journal of Endocrinology, 2008, Accepted)에서 소 자궁내막세포에서

PGE2와 PGF2 α 생산을 자극하는 Interleukin-1 α 와 1 β 의 목적세포는 stromal cell이라는 것이 규명되었다.

- 논문 "Cell-type specificity of interleukin 1 α and 1 β on prostaglandin and plasminogen activator production in bovine endometrial cells" (Animal Reproduction Science, 2008, Accepted)에서 소의 자궁상피세포에서 IL-1 β 가 생산되며 이는 plasminogen 생산시 IL-1 β 보다 자궁세포에 더 많은 자극을 주는 것이 밝혀졌다.
- 논문 : 한우에 Ov-synch처리시 배란시기와 수태율 구명에 관한 연구. 한국 수정란 이식 학회지 18(3) (2003)
- 논문 : 한우 정액의 일반성상 및 동결후 생존성에 미치는 연구. 한국수정란이식학회지 18(2) : 143-149 (2003)
- 논문 : PEG30% FSH 투여가 한우의 체내수정란 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 18(2) : 151-156 (2003)
- 논문 " MGA Feeding System에 의한 발정동기화 방법이 한우의 발정발현과 수태율에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 21(3) : 177-182 (2006)
- 논문 : Genetic models for carcass traits with different slaughter endpoints in selected Hanwoo herds. I. Linear covariance models. Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol.21. 1227-1232(2008).

제 7 장 참고문헌

- Ax RL, Armbrust S, Tappan R, Gilbert G, Oyarzo JN, Bellin ME, Selner D and McCauley TC 2005. Superovulation and embryo recovery from peripubertal Holstein heifer. *Anim. Reprod. Sci.* 85:71–80.
- Chakraborty I, Das SK, Wang J and Dey SK, 1996, Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the periimplantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian-steroids. *J. Mol. Endocrinol.* 16, 107-122.
- Dattena M, Vespignani S, Branca A, Gallus M, Ledda S, Naitana S, Cappai P (1994): Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 42:235–239.
- Donaldson L. 1983. The effect of prostaglandin F_{2α} treatments in superovulated cattle on estrus response and embryo production. *Theriogenology* 20:279–285.
- Greve T, Callesen H, Hyttel H, Høier R and Assey R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41–50.
- Han SW, Lei ZM and Rao CV, 1996, Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene-expression by chorionic gonadotropin during the differentiation of human endometrial stromal cells into decidua. *Endocrinology* 137, 1791–1797.
- Ireland JJ, Coulson PB and Murphree RL, 1979, Follicular development during four stages of the estrous cycle of beef cattle, *J ANIM SCI* 49, 1261–1269.
- Kliem H, Berisha B, Meyer HHD and Schams D, 2009, Regulatory changes of apoptotic factors in the bovine corpus luteum after induced luteolysis, *Molecular Reproduction & Development* 76, 220–230.
- Krishnaswamy N, Danyod G, Chapdelaine P and Fortier MA, 2009, Oxytocin receptor down-regulation is not necessary for reducing oxytocin-induced prostaglandin F_{2α} accumulation by interferon- τ in a bovine endometrial epithelial cell line, *Endocrinology* 150, 897–905.
- Lafri M, Ponsart C, Nibart M, Durand M, Morel A, Jeanguyot N, Badinand F, De Mari K, Humblot P (2002): Influence CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle. *Theriogenology* 58:1141–1151.
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruiop T, Niemann H and Galli C. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.* 67:767–775.
- Madej M, Norrby M, Madsen MT, Johannisson A, Hansen C and Madej A, 2011, The effect of boar seminal plasma on the release of prostaglandins and interleukin6 by porcine endometrial and cervical cells and bovine endometrial cells, *Reprod Dom Anim* 47. 113–124.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL and Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technolo-

- gies in the cattle breeding industry. *Therogenology* 59:651–674.
- Murakami S, Shibaya M, Takeuchi K, Skarzynski DJ and Okuda K, 2003, A passage and storage system for isolated bovine endometrial epithelial and stromal cells, *Journal of Reproduction and Development* 49, 531–538.
- Murphy DB, Maploetoft R, Manns J, Humphrey WD (1984): Variability in gonadotrophin preparations as a factor in superovulatory response. *Therigenology* 21:117–125.
- Numabe T, Oikawa T, Kikiuchi T and Horiuchi T. 2000. Production efficiency of Japanese Black calves by transfer of produced *in vitro*. *Therigenology* 52:1–10.
- Okuda K, Kasahara Y, Murakami S, Takahashi H, Woclawek–Potocka I and Skarzynski DJ, 2004, Interferon- τ Blocks the Stimulatory Effect of Tumor Necrosis Factor- α on Prostaglandin F_{2 α} Synthesis by Bovine Endometrial Stromal Cells, *Biology of Reproduction* 70, 191–197.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA and Taverne MA. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Therigenology* 30:751–762.
- Rowe RF, Del Campo MR, Critser JK and Ginther OJ. 1980. Embryo transfer in cattle: Nonsurgical transfer. *Am. J. Vet. Res.* 41:1024–1028.
- Sales1 KJ, Katz AA, Millar RP and Jabbour HN, 2002, Seminal plasma activates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor expression and signalling in cervical adenocarcinoma cells, *Molecular Human Reproduction* 8. 1065–1070.
- Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J and Hansen HB. 1996. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. *Therigenology* 46:527–539.
- Shea BF, Janzen RE, McDermand DF (1984): Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in alberta over a nine year period. *Therigenology* 21:186–195.
- Son DS, Choe CY, Choi SH, Cho SR, Kim HJ, Han MH, Ryu IS, Suh GH, Kim UH, KIM IH (2007): Effect of estradiol benzoate or GnRH treatment prior to superstimulation in CIDR-treated, Korean native cows(*Bos tarurs*). *Anim Reprod Sci* 100:14–21.
- Tang B and Gorpide E, 1993, Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 47, 115–121.
- van Wagendonk–de Leeuw AM, Aerts BJ and den Dass JH. 1998. Abnormal offspring following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: A field study. *Therigenology* 49:883–894.
- 김덕임, 서상원, 정재경, 이규승, 서길웅, 박창식, 정영채, 박병권. 2002. 한우에 있어서 체내 수정란의 생산과 이식에 관한 연구: 한우 수정란 이식이 수태율에 미치는 요인. *한국수정란이식학회지* 17:33–44.
- 박용수, 김소섭, 박흠대, 박현정, 김재명. 2005. 한우 체외 수정란이 이식된 수란우의 임신과 유산에 영향을 미치는 수정란측 요인. *한국수정란이식학회지* 20:89–95.
- 신상민, 김용준, 이해리, 신동수, 김용수, 김수희, 이영준 (2009): 한우의 반복 과배란 처리에 의한 체내 수정란의 생산과 이식. *한국수정란이식학회지* 24:47–56.

임석기, 우제석, 전기준, 장선식, 강수원, 윤상기, 손동수 (1998): 한우에 있어서 PEG에 용해시킨 Fo-lltropin-V의 1회 피하주사에 의한 다배란 유기. 한국수정란이식학회지 13:207-212.

최선호, 류일선, 손동수, 조상래, 한만희, 김현종, 최창용, 김영근. 2005. 한우의 반복 과배란 및 산차가 수정란 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 20:185-190.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.