

최 종
연구보고서

임신공란우로부터 난자의 직접채취법에 의한
고능력우의 대량생산에 관한 연구

Transvaginal ultrasound-guided ovum pick up
and *in vitro* fertilization for embryo
production in pregnant cows

서울우유협동조합

농림부 도서관



0000949

농림부

1998

: 1. 10

2. 1

1999. 12. 15.

:

: ()

:

“
”

.

1999. 12. 15.

:

:

•

•

•

•

가

,

•

가

.

)

(dissection),)

(needle

aspiration))

(離解, maceration))

,

가

, ,

가

가

가

가

,

가

가

가 ,

1993 11

1994 KIST

가

가 가

가

가 가 ,

가

Pieterse (1989)

1

가,

Transducer ,

PMSG 가 ,

가

가 ,

가

1 2

가 가 ,

가

가 ,

가

(1 2)

30

, 가가

가

가 .

가 가 .

(牡)

6 7000 kg

가 .

가

가

가

가

(7)

(Donor)

가

가 .

가

WTO

가

WTO

1.

Real-time B mode

(Pie medical, Netherland) linear probe (5 MHz,)

Probe 가

가

probe

sector scanner

transducer guide

7.5 MHz ultrasonic transducer (Axial array sector probe) , guide

transducer

transducer

regulated vacuum pump

(-50 -160 mmHG)

19 20 gauge

needle

needle

monitor

biopsy line

가

regulated

vacuum pump foot switch

가

OPU

가

가

, 1

. GTH
 OPU (FSH, FSH-P, PMSG) . GTH 3 (FSH, bovine somatotropin (bST; BOOSTIN-S, LG Chem) .
 1/3 가 OPU .
 , 1 2
 가 , 1 3
 (=0) 3 4 , 9 10 15 16 .
 3 mm . 2 5 6
 2

2. OPU ,
 OPU 1 , ,
 18 gauge 10 Mℓ
 W-TCM199 2 (2-8 mm) ,
 3 mg/Mℓ BSA, 2 mM sodium bicarbonate 10 mM
 N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid](HEPES) 가 washing
 Tissue Culture Medium 199(W-TCM199) , 10% FBS, 25 mM
 sodium bicarbonate, 1 mM glutamine, 2.5 μg/Mℓ, Denka Pharm., Japan) 1 μg/Mℓ estradiol
 가 TCM199 .
 10 ng/Mℓ epidermal growth factor(EGF) cysteamine(0 100 μ M)
 가 W-TCM199 3 , TCM199 1
 well 30-50 39 , 5% CO₂, 95% incubator(5%
 CO₂ incubator) 24 .
 swim-up , modified
 Tyrode's . glutathione
 (reduced form; GSH) 0 2.0 mM 가 .
 22 (0.5 Mℓ
 / straw) straw 37 30 5 Mℓ

. 0.8 Mℓ Tyrode's (pH 7.4)
 8-10 Pasteur pipette 0.2 Mℓ 5% CO₂
 incubator 50 swim-up . 0.6-0.7 Mℓ 15 Mℓ
 2 , (500 × g, 5). hemocytometer 50
 × 10⁶ / Mℓ 200 μg/ Mℓ heparin (Sigma Co., USA) 가
 . heparin 5% CO₂ incubator 15
 .
 swim-up Tyrode (pH 7.4) 3
 4-6 3 μℓ , 5% CO₂ incubator
 . Heparin 4 μℓ 2.0 ×
 10⁶ / Mℓ가 , 5% CO₂ incubator 30 .
 Percoll BO Tyrode
 . 0.3% BSA, 0.003% sodium pyruvate 0.37% sodium lactate가 가
 percoll . 22 90% percoll 2Mℓ, 45% percoll 2Mℓ가 15
 Mℓ centrifuge tube 1-2 straw ,
 (discontinuous percoll method) 2 counting
 2 10 × 10⁶ / Mℓ가 BO Tyrode
 . heparin
 Tyrode's . 30
 . SOFM 가 pipetting
 . 2 SOFM 1
 5-6 가 incubator .
 8 10 .
 가 30
 2 BSA-V(bovine serum albumin-fraction), BSA-FAF (bovine serum
 albumin-fatty acid free) 10% FBS(fetal bovine serum)가 가 mSOF
 10 , OPU
 가
 5 가
 10% FBS 가 가 .
 1.5mM glucose 1.2mM phosphate가
 가 , 가 가

2 5 10% FBS 가 가
 , 0.5mM sodium citrate가 가 SOFM
 glucose phosphate가 가 , 가
 가 2 5 10% FBS 가
 .
 Vitamins 가 SOF
 Pantothenate 3 μM, Choline 5 μM 가 . ,
 가 PVA SOF , 10 ng/ MEGF
 가 , 1 ng/ MEGF 가
 SOF PVA myo-inositol 2.7 mM 가
 . BSA
 M199 myo-inositol

3. OPU

Slow freezing 1.8 M EG 10 - 7
 2 . 8 - 7 - 0.3 -
 30 . Vitrification Ethylene glycol + glycerol
 10% glycerol 5 , 10% glycerol + 20% Ethylene glycol
 5 25%EG + 25% Gly 30 .
 PBS 10% FBS, 1% AA 가 .
 Propylene glycol +
 glycerol , Ethylene glycol + Ficoll + sucrose(EFS) Ethylene glycol + glycerol
 . Linoleic acid albumin
 (LAA) 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3% IVC 가
 , .
 5 35 15 .
 DPBS BSA가 가 mSOF 10% FBS가 가
 2,3 , 50 μl droplets mSOF 39 , 5% CO₂, 7% O₂, 90% N₂
 가 .
 OPU . 25 mg
 PGF₂ 11 2 , 1 3 , 1

30 가 (standing estrus; 0)

. OPU

가 20% FBS가 가

PBS 0.25 Mℓ French straw 1 Cassou gun (

)

가 OPU

straw loading ,

가

5 cm

, straw

(Day 0) 6 ,

hCG(human chorionic gonadotropin) 1,500 IU

. hCG 0 , 6 10

45 60

280

1.

가.

18.5 (18 22), 19.5 (19 21), 22.6 (22 24),

25.1 (22 27), 50.7 (50 57), 60.9 (60 64)

3 가 ,

가 가 가

OPU 가 11.2
 8.5 , 3.1
 2.2 .
 5 10 mm 30.1% 15
 mm (20.0%)
 가 ,
 (22MØ/ min) .
 , needle guidance
 가 가
 OPU , A, B 가 D
 ,
 OPU GTH ,
 , GTH
 41.0 35.9% 가
 Super-OV, FSH PMSG
 , FSH PMSG 가
 GTH somatotropin , FSH (35.6%)
 PMSG bST (53.2%)
 FSH PMSG
 35 40 10 OPU
 가 40 90 OPU가 가 ,
 OPU 가 (P < 0.04) .
 80 70
 (P < 0.05) . 40 90
 ,
 2-
 27 38% , 8- / 14 29 13 21%
 OPU 가 4
 0 90 0.4 1.0 .

40 90 10 OPU 5
, OPU ,
40 90 10 ,
10 1 90%
, OPU 6 1 83%
. .
OPU 가 가
. , OPU 1
(4.8) 2 (13.9) 2
OPU 1 (72.2 vs. 66.8%) (26.6 vs.
20.5%)
. OPU ,
가 가
87.9 67.1% 60.3 43.0%
가 가
가 Cysteamine 가 100 μM
Cysteamine 가 가 (26.8 vs 16.8)
. .
TALP BO
. 가 GSH ,
GSH 0 2.0 mM 가 ,
0.5 1.0 mM 가 0 2.0 mM 가
(29.6 31.9% vs 19.2 21.6%).
mSOF(0.8% BSA) 가
. ,
Two-step culture system , BSA 가 ,
FBS 가
. 가
Two-step FBS 가 (39.5%) (25.7 29.4%)
. .
BSA(3 8mg/ Ml) PVA(0.5mg/ Ml) 1% ITS 가

, BSA PVA
 (26.7 34.7% vs 10.8 15.1%).
 ITS 가 가 .
 가 growth factor
 가 가 .
 가

glucose phosphate
 가, 가 가 , 가
 glucose 가 43.7% ,
 phosphate 가 가 37.8 38.9%
 . 가 .
 0.5 mM sodium citrate 가 glucose phosphate가
 , 가 glucose 가 ,
 phosphate 가 가 39.4, 40.8 41.9%
 . glucose 가 , phosphate 가
 가 27.9, 25.2 25.7% 가 14.4% .
 Vitamins가 SOF
 pantothenate 3 μ M 가 , choline 5 μ M 가
 pantothenate 가 (36.4%) (26.9) 가

가 citrate citrate non-essential
 amino acids(NEA)가 가 (84.6%) (66.4 78.9%)
 , citrate 가 가 .
 citrate 가 (19.0%) 가 (31.9 41.9%)
 , 가 NEA 가 (41.9%)
 minimum essential medium amino acids(MEM) 가 (31.9%) M+N (35.0%)

가 GSH , 6 10 가
 (77.3 35.5%) (65.4 69.9% 13.1 19.2%)
 . myo-inositol 가
 , PVA myo-inositol 가 (38.6%) 가 (19.4%)
 , BSA myo-inositol 가

가

. OPU

(56.5 vs. 331.%)

(49.4 13.2%)

EFS

PG + Gly

slow-freezing vitrification

가

2

(28.1 32.6%)

2

good

, 90 1

가 OPU

hCG

1,500 IU

(Table 37), small size(< 15 mm)

가

(41.2%)

(28.6%)

hCG

, 6 hCG 1500 IU

35.5% 0, 10

(26.1 22.2%)

(48.8%)

(28.1%)

(13.9).

(39.1%)

(28.9%)

OPU

4

OPU

OPU system

OPU

가

table

11

data

OPU

674

45

151

37.1%

109

294

42

가

2.

, 1 3 OPU – IVP – ET
가

()

(2000 ; 200)

가

-

		(PTAM)	- 10% 2 - TPI 10%	30%	80%
		(PTAF)			
		(PTAP)			
		(PTAT)			
		(PTAM)	- 10% 2 - CTPI 10%	30%	45%
		(PTAF)			
		(PTAP)			
		(PTAT)			
		(EBVM)	- 5% 2 - LPI 5%	20%	80%
		(EBVF)			
		(EBVP)			
		(F,C)			
		(EBVM)	- 5% 2 - CLPI 5%	20%	45%
		(EBVF)			
		(EBVP)			
		(F,C)			

- Predicted Transmitting Ability(PTA) milk/ fat/ protein/ type; Estimated Breeding Value(EBV) ; LPI(Lifetime Profit Index), TPI(Type Production Index)

- (UDC; udder composition, MS; mammary system) 30%

- : 90 (), 85 ()

(1996-97)

,
.
,
가 .
15 Heifer OPU (2
/ 100) , OPU
가 ,
가 , 가

heifer 가 , 가
2 3 가 heifer (3)

2000

, (2000 ; 20)
,
(, ,) , ,
,) 8
,
(, ,) , (, ,)
(, ,) 가

. OPU

가

가

.

,

.

,

OPU

IVF

가

. OPU

. 가

.

1	18
2		
1	22
2	OPU ,29
3	OPU 34
3		
1	39
2	OPU ,51
3	OPU 62
4	69
4	72
5	77

1

(FSH)

(PMSG)

(Nicholas Smith, 1983).

20

가 . 가

(John, 1992).

가 OPU ,

가

가 가 ,

(Fry, 1995; , 1996), (Pieters , 1992; Scott , 1994), (Meintjes , 1995; Guyader , 1997), (Looney , 1994) (Brck Greve, 1994) , OPU (Pieters , 1988)

(Scott , 1994; Meintjes , 1995). OPU

(, 1996),

bST (, 1997), (, 1997) OPU (, 1997) 가 .

, OPU

가 가 2

가

thiol 가 가

가

, 가 (Lee Fukui, 1996). 가

가 가

(Xu , 1992), (Voelkel , 1985), (Heyman , 1987)

가

가

(Shamsuddin , 1994).

(Pinyopumintr

Bavister, 1991),

가 (Yoshioka , 1997).

가

(Seshagiri Bavister, 1991).

, glucose, phosphate amino acid (Kim , 1993),

polyvinylalcohol(PVA), sodium bicarbonate (Keskintepe Brackett, 1996)

(Bernardi , 1996)

가

가

가 (two-step culture system)

가 (Pinyopumintr

Bavister, 1994).

BSA 가 가

, pH . BSA ,

, (Dobrinsky , 1996).

가 glucose

glucose가

가

(Barnett Bavister, 1996). Chatot (1989) CZB glucose
2-cell block , Schini Bavister(1988)
, Kim (1993) , Conaghan (1993) .
가 TCA cycle citrate Gray (1992)

BSA

8-

가

가

Pinyopumintr Bavister(1996)

가

가

가

가 citrate,

pantothenate, GSH myo-inositol
OPU

가

가

OPU

, OPU

가 OPU

가

, cysteamine 가

가가

glucose, phosphate, pantothenate, GSH citrate가

hCG

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 초음파 유도에 의한 난포란의 직접채취

1. 임신우 난소 및 수태산물의 초음파 상 확립

Real-time B mode 초음파진단기 (Pie medical, Netherland) 에 linear probe (5 MHz, 직장검사용) 를 장착하여 사용하였으며, 초음파투과율이 좋은 직장검사용 비닐장갑 내에 초음파용 젤을 충분히 넣고 탐측면에 젤의 두께가 약 2 mm 정도로 일정하게 유지되도록 probe를 준비하였다.

Probe의 면과 직장벽이 가능한 밀착되게 하고 임신 일령에 따라 먼저 양측난소의 초음파 상을 조사하였다. 이때 황체가 존재하는 임신각측 및 반대측 각의 난소활성유무를 검사하였다. 또한 probe를 조사하고자 하는 자궁각과 평행 또는 약간 사각으로 각 자궁각의 배측에 위치시키고 자궁각의 선단부로 전진하여 태아낭, 태아, 양막낭 및 궁부 등의 수태산물을 검사하고 열전사 프린터를 이용하여 기록하였다.

정상적인 난포의 초음파 상은 난포액으로 가득찬 원형 또는 타원형으로 까맣게 나타나며 발정주기에 따라 여러 가지 형태 및 크기가 존재한다. Figure 1은 정상발정기 동안에 보여질 수 있는 난포의 성장과 퇴행을 나타낸 그림이다. 그림에서와 같이 한 발정주기에 다수의 난포가 성장 및 퇴행을 반복하므로 주기적인 초음파 유도 난포란 직접채취가 이론적으로도 가능함을 알 수 있다.

2. 초음파 유도에 의한 난포란의 직접채취

가. 공란우의 선발

임상적 검사 및 혈액·혈청학적 검사에 의해 건강하다고 인정되며 직장검사 및 초음파 검사를 통하여 난소의 활력과 생식기도에 이상이 없는 임신우를 선발하였다. 임신전에 발정주기동안 2일 간격으로 직장을 통해 초음파로써 난소

및 생식기도의 이상유무를 검사하여 정상인 소견을 공란우선발의 자료로 활용하였다. 임신 초기 (60-120일) 동안 1주일 간격으로 직장을 통한 초음파 검사를 실시하여 난소의 활성화, 난포의 성장과 소멸, 태아의 상태 등을 검사하였다.

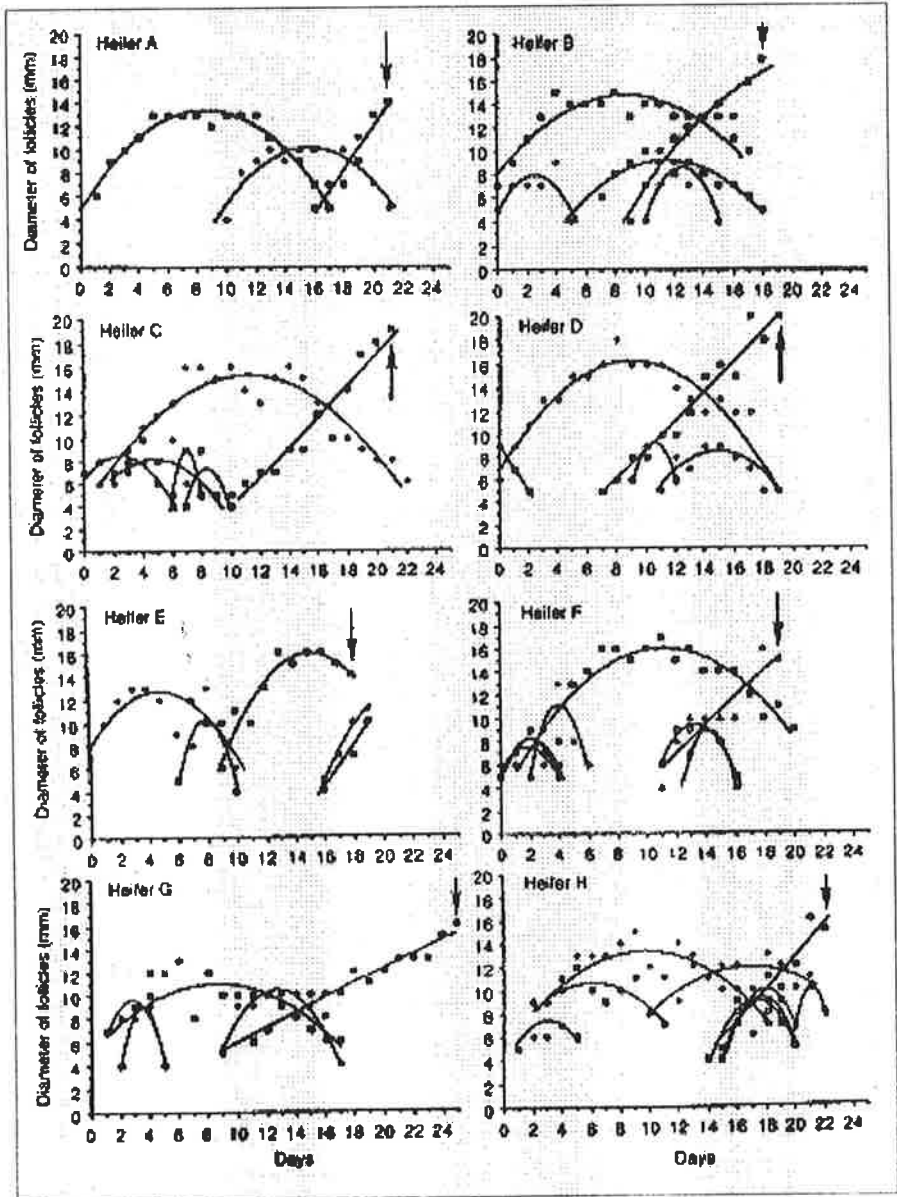


Figure 1. 발정주기중 9mm 이상된 난포의 발육과 퇴행 (Pierson & Ginther; 1988)

나. 초음파유도에 의한 난포란의 흡인

초음파유도에 의한 미성숙난자의 흡인은 Pieterse 등(1991), Bols(1995), Bols 등(1997) 및 이 등(1997)의 방법을 응용하여 실시하였으며, 임신우에 적용하기 전 기본기술 습득을 위하여 처녀우 및 경산우에도 본 기법을 시험 적용하였다.

공란우를 보정틀 또는 stanchion에 고정시켜 움직임을 최소화 한 후 2% Lidocaine 5 ml로 경막외마취를 실시하고 자궁의 이완과 진정을 위해 detomidine hydrochloride 1 mg/100 kg을 정맥내로 투여하였으며, 2% chlorhexidine으로 외음부 및 주위를 세척, 소독하였다. 그 후 직장검사용 장갑으로 보호된 채취기기를 질내로 삽입하기 전에 음순 교합부를 알콜스폰지로 닦아 재 소독하였다. 미성숙난자 흡인에는 일회용 주사침을 사용하였으며, 난자 흡인용배지(PBS, 2% fetal calf serum, 0.2% heparin)로 주사침 및 흡인관내를 충전하였다.

초음파 진단기는 sector scanner로 준비된 transducer guide내에 7.5 MHz ultrasonic transducer (Axial array sector probe)를 장착시키고, guide는 질내로 삽입하여 난소를 관찰할 수 있게 고안되었다.

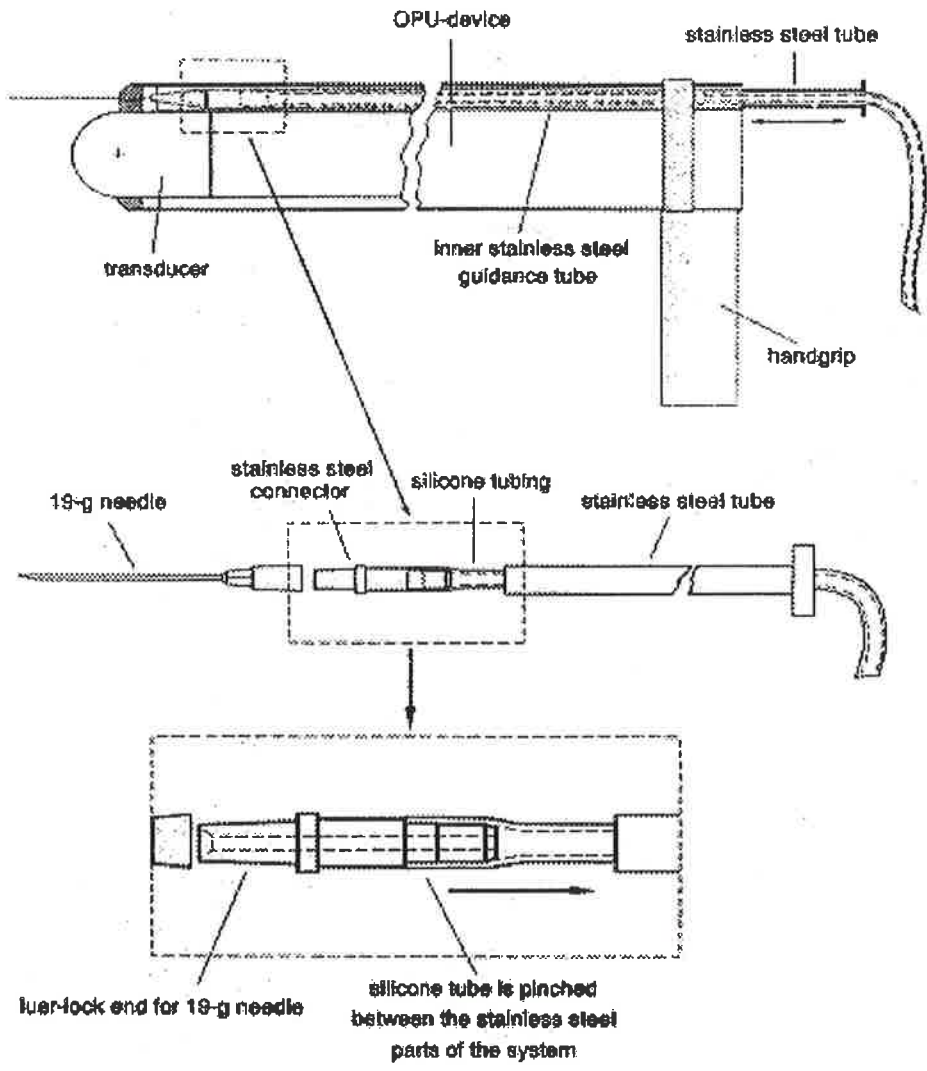


Figure 2. A new disposable needle guidance system

직장을 통해 자궁을 transducer면에 끌어당기어 자궁각을 검사함으로써 임신을 확인하였으며, 난소를 건인하여 transducer에 최대로 밀착시킨 후 미성숙난자를 채취하였다.

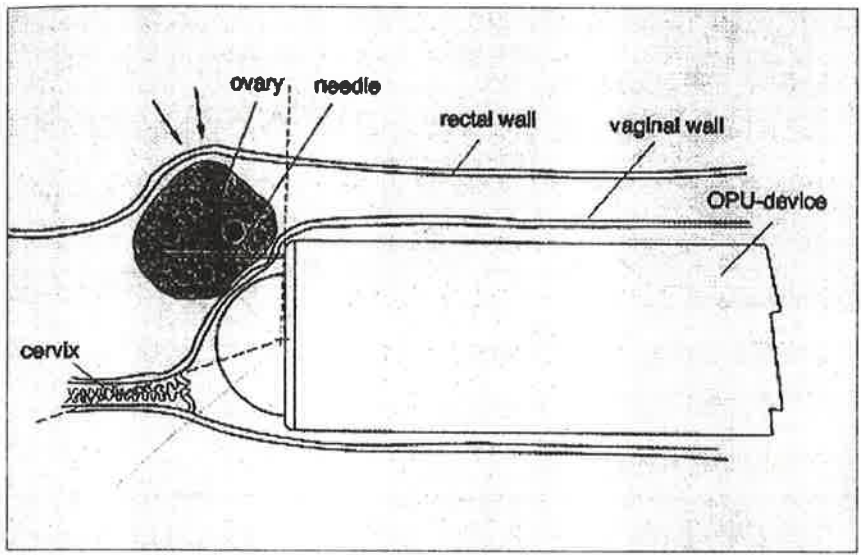


Figure 3. Positioning of the ovary

난자의 흡인은 regulated vacuum pump를 작동시켜 일정한 압력(-50~160 mm HG)을 이용하였으며, 미성숙난자의 채취를 위해서는 19~20 gauge 일회용 needle을 사용하였다.

초음파 상에서 난포를 확인한 후 needle을 삽입하여 monitor 상의 biopsy line이 난포를 횡절단할 수 있도록 위치시켰다. 난소천자는 주사침으로 질벽을 관통하여 복강내로 들어가 난소에서 확인된 난포내에 주사침을 삽입한 후 regulated vacuum pump의 foot switch를 작동시켜 미성숙난자가 포함된 난포액을 흡입, 수정관 필터에 정지시켰다. 본 실험에서는 초음파상에서 확인되는 직경 2~3 mm 이상의 모든 난포에서 미성숙난자를 채취하였다. 난포가 초음파 화상에서 완전히 사라질 때까지 음압을 유지시켜 흡입하며 주사침을 좌우로 돌려주어 주사침 끝 경사각과 반대측에 있는 난자도 흡입되게 하였다. 난포천자 후 잔류된 난포액 회수를 위해 주사침과 연결튜브를 흡입용 배지로 세척하였다. 반대측 난소도 채취 가능한 경우에는

동일한 방법으로 미성숙난자를 직접 채취하였다.

본 실험에서는 공란우가 임신우이기 때문에 임신황체가 존재하는 난소에서는 황체를 관통한 OPU는 실시하지 않았다. 채취시에 연결된 수정란 필터는 술자의 작업복 속에 넣어 급격한 온도변화를 최소로 하였으며, 1두 채취 후 필터를 최단시간 내에 실험실로 옮겨 검란하였다.

난포액과 혈액응고물을 분리하여 여과하고 실체 현미경하에서 검경하였으며, de Loos 등(1989) 및 Hazeleger 등(1995)의 기준(Table 1~2)에 준하여 분류하였다. 세포질이 균질한 난자가 다층의 치밀한 난구세포를 지니면 Grade A, 3~4층의 난구세포를 지니면 Grade B, 세포질의 균질성이 저하되고 1~2층의 난구세포를 지니면 Grade C, 난구세포가 벗겨진 난자를 Grade D로 분류하여 이후의 실험에 공여하였다.

Table 1. Oocyte categories according to de Loos et al.(1989)

category 1	<ul style="list-style-type: none"> - 치밀한 난구세포의 다층 구조 - 균질한 난자 세포질 - 전체 난구난자 복합체(COCs)가 밝고 투명
category 2	<ul style="list-style-type: none"> - 치밀한 난구세포의 다층 구조 - 균질한 난자 세포질, 다소 거친 형태로 난자의 외측부분이 어두운편 - 전체 COCs가 다소 어두우며 투명도가 낮음
category 3	<ul style="list-style-type: none"> - 난구세포의 치밀도가 저하됨 - 난자의 세포질이 불규칙하고, 검은 결점 관찰됨 - 전체 COCs가 1, 2등급보다 어두움
category 4	<ul style="list-style-type: none"> - 난구세포가 비정상적으로 확장되고 점성을 지님 - 난자 세포질이 불규칙하고, 검은 결점이 관찰됨 - 전체 COCs가 어둡고 불규칙함

Table 2. Oocyte morphological groups according to Hazeleger et al.(1995)

group 1	- 치밀한 난구세포층으로 쌓여 있으며 균질한 난질, 중간정도의 갈색, 120 μm 직경 이상의 크기
group 2	- 치밀한 난구세포층, 난질이 group 1에 비해 미약하게 거침. 주변부에 어두운 색깔, 중간정도의 갈색, 120 μm 이상 직경
group 3	- 다수의 난구세포층은 가시나 외곽부위가 팽창되기 시작, 난질에 어두운 결점이 있으며 중간정도의 갈색, 120 μm 이상 직경
group 4	- 불규칙하고 팽창된 난구세포로 변성된 부위가 관찰, 난질에 어두운 결점존재, 120 μm 이상 직경
group 5	- group 1과 유사하나 난자세포질과 난구세포가 엷은 색깔, 120 μm 이상 직경
group 6	- corona cell이 노출됨, 다양한 난자세포질 형상, 120 μm 이상 직경
group 7	- 난구세포는 정상적이나 난질이 균질하게 검은 색깔, 120 μm 이상 직경
group 8	- 투명대가 노출, 다양한 난자세포질 형상, 120 μm 이상 직경
group 9	- group 1과 유사하나 직경이 120 μm 이하

다. Follicle diameter, Aspiration pressure 및 Oocyte grade 에 따른 난자 회수율
 제 1차년도에는 OPU 유래 수정란 직접채취 기법을 확립하기 위해 회수율에 영향을 미치는 요인별 분석을 실시하였다. 기존의 실험자들이 진행한 흡입압력 및 주사침 직경 등의 결과(Table 3)를 기본으로 난자의 회수율에 중요한 상관성을 지닌 난포의 크기와 흡입압력에 따른 난자의 회수율을 다양한 범위로 하여 실험을 진행하였고, 회수된 난자의 등급별 성적 및 이후의 발육률을 관찰하였다.

Table 3. Different aspiration vacuum levels and needle diameters

Author	Aspiration vacuum	Needle diameter
Pieterse, 1988	30 - 40 ml water/min	0.8 - 1.0 mm ID
van der Schans, 1991	40 mmHg	18 - g
Kanitz, 1993	100 - 400 mmHg	not mentioned
Moreno, 1993	120 mmHg	18 - g
Rath, 1993	20 - 60 ml water/min	18 - 20 - g
Fry, 1994	50 mmHg	17 - g
Gibbons, 1994	75 mmHg	17 - g
Kruip, 1994	40 - 50 mmHg	0.9 mm ID
Loony, 1994	22 ml water/min	17 - g
Scott, 1994	26 ml water/min	17 - 18 - g
Vos, 1994	4.4 ml water/min	0.6 mm ID
Bols, 1995	36 ml water/min	19 - g
Bungartz, 1995	10 ml water/min	18 - g
Stubbings, 1995	not mentioned	18 - g

3. 임신공란우의 호르몬 처치

초음파를 통한 임신공란우에서의 GTH 처치후 난자의 흡인은 주 1회, 3주간을 연속적으로 실시하였다. GTH 처치효과를 확인하기 위해 대조군을 설정하여 동일한 기간동안 OPU를 진행하여 성적을 비교하였다. 한편 투여하는 GTH 종류에 따라 3군으로 나누어 각각 처리하였다. 제 1군은 FSH (Super-OV) 25 unit를 일일 1회 3일간, 총 75 unit 처치하고 마지막 처치 12시간 후에 난자를 채취하였다. 제 2군은 FSH-P(Schering) 를 5일동안 감량법으로 12시간 간격으로 총 40 mg 처치하고 마지막 처치 12시간후 직접난자채취하였다. 제 3군은 임

마혈청성 성선자극 호르몬인 PMSG 1000IU를 주사하여 난포의 발육을 촉진시킨 후 72시간째에 난자를 흡인하였다. 또한 호르몬 처치와 병용한 bovine somatotropin(bST; BOOSTIN-S, LG Chem) 투여로 난포발육 향상 여부를 확인하였다.

4. 임신전기간에 따른 OPU 진행

임신우의 경우 임신 전반 1/3 시기에는 난포의 생성주기가 보이므로 OPU를 진행하였으며, 그 이후는 자궁과 함께 복강내로 저류하므로 제한적인 기간만 실험을 적용하였다. 임신공란우로는 인공수정 후 35일에 직장검사 및 초음파 검사를 통하여 자궁에 태수 및 태아의 존재가 확인되는 것만을 선별하였다. 대조군은 임상검사 및 초음파 검사에서 난소와 생식기도에 이상이 없는 것을 확인하고 임신공란우와 동일한 방법으로 임신이 확인된 개체만을 공여 하였다. 실험군은 임신 40일부터 10일 간격으로 90일까지 OPU를 실시하였으며, 임신 90일에 최종 임신진단을 실시하였다. 대조군은 임신 40일부터 90일까지 10일 간격으로 직장검사 및 초음파 검사에 의해 임신 유지 및 난소상태를 검사하였다.

5. 주 2회 OPU system 적용

호르몬을 처치하지 않고 초음파를 통하여 난자를 흡인하는 기법은 주 1회 또는 주 2회 채취법의 두가지로 구분한다(Bungartz 등). 주 1회 처치법은 발정주기에 3번 채란하는 방법으로 발정주기(발정일=0) 3 또는 4일, 9 또는 10일 및 15 또는 16일에 행하였다. 이 때 초음파상에서 보이는 3 mm 이상의 난포는 양측 난소에서 모두 흡인하였다. 주 2회 채취법은 발정주기 5~6일 사이에 시작하여 주 2회씩 반복적으로 실험을 지속하였다.

2 OPU

1. (In Vitro Maturation)

가.

Lee Fukui(1996)

100 IU/ Mℓ penicillin 100 μg/ Mℓ streptomycin 25 3
(0.9% NaCl) 3

3 mg/ Mℓ BSA, 2 mM sodium bicarbonate 10 mM
N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid](HEPES) 가 washing
Tissue Culture Medium 199(W-TCM199) , 10% FBS, 25 mM
sodium bicarbonate, 1 mM glutamine, 2.5 μg/ Mℓ, Denka Pharm., Japan) 1 μg/ Mℓ
estradiol 가 TCM199

10 ng/ Mℓ epidermal growth factor(EGF) cysteamine(0 100
μM) 가

18 gauge 10 Mℓ
W-TCM199 2 (2-8 mm) ,
petridish(100 × 20 mm) 5
Kastrop (1990) 가 2

4-well dish well 500 μℓ TCM199
2 incubator W-TCM199 3 ,
TCM199 1 well 30-50 39 , 5% CO₂, 95%

2. (In Vitro Fertilization)

가.

swim-up , modified
 Tyrode's Fukui(1990)
 5 % CO₂ incubator
 glutathione(reduced form; GSH)
 0 2.0 mM 가 .

Table 4. Composition of Tyrode's medium used for the treatment of spermatozoa and *in vitro* fertilization

Component	Units	Capacitation (pH 7.4)	Washing (pH 7.4)	Fertilization (pH 7.8)
NaCl	mM	114.0	114.0	114.0
KCl	mM	3.2	3.2	3.2
NaHCO ₃	mM	25.0	2.0	25.0
NaH ₂ PO ₄	mM	0.4	0.4	0.4
Na-lactate (60% syrup)	mM	10.0	10.0	10.0
Na-pyruvate	mM	1.0	0.5	0.5
CaCl ₂	mM	–	2.0	2.0
MgCl ₂	mM	5.0	5.0	5.0
Hepes	mM	5.0	10.0	–
Glucose	mM	–	5.0	–
Phenol red	μg/ Mℓ	10.0	10.0	10.0
BSA ^a	mg/ Mℓ	6.0	3.0	8.0
GSH ^b	mM	–	–	0 2.0

^aBovine serum albumin fraction

^bGlutathione(reduced form)

swim-up

Fukui(1990) 22

(0.5 Mℓ/ straw) straw 37 30 5 Mℓ

0.8 Mℓ Tyrode

(pH 7.4) 8-10 Pasteur pipette 0.2 Mℓ

5% CO₂ incubator 50 swim-up

0.6-0.7 Mℓ 15 Mℓ 2 , (500 × g, 5).

hemocytometer 50 × 10⁶ / Mℓ 200 μg/ Mℓ heparin

(Sigma Co., USA) 가 heparin 5% CO₂ incubator 15

petridish(60 × 15 mm, Corning Costar Co., USA)

Tyrode (pH 7.8) 43 μℓ mineral oil(Sigma Co., USA)

5% CO₂ incubator swim-up

Tyrode (pH 7.4) 3 4-6 3 μℓ ,

5% CO₂ incubator Heparin

4 μℓ 2.0 × 10⁶ / Mℓ가 , 5% CO₂ incubator

30

Percoll BO Tyrode

0.3% BSA, 0.003% sodium pyruvate 0.37% sodium lactate가 가 percoll

22 90% percoll 2Mℓ, 45% percoll 2Mℓ가 15Mℓ

centrifuge tube 1-2 straw

(discontinuous percoll method) 2 counting

2 10 × 10⁶ / Mℓ가 BO Tyrode

heparin

Tyrode's

3. (In Vitro Culture)

가.

petridish(35 × 10 mm, Corning Costar Co., USA) 30 μ l
 mineral oil 4 39 , 5% CO₂, 7% O₂ 90% N₂ 가
 incubator 가 .
 .
 30 SOFM 가 pipetting
 . 2
 SOFM 1 5-6 가 incubator
 8 10
 .
 가
 가 30
 2 BSA-V(bovine serum albumin-fraction), BSA-FAF (bovine serum
 albumin-fatty acid free) 10% FBS(fetal bovine serum)가 가 mSOF
 10 .
 . 가가
 OPU
 가 5
 가 10% FBS 가
 가 .
 . **Glucose Phosphate**가
 1.5mM glucose 1.2mM phosphate가
 가 , 가 가
 2 5 10% FBS 가 가

Table 5. Composition of modified synthetic oviduct fluid medium used for the *in vitro* culture of bovine embryos

Component	Units	Early stage development	Later stage development	Washing
NaCl	mM	107.70	107.70	107.70
KCl	mM	7.16	7.16	7.16
NaHCO ₃	mM	25.07	25.07	4.01
KH ₂ PO ₄	mM	1.19*	1.19	1.19*
Na-lactate(60%syrup)	mM	3.30	3.30	3.30
Na-pyruvate	mM	0.33	0.33	0.33
CaCl ₂	mM	1.71	1.71	1.71
MgCl ₂	mM	0.49	0.49	0.49
HEPES ^a	mM	-	-	10.50
Glucose	mM	1.50*	1.50	1.50*
EAA ^b	%	2	2	2
NEAA ^c	%	1	1	1
Pantothenate	μ M	3.0	3.0	3.0
GSH ^d	mM	1.0	1.0	1.0
Citrate	mM	0.34	0.34	0.34
Myo-inositol	mM	2.77	2.77	2.77
LAA ^e	mg/ Mℓ	1	1	1
PVA ^f	mg/ Mℓ	3	3	3
BSA ^g	mg/ Mℓ	8	-	6
FBS ^h	%	-	10	-

* Supplementation was depend upon experimental design.

^a N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid].

^b Essential amino acids.

^c Non-essential amino acids.

^d Glutathione(reduced form)

^e Linoleic acid albumin

^f Polyvinyl alcohol

^g Bovine serum albumin(fatty acid free, fraction V).

^h Fetal bovine serum.

. Citrate

Glucose Phosphate가

0.5mM sodium citrate가 가 SOFM

glucose phosphate가

가 , 가

가

2

5

10% FBS 가

. ,
Vitamins 가

Pantothenate 가가

SOF

Pantothenate 3 μ M, Choline 5 μ M 가

가

PVA

SOF

, 10 ng/M \emptyset

EGF 가 , 1 ng/M \emptyset FGF

가

. PVA myo-inositol 가가

SOF

PVA

myo-inositol 2.7 mM 가

BSA

M199

myo-inositol

3 OPU

1.

Slow freezing 1.8 M EG 10

- 7

2

8

- 7

- 0.3

30

Vitrification Ethylene glycol + glycerol

10% glycerol

5 , 10% glycerol + 20% Ethylene glycol

5

25%EG + 25% Gly

30

Table 5. Composition of modified synthetic oviduct fluid medium used for the *in vitro* culture of bovine embryos

Component	Units	Early stage development	Later stage development	Washing
NaCl	mM	107.70	107.70	107.70
KCl	mM	7.16	7.16	7.16
NaHCO ₃	mM	25.07	25.07	4.01
KH ₂ PO ₄	mM	1.19 [*]	1.19	1.19 [*]
Na-lactate(60% syrup)	mM	3.30	3.30	3.30
Na-pyruvate	mM	0.33	0.33	0.33
CaCl ₂	mM	1.71	1.71	1.71
MgCl ₂	mM	0.49	0.49	0.49
HEPES ^a	mM	-	-	10.50
Glucose	mM	1.50 [*]	1.50	1.50 [*]
EAA ^b	%	2	2	2
NEAA ^c	%	1	1	1
Pantothenate	μ M	3.0	3.0	3.0
GSH ^d	mM	1.0	1.0	1.0
Citrate	mM	0.34	0.34	0.34
Myo-inositol	mM	2.77	2.77	2.77
LAA ^e	mg/ml	1	1	1
PVA ^f	mg/ml	3	3	3
BSA ^g	mg/ml	8	-	6
FBS ^h	%	-	10	-

^{*} Supplementation was depend upon experimental design.

^a N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid].

^b Essential amino acids.

^c Non-essential amino acids.

^d Glutathione(reduced form)

^e Linoleic acid albumin

^f Polyvinyl alcohol

^g Bovine serum albumin(fatty acid free, fraction V).

^h Fetal bovine serum.

제 3 절 OPU 유래 수정란의 동결 및 이식

1. 동결방법에 따른 수정란의 용해후 생존율

Slow freezing법은 1.8 M EG 용액에서 10분간 실온하에 평형을 실시한 후 -7°C 동결기에 옮기고 2분 뒤에 식빙을 실시하였다. 온도를 8분간 -7°C 로 유지한후 분당 -0.3°C 씩 -30°C 까지 하강한 후 질소탱크에 보관하였다.

Vitrification법은 Ethylene glycol+glycerol을 사용하였으며 평형을 위하여 10% glycerol에서 5분, 10% glycerol+20% Ethylene glycol에서 5분간 처리후 25%EG+25% Gly에서 30초간 유지 후 초자화동결을 실시하였다.



Figure 4. Computerized programming freezer

2. 동결보호제에 따른 수정란의 용해후 생존율

동결용 완충배지로는 PBS에 10% FBS, 1% AA를 첨가하여 사용하였다. Propylene glycol+glycerol 법은 Scheffen 등(40)의 방법을 변형한 것으로 수정란을 10% glycerol+20% propylene glycol 용액에서 10분간 실온하에 평형시키고 25% glycerol+25% propylene glycol 용액에서 30초간 4°C 하에서 평형 후 초기화 동결을 실시하였다. 용해시에는 20°C 물에서 용해후 동량의 PG+Gly와 1 M sucrose 용액에서 5분간 실온하에서 평형 후 1 M sucrose 용액으로 옮겨서 5분간 동결보호제를 제거하였다. 완충배지에서 2~3회 세척 후 추가 실험에 공여 하였다.

Ethylene glycol+Ficoll+sucrose(EFS) 법은 Zhu 등(53)의 방법을 변형한 것으로, 20% EG에서 5분간 실온 하에 평형한 후 40% ethylene glycol+18% Ficoll+0.3 M sucrose 하에서 30초간 실온 하에서 평형 후 초자화동결을 실시하였다. 용해는 25°C 물에서 실시하였으며 0.5 M sucrose 용액에서 5분간 실온 하에서 평형 후 완충배지에서 세정하였다. Modified EFS법은 일반적인 EFS 동결법에서 평형을 2단계로 10% ethylene glycol과 20% ethylene glycol에서 5분간 실온하에 정치하여 초자화 동결을 실시하였다.

Ethylene glycol+glycerol 법은 Yang 등(52)에 의해 보고된 PG+Gly법을 변형하였다. 수정란을 10% glycerol에서 5분간 실온하에서 평형 후 10% glycerol+20% ethylene glycol에서 5분간 실온하에서 평형시켰다. 마지막으로 25% Gly+25% EG에서 30초간 실온하에서 평형한 후 초자화 동결을 실시하고, 질소탱크에 보관하였던 수정란은 37°C 온수에서 용해하였다. 우선 EG+Gly와 1 M sucrose 용액, 다음으로 0.5 M sucrose 용액에서 처리 후, 0.25 M sucrose 용액에서 각 5분간 실온 하에서 정치함으로 동결보호제를 제거하였다.

3. Linoleic acid albumin의 첨가가 동결 수정란의 생존성에 미치는 영향

Linoleic acid albumin(이하 LAA) 농도를 각각 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3%로 IVC 배지에 첨가하여서 배양한 후 생산한 배반포를 동결, 용해하였다. 배양배지는 mSOF

에 0.3% BSA와 mSOF에 0.3% LAA가 첨가된 배지를 이용하였으며, 혈청알부민의 농도가 모든 군에서 0.3%가 되도록 조정하였다.

LAA에 노출되는 시간에 따른 수정란의 동결·융해후 생존성을 판별은 체외수정된 수정란을 mSOF에 0.1% LAA + 0.2% BSA가 첨가된 배지에서 20~90h과 90~138h까지 배양하였고, 대조군은 mSOF에 0.3% BSA가 첨가된 배지에서 20~138h 배양을 실시하였다.

동결방법은 Hochi 등(11)의 방법을 기본으로 실시하였으며, 배반포는 DPBS에 5.5mM glucose, 2mM sodium pyruvate를 첨가하여 실온에서 세정하였고, 동결배지는 DPBS에 1.8M ethylene glycol을 사용하였다. 스트로에 10여개의 배반포를 장착하여 10분간 정치시킨 후 -7°C에서 식빙처리하고 -30°C까지 분당 0.3°C씩 하강시켜 동결한 이후에 질소 탱크에 보관하였다.

동결 수정란의 융해는 5초간 공기중에 노출 후 35°C 물에서 15초간 실시하였다. 스트로에서 수정란을 DPBS에 BSA가 첨가된 배지로 곧바로 옮기고 mSOF에 10% FBS가 첨가된 배지에서 2,3회의 세정후, 50 μ l droplets mSOF에서 39°C, 5% CO₂, 7% O₂, 90% N₂하의 배양기에서 추가배양 하였다.

4. OPU 유래 수정란의 이식

가. 수란우 선발기준

수란우는 생후 18개월 이상이며, 임상적 소견과 임상병리학적 검사에 의하여 건강하다고 인정되고, 처치 전까지 3회 이상의 정상적인 발정주기를 보인 미경산우 및 경산우를 선발하여 이식에 이용하였다.

발정 7일째에 최종 이식할 수란우를 선발할 목적으로 직장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치 (좌 또는 우)를 확인하고, 황체의 크기가 정상 (15~25 mm) 이고 좋은 형태의 crown을 지닌 것을 1등급으로, 황체가 약간 작으며 축지가능한 crown이 있는 것을 2등급으로 판정하여 이식에 공여 하였다. 황체가 정상 크기이지만 crown이 없는 것을 3등급으로 분리하였고, 2등급 미만의 황체를 지닌 소는 수란우에서 제외시켰다.

나. 발정동기화

수란우는 발정주기에 또는 관계없이 25 mg의 PGF₂α를 11일 간격으로 2회 근육 주사 하는 방법으로 발정동기화를 유도하며, 1일 3회, 1회 30분 이상 관찰하여 승가 허용 발정 (standing estrus; 발정 0일) 을 보이는 개체를 발정우로 규정한다.

다. 수정란의 준비

OPU 유래 수정란을 수란우의 황체 등급별로 나누어 수정란이식에 이용하였다. 수란우로의 이식이 가능한 상실배 및 배반포기의 수정란을 선별하여 20%의 FBS가 첨가된 PBS 배양액과 함께 0.25 ml의 French straw 당 1개씩 흡인하고 봉한 후 Cassou gun (수정란 이식기)을 사용하여 비 외과적 자궁경관 경유 법에 의해 수란우에 이식하였다.

한편 체외배양 중에 수란우와의 발정동기화가 유도된 경우의 OPU 유래 수정란은 배양기에서 꺼낸 직후 곧바로 straw에 loading하여 이식에 공여 하였으며, 수란우와의 발정동기화가 유도되지 않은 경우에는 동결란을 용해하여 이식함으로써, 신선란과 동결란의 이식 후 수태율을 비교검토 하였다.

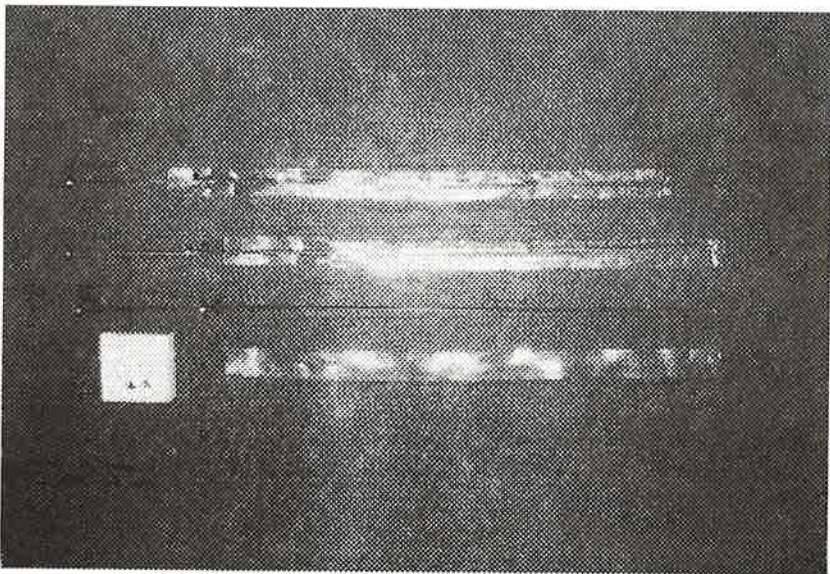


Figure 5. Bovine embryo transfer devices

라. 수정란이식

모든 수란우는 이식 12시간부터 절식시켰고, 이식을 용이하게 하기 위해 이식 전에 2% lidocaine액 5 ml로 척추 경막 외 마취를 실시하였다. 분변에 의한 오염도 감소를 위하여 외음부, 미부 및 둔부를 세정한 후 멸균된 종이로 물기를 제거하고 2% chlorohexidine을 골고루 도포 하여 소독하였다. 이후 멸균된 종이로 다시 한 번 닦아내었다.

멸균된 압박붕대를 이용하여 미근부부터 꼬리 전체를 묶어 끝부분에서 줄을 감아 오른쪽 측방으로 위치시킨 후 좌측 전지 상완부에 고정시켰다. 질내 세균의 자궁 내로의 감염을 막기 위해 고안된 vinyl cover를 straw가 장착된 수정란 이식기에 덧씌웠다. 수란우의 음순을 양손으로 벌려 상방향으로 들어 이식기 삽입시 요도개 구부로 진입하지 못하게 하여 수정란 이식기를 삽입한 후 직장내 삽입된 한손으로 수정란 이식기를 자궁경부까지 유도하며 자궁경관과 자궁의 무리한 자극을 피하면서 가능한 조속히 자궁경관을 통과하였다. 자궁각 선단부까지 이식기를 주입한 후 자궁난관 접합부 5 cm 부위에 수정란을 이식하였으며 선단부로의 주입이 제한되었을 경우 각간인대 부위에 이식하여 수태율에 미치는 영향을 검토하였다. 수정란이식을 마친 후 이식기의 선단부에의 출혈여부를 판단하였으며, straw는 곧바로 회수하여 수정란의 잔존여부를 검사하였다. 이식 후 음핵을 맛사지함으로 수정란의 자궁의 배출을 방지하며 수태율 향상을 도모하였다.

마. hCG 투여에 따른 수태율 제고

수정란 이식시의 수태율 향상을 위하여 발정일(Day 0)로부터 제 6일째, 수란우에 hCG(human chorionic gonadotropin) 1,500 IU를 근육 주사하고 수정란이식 후 수태율 성적을 대조군과 비교하였다. 또한 hCG 투여시기를 0일, 6일 및 10일로 구분하여 투여 일령에 따른 수태율을 비교하였다.

5. 고능력 송아지의 생산

가. 수태율 판정

수정란을 이식 후 45~60일에 직장검사법에 의한 태막활 및 양막낭 촉진과 초음파진단을 이용하여 수태여부를 판정하였다.

나. 산자의 생산

수정란을 이식시킨 후 280여일간 수란우의 산전관리 및 분만처치를 통해 고능력 송아지 대량생산체제를 구축하였다.

3

1

1.

가 가 3 가 , 가
 가 가 . 3
 (가)

Figure 6 31 , 44 , 65 , 90 190
 가

() anechonic
 22 27
 , 27 . 30
 가 anechonic

Table 6 18.5
 (18 22), 19.5 (19 21), 22.6 (22 24), 25.1
 (22 27), 50.7 (50 57), 60.9 (60 64)

Figure 7
 가 (anechonic)
 가 가 . (byopsy line)
 (Figure 7 B)
 가 enchonic

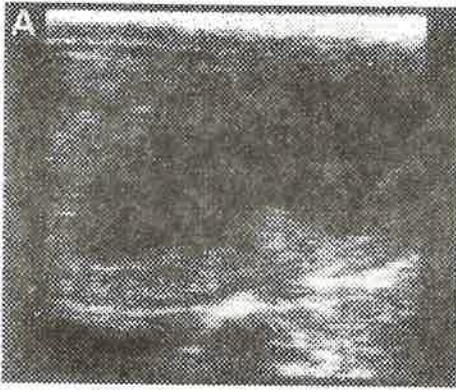


Figure 6A. Ultrasonograms of the bovine ovary and conceptus on various days of pregnancy. Scale marks on the left marginate in centimeters. A: The fetus at Day 31.

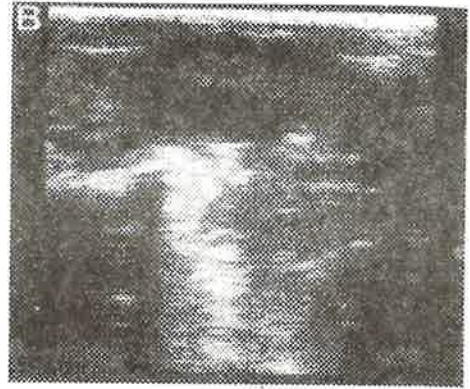


Figure 6B. The ovary at Day 41. There were a few large follicles in the ovary contralateral to the pregnant uterine horn.

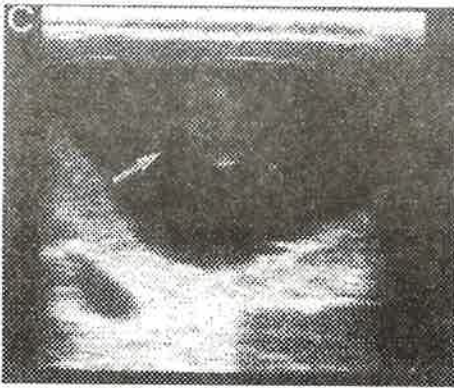


Figure 6C. The fetus at Day 44. Amnionic sac was seen (arrow).

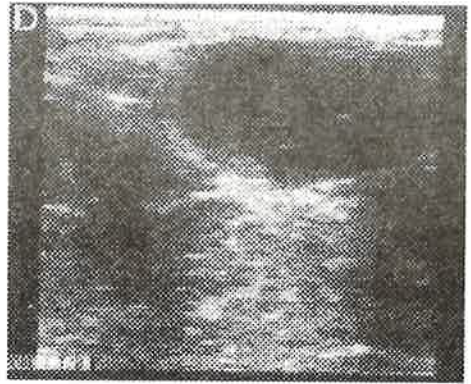


Figure 6D. The ovary at Day 44.



Figure 6E. The Fetus at Day 65.

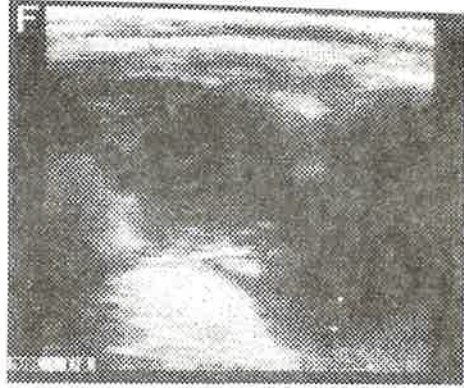


Figure 6F. The ovary at Day 65.
There were some small follicles
without large follicles

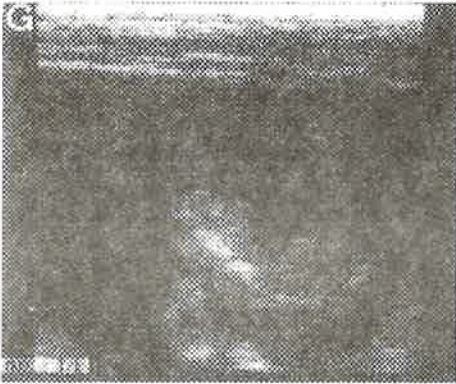


Figure 6G. The fetus at Day 90.
The head was seen.

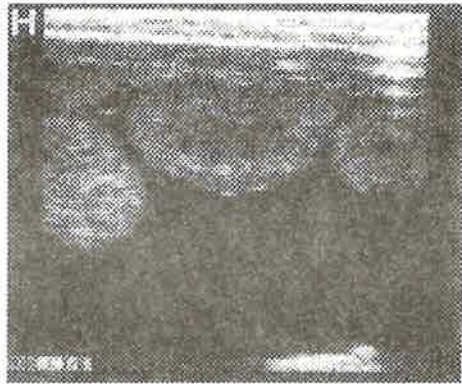


Figure 6H. The cotyledon at Day
190.

Figure 6. A~H 임신 일령별 수태산물 및 난소의 변화상

한편 각 임신구조물의 최초 관찰시기는 Table 6에서 보는 바와 같이 태낭은 임신 18.5일(범위 18~22), 태아배는 19.5일(19~21), 태아심박동은 22.6일(22~24), 요막과 양막은 25.1일(22~27), 태아운동성은 50.7일(50~57), 골격 및 척추는 60.9일(60~64)에 각각 관찰할 수 있었다.

Table 6. 젖소에서 태아구조물의 최초 관찰시기

태아구조물	최초관찰시기	
	일수(평균)	범위
태낭	18.5	18~22
태아배	19.5	19~21
태아 심박동	22.6	22~24
양막	25.1	22~27
태아 운동성	50.7	50~52
늑골 및 척추	60.9	60~64

Figure 7은 임신우의 난포 내 난자채취 초음파 상을 나타내었다. 정상적인 난포의 초음파 상은 난포액으로 가득 찬 원형 또는 타원형으로 까맣게(anechonic) 나타나며 발정주기에 따라 여러 가지 형태 및 크기가 존재한다. 생검선(byopsy line)을 따라 주사침이 삽입되는 모습(Figure 7의 B)을 볼 수 있으며, 음압을 형성시켜 난포액을 흡인하면 난포액과 함께 난자가 회수되고 난포의 anechonic한 소견은 초음파 화상에 서 사라지는 것을 확인할 수 있다.

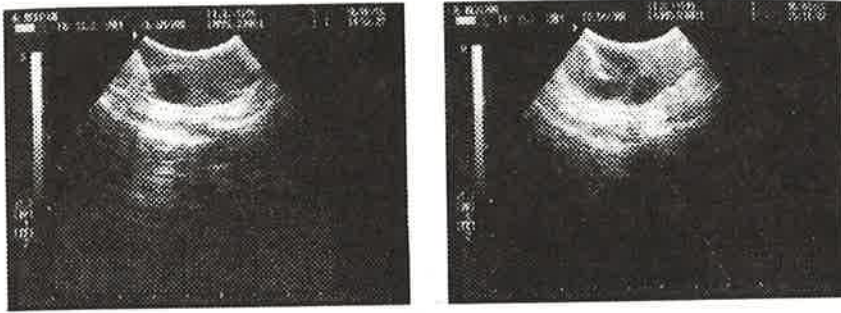


Figure 7. The oocytes were recovered from the ovaries by puncturing the follicles. Note the diagonal biopsy guideline passing down the right side of the screen (A) and echogenic tip of a needle (B) with a follicle of a pregnant cow.

2. OPU 유래 난자의 직접채취술에 영향을 미치는 인자

가. 처녀우 및 경산우에서의 난포발육 소견 및 회수율 비교

초음파 유도 난포란의 직접채취법의 기본기술을 확립하기 위해, 처녀우와 비임 경산우에서 OPU를 실시한 성적은 다음과 같다(Table 7). 처녀우에서 각 실험당 채취가능한 난포의 수는 두당 평균 11.2개로 경산우의 8.5개에 비해 조금 높은 경향을 나타내었으며, 난자 회수율도 두당 평균 3.1개로 경산우의 2.2개에 비해 높았다. 각 군간의 난자 회수율에 있어 유의적인 차이는 존재하지 않았다. 이러한 결과는 처녀우에 비해 경산우가 에너지 소비가 많으며, 난소활성도가 저하되기 때문으로 생각된다.

2. OPU

가.

OPU (Table 7). 가
 11.2 8.5 ,
 3.1 2.2 .
 가

Table 7. Aspirated follicles, oocytes collected and recovery rates of cumulus oocyte complexes (COCs) via ultrasound-guided follicular aspiration in cows and heifers

	Heifers	Cows
No. of aspiration sessions	60	48
No. of aspirated follicles	672	408
No. of aspirated follicles/ animal/ session	11.2 ± 3.5	8.5 ± 2.1
No. of recovered COCs	185	104
No. of COCs recovered/ animal/ session	3.1 ± 1.8	2.2 ± 1.2
COCs recovery rate(%)	27.5	25.5
N0.(%) of Viable COCs	100(54.1)	53(51.0)

Table 8 . 5 10
 mm 30.1% 15 mm (20.0%)
 15 mm 가
 가 가 가

Table 9

가 ,
(22MØ/ min)
, needle
guidance 가
가 .

Table 8. Recovery rates of bovine oocytes in follicles of different diameters

Estimated follicle size(mm)	No. of follicles punctured	No. of oocytes aspirated	Recovery rates (%)
5	111	27	24.3 ^{ab}
5 - 10	136	41	30.1 ^a
10 - 15	93	24	25.8 ^{ab}
15	20	4	20.0 ^b

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

Table 9. COCs classification, recovery rates and vacuum pressure in transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up

Vacuum pressure (mmHg)	No. of follicles aspirated	Grade of COCs*				No. of oocytes recovered	Recovery rates(%)
		A	B	C	D		
50	51	3	6	2	1	12	23.5
80	102	7	8	9	5	29	28.4
100	141	12	16	10	7	45	31.9
120	33	2	2	2	3	9	27.3
140	49	1	4	4	4	13	26.5
160	41	2	3	3	1	9	22.0

OPU
가 D

Table 10

A, B

OPU

가 가
가 가 D

가

Table 10. *In vitro* development of bovine recovered oocytes in relation to quality of COCs*

Grade of COCs	No. of oocytes recovered	No. of embryos cleaved	No.(%) of embryos developed to**	
			16-cell	Mo-BI
A	53	25	13	12(22.6) ^a
B	77	35	9	16(20.8) ^a
C	61	15	8	7(11.5) ^{ab}
D	42	6	4	2(4.8) ^b

*COCs : cumulus-oocyte complexes

**Mo : morula, BI : blastocyst

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

3. GTH OPU

가. GTH

OPU

GTH

(Table 11). GTH

41.0 35.9%

가

Table 11. Aspirated follicles, oocytes collected and recovery rates of cumulus oocyte complexes(COC) via ultrasound-guided follicular aspiration in pregnant cows

	GTH (-) (n=28)	GTH (+) (n=32)
No. of aspiration sessions	84	96
No. of aspirated follicles	596	912
No. of aspirated follicles/ animal/ session	7.1 ± 1.8	9.5 ± 2.1
No. of COC recovered	214	374
No. of COC recovered/ animal/ session	2.5 ± 0.9	3.9 ± 2.2
COC recovery rate(%)	35.9	41.0
Viable oocyte(%)	99 (46.3)	184 (49.2)

. GTH

Super-OV, FSH PMSG
 , FSH PMSG 가
 data
 가 , 가
 Table 12
 . GTH
 가

Table 12. Oocytes recovery from pregnant cows in Group (Super-OV 75unit), Group (FSH-P 40mg) and Group (PMSG 1000IU)

	G	G	G
NO. of Aspiration session (cows)	54 (n=18)	45 (n=15)	63 (n=21)
Mean day of gestation	82	81	79
Follicles aspirated / cow	8.6 ± 2.4	10.4 ± 3.1	9.9 ± 2.8
% Recovered COCs	39.2	46.7	42.9
No. COCs recovered / cow	3.3 ± 1.2	4.9 ± 2.6	4.3 ± 2.1
% Viable oocyte	48.1	52.6	51.2

. somatotropin

GTH somatotropin

Table 13

. FSH (35.6%) PMSG bST (53.2%)

. FSH PMSG

. bST

, insulin like growth factor-1(IGF 1) 가

Table 13. Effect of somatotropin treatment on number of follicle, follicle aspirated and oocyte collected in pregnant cow

Treated Group	No. of follicle			
	Total (cows)	No. of aspirated (%)	No. of collected (%)	No. of viable oocyte (%)
FSH	110 (n = 4)	87 (79.1)	31 (35.6) ^a	14 (45.1)
FSH + bST*	149 (n = 4)	112 (75.2)	54 (48.2)	23 (42.6)
PMSG	122 (n = 4)	94 (77.0)	40 (42.5)	19 (47.5)
PMSG + bST	165 (n = 4)	124 (75.2)	66 (53.2) ^b	27 (40.9)

* Bovine somatotropin

^{a,b} different superscripts denote significant differences ($p < 0.05$).

4. 가 OPU

35 40 10 OPU

가 (Table 14). 40 6 OPU

1 50

가 가

40 90 OPU가 가 , OPU

가 (P < 0.04)

80 70

(P < 0.05)

Table 15 40

90

2- 27 38% , 8- /

14 29 13 21% OPU

가 40 90 0.4 1.0

Table 14. Number of antral follicles in ovaries of pregnant cows* at various times after artificial insemination

Days after AI**	No. of pregnant*** cows examined	No. of follicles aspirated (no./ donor)
40	6	49 (8.2) ^{ab}
50	5	44 (8.8) ^{ab}
60	5	46 (9.2) ^a
70	5	34 (6.8) ^{bd}
80	5	40 (8.0) ^{ab}
90	5	27 (5.4) ^{cd}

* The pregnancy diagnosis was confirmed by rectal palpation and ultrasonography at 35 days artificial insemination

** Artificial Insemination

*** One donor cow aborted between day 40 and 50 of gestation
 Model effect = P<0.04, a-d; P<0.05

Table 15. Development of oocytes retrieved from pregnant cows at various times after artificial insemination following *in vitro*-maturation and *in vitro* fertilization

Days after AI*	No. of collected oocytes (no. of donor cow)	No(%) of oocytes developed to			Transferable embryos (embryos/ donor)
		2-cell	8-cell	Mo/ Bl**	
40	26 (6)	8 (31)	6 (23)	5 (19)	5 (0.8)
50	24 (5)	6 (25)	6 (25)	3 (13)	3 (0.6)
60	24 (5)	9 (38)	7 (29)	5 (21)	5 (1.0)
70	15 (5)	4 (27)	2 (13)	2 (13)	2 (0.4)
80	21 (5)	6 (29)	5 (24)	4 (19)	3 (0.6)
90	14 (5)	4 (29)	2 (14)	2 (14)	2 (0.4)

* Artificial Insemination

** Mo: morulae; Bl: blastocyst

5. OPU 가

40 90 10 OPU 5
 , OPU Table 16

40 90 10
 , OPU 6 1

90% 83%

OPU

OPU

Table 16. Effect of OPU treatment in pregnant cows on the maintenance of pregnancy

Treatment	No. of pregnant cows		Rate of maintenance
	day 35	day 95	
Control	10	9	90.0
OPU	6	5	83.3

- Pregnancy diagnosis was performed in the recipient cows by rectal palpation and ultrasonography every 10 days

6.

OPU system

OPU

OPU system

OPU가 (1/3)

OPU 가 가

(Table 17,18). , OPU

1 (4.8) 2 (13.9) (Table 17).

OPU 3 4 가 , 2

1 가

2 OPU system 가

(26) 2

2 OPU 1 (72.2 vs. 66.8%)

(26.6 vs. 20.5%) . Bungartz (13)

가 , 6 10 mm

2 OPU 1 2 가 가

Table 17. Total number and mean (\pm SD) characteristics of COC recovery and quality from follicular aspirations performed once or twice a week

Characteristic	Frequency of aspiration	
	Once-weekly(n = 6)	Twice weekly(n = 3)
No. of aspiration sessions	54	54
No. of aspirated follicles	524	744
Total number of COC recovered	231	336
Recovery rate(%)	44.1	45.2
Mean number of COC recovered/ heifer/ session	4.8 \pm 3.7	6.9 \pm 4.5
Mean number of COC recovered/ heifer/ week	4.8 \pm 3.7	13.9 \pm 6.9
Viable COCs(%)	151 (65.4) ^a	269 (80.0) ^b

^{a,b}Values with different superscripts differ between columns(P = 0.05)

Table 18. Effect of treatment on *in vitro* production by day 7 after insemination

Aspiration frequency/ week	Oocytes used	Oocytes cleaved	Transferable embryos	embryo production rate
Once	190	127	39	20.5 ^a
Twice	285	206	76	26.6 ^b

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

2 OPU

가 Table 19
 87.9 67.1% 60.3
 43.0% 가
 가 가
 가
 Cysteamine Glutathione(GSH)
 가 가 100 μM
 Cysteamine 가 가 (26.8 vs 16.8)
 (Table 20).
 가 thiol GSH
 가 가
 Cystine GSH
 thiol Cysteamine
 Cystine Cystein GSH
 가 가 GSH

Table 19. Effects of EGF and hormone on *in vitro* maturation of bovine recovered oocyte cultured in TCM199 supplemented with 10% FBS*

Supplement**	No. of oocyte examined	No.(%) of oocytes matured	No.(%) of embryos cleaved
Control	151	91 (60.3) ^a	65 (43.0) ^c
EGF	154	111 s(72.1) ^a	81 (52.6) ^c
FSH + LH + estradiol-17	149	131 (87.9) ^b	100 (67.1) ^d

* TCM199: Tissue cultrue medium 199; FBS: fetal bovine sersum

** EGF: epidermal growth factor; FSH: follicular stimulating hormone; LH: luteinizing hormone

^{abcd} Different superscripts were significantly different (p<0.05)

Table 20. Effect of Cysteamine added to the IVM medium on the developmental capacity of fertilized oocytes

Cysteamine(μ M)	Oocyte no.	cleavage	Morula	Blastocyst
0	244	195 (79.9)	57 (23.4)	41 (16.8) ^a
25	249	206 (82.7)	68 (27.3)	54 (21.6) ^{ab}
50	262	217 (82.8)	66 (25.2)	53 (20.2) ^{ab}
100	291	247 (84.9)	89 (30.5)	78 (26.8) ^b

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

2.

Table 21

TALP BO

가 GSH

Table 22

GSH

0 2.0 mM

가

0.5 1.0 mM 가 0 2.0 mM 가

(29.6 31.9% vs 19.2 21.6%).

Glutathione

GSH 가

가

가

Table 21. *In vitro* fertilization rates and cleavage of bovine oocytes derived from OPU

Type of media*	No. of oocytes	No.(%) of embryos fertilized	No.(%) of embryos cleaved
m-TALP	191	137(71.7)	126(66.0)
BO	173	120(69.4)	108(62.4)

Table 22. Effect of GSH during IVF on the development of bovine oocytes

GSH (mM)	Oocytes	cleaved (%)	Blastocyst (%)
0	120	95 (79.1)	23 (19.2) ^a
0.5	118	96 (81.4)	35 (29.6) ^b
1.0	122	102 (83.6)	39 (31.9) ^b
2.0	125	99 (79.2)	27 (21.6) ^a

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

3.

Table 23

mSOF(0.8% BSA) 가

가

Two-step culture system

BSA 가

FBS 가

(Table 24).

가

Two-step

FBS 가 (39.5%)

(25.7 29.4%)

가 BSA

(Pemble
(Dobrinsky
(Pinyopummintr
가

Kaye). ,
pH
)
Bavister),
Dobrinsky ,

Table 23. *In vitro* development of bovine recovered oocytes in relation to *in vitro* culture system

Culture system ^a		No. of oocytes recovered	No. of embryos cleaved	No.(%) of embryos developed to	
				16-cell	Mo-BI ^b
M199+BOEC (10%FBS)	GTH (+)	87	47	37	10(21.3)
	GTH (-)	43	25	21	4(16.0)
SOF (0.3%BSA)	GTH (+)	74	38	30	8(21.1)
	GTH (-)	40	19	16	3(15.8)

^aBOEC: bovine oviduct epithelial cell monolayer

^bMo-BI: morulae-blastocysts

Table 24. Effects of macromolecule and culture system on the *in vitro* development of 2-cell bovine embryos.

Macromolecule*	Culture system**	No. of embryos cultured***	No.(%) of embryos (blastocyst)
BSA	One-step	34	10 (29.4) ^a
FBS	One-step	35	9 (25.7) ^a
BSA-BSA	Two-step	39	11 (28.2) ^a
BSA-FBS	Two-step	38	15 (39.5) ^b

* BSA: bovine serum albumine; FBS: fetal bovine serum

** Embryos were replaced with the same medium or 10% FBS containing medium after day 5 post IVF.

*** At 30-32 hrs later the onset of IVF, only the 2-cell embryos were cultured in m-SOFM supplemented with 0.5 mg/Mℓ PVA at the atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂.

^{a,b} Different superscripts were significantly different (p<0.05)

4. ITS 가

BSA(3 8mg/ Mℓ) PVA(0.5mg/ Mℓ) 1% ITS 가
 (Table 25), BSA PVA
 (26.7 34.7% vs 10.8 15.1%).
 ITS 가 가

Table 25. Effects of Macromolecule & ITS on *in vitro* development of 2-cell bovine embryos derived from OPU

Macromolecules*	ITS**	No. of embryos cultured***	No.(%) of embryos developed to
			morulae & blastocyst
BSA(3 mg/ Mℓ)	+	60	20 (33.3) ^a
	-	60	16 (26.7) ^a
BSA(8 mg/ Mℓ)	+	75	26 (34.7) ^a
	-	74	21 (28.4) ^a
PVA(0.5 mg/ Mℓ)	+	86	13 (15.1) ^b
	-	74	8 (10.8) ^b

* BSA(fatty acid free, fraction), Polyvinyl alcohol

** Insulin(10 μg/ Mℓ), transferrin(5.5 μg/ Mℓ) and selenium(5 ng/ Mℓ)

*** At 30-32 hrs later the onset of IVF, only the 2-cell embryos were cultured in m-SOFM at the atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂.

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

5.

가. 가

가 growth factor

Table 26

가 가 가
 가 BSA
 FBS PVA , (15.4
 21.3%)

Table 26. Effects of EGF & FGF on *in vitro* development of 2-cell bovine embryos derived from OPU*

Group	No. of embryos cultured**	No(%) of embryos developed to***	
		Mo+eBL	exBL
Control	52	8 (15.4)	3 (5.8)
EGF(10 ng/ml)	54	10 (18.5)	4 (7.4)
FGF(1 ng/ml)	49	8 (16.3)	3 (6.1)
EGF + FGF	47	10 (21.3)	5 (10.6)

* Epidermal Growth Factor; Fibroblast Growth Factor

** At 30-32 hrs later the onset of IVF, only the 2-cell embryos were cultured in m-SOFM supplemented with 0.5 mg/ M PVA at the atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂.

*** Mo(morulae), eBL(early blastocyst), exBL(expanding blastocyst)

Glucose/ Phosphate

glucose phosphate
 가, 가 가 (Table 27), 가
 glucose 가 43.7%
 , phosphate 가 가 37.8 38.9%
 가
 2 1.5 mM glucose 1.2 mM phosphate
 glucose , phosphate
 glucose phosphate 가
 phosphate가 가 hexokinase, phosphofruktokinase
 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ,

가 mitochondria
Shshagiri Bavister

가
Kreb's cycle

Table 27. Effect of glucose and/or phosphate in mSOF medium on development of 2-cell bovine embryos

Treatment		No. of embryos cultured*	Blastocyst development(%)	
1.5 mM glucose	1.2 mM Phosphate		Total	Hatched
+	+	131	42(32.1) ^a	22(16.7)
+	-	135	59(43.7) ^b	33(24.4)
-	+	135	51(37.8)	34(25.2)
-	-	131	51(38.9)	32(24.4)

* Two-cell embryos were selected at 30 hours after IVF(7 replicates).

^{a,b} Different superscripts in the same column differ significantly(p < 0.05).

. Citrate

glucose/phosphate

0.5 mM sodium citrate 가 glucose phosphate가
(Table 28), 가 glucose
가 , phosphate 가 가 39.4, 40.8 41.9%
가 glucose 가 , phosphate
가 가 27.9, 25.2 25.7% 가 14.4%
(P < 0.05).

BSA citrate acetyl-CoA carboxylase

가
citrate
citrate
citrate
glucose phosphate
가
Liu Foote
가
가
citrate

Table 28. *In vitro* developmental rates of 2-cell embryos cultured in citrate containing mSOF medium with or without glucose and/ or phosphate

Treatment		No. of embryos cultured*	Blastocyst development(%)	
1.5 mM glucose	1.2 mM phosphate		Total	Hatched
+	+	104	32(30.8)	15(14.4) ^a
+	-	104	41(39.4)	29(27.9) ^b
-	+	103	42(40.8)	26(25.2)
-	-	105	44(41.9)	27(25.7) ^b

* Two-cell embryos were selected at 30 hours after IVF(7 replicates).

^{a,b} Different superscripts in the same column differ significantly (p < 0.05).

. Pantothenate 가

vitamins가

(Table 29). Pantothenate pyruvate가 acetyl-CoA

Co-enzyme A

. SOF pantothenate 3 μM 가 , choline 5 μM
가 pantothenate 가 (36.4%) (26.9)
가 . 가 pantothenate

가 acetyl-CoA 가 Krebs's cycle

Table 29. Effect of supplementing SOF with vitamins on bovine embryos development *in vitro*

Treatment	n	cleaved (%)	Blastocyst (%)
control	67	51 (76.1)	18 (26.9) ^a
Pantothenate	66	54 (81.8)	24 (36.4) ^a
choline	67	53 (79.1)	20 (29.8) ^{a,b}

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

(EAA NEAA) 가
 가 citrate Table 30
 citrate non-essential amino acids(NEA)가 가 (84.6%)
 (66.4 78.9%) , citrate 가
 가 citrate 가 (19.0%)
 가 (31.9 41.9%) ,
 가 NEA 가 (41.9%) minimum essential medium amino
 acids(MEM) 가 (31.9%) M+N (35.0%)

citrate 가
 가
 . Glutathione 가
 가 GSH (Table 31), 6 10
 가 (77.3 35.5%) (65.4 69.9%
 13.1 19.2%)
 GSH 가 H₂O₂

가 GSH 가 , 가 가

Table 30. Results of bovine IVMFC with culture in BSA free SOF with and without citrate and amino-acids

Additions to SOF	Fertilized	cleaved	Blastocysts	hatched BL.
with citrate	121	83(68.6) ^a	23(19.0) ^c	8(6.6) ^f
+ MEM	119	87(73.1) ^a	38(31.9) ^d	17(14.3) ^g
+ NEA	124	105(84.6) ^b	52(41.9) ^e	20(16.1) ^g
+ M+N	120	86(71.7) ^a	42(35.0) ^d	14(11.7) ^f
without citrate	116	77(66.4) ^a	13(11.2) ^{c,d}	4(3.5) ^{f,h}
+ MEM	118	87(73.7) ^a	33(27.9) ^d	11(9.3) ^f
+ NEA	118	89(75.4) ^a	33(27.9) ^d	14(11.8) ^f
+ M+N	119	94(78.9) ^a	34(28.6) ^d	10(8.4) ^f

^{a h}Different superscripts were significantly different (p<0.05).

Table 31. Effect of adding GSH(1 mM) during culture on the development of *in vitro* fertilized bovine oocyte

Treatment GSH (1 mM)	No. of oocytes / embryo		
	fertilized	cleaved (%)	blastocysts
control	125	87 (69.6) ^a	24 (19.2) ^c
IVC (d2 10)	130	85 (65.4) ^a	17 (13.1) ^c
IVC (d2 5)	124	84 (67.7) ^a	21 (16.9) ^c
IVC (d6 10)	110	85 (77.3) ^b	39 (35.5) ^d

^{abcd}Different superscripts were significantly different (p<0.05).

. PVA myo-inositol 가

myo-inositol 가 Table 32 .
PVA myo-inositol 가 (38.6%) 가 (19.4%)
, BSA myo-inositol 가
가 . PVA myo- inositol 가 ,
가
PVA myo-inositol 가
2 가 가 , BSA가 가 .
Myo-inositol vitamins BSA
. BSA
가 myo-inositol .
Myo-inositol ,
inositol-1,4,5 triphosphate
.(10) (31) glycine
.(33)

Table 32. Effect of BSA, PVA and myo-inositol on bovine embryo development in SOFaa

Medium	Macro molecule	Myo-inositol	Oocytes	cleaved	blastocysts	hatched
SOFaa	BSA	-	135	105(77.7)	52(38.5) ^a	29(21.5) ^d
SOFaa	BSA	+	135	104(77.0)	50(37.0) ^a	25(18.5) ^d
SOFaa	PVA	-	134	106(79.1)	26(19.4) ^b	7(5.2) ^e
SOFaa	PVA	+	132	103(78.0)	51(38.6) ^a	19(14.4) ^{d,e}
M199co-culture	CS	-	130	105(80.7)	37(28.4) ^c	19(14.6) ^{d,e}

^{abcd} Dissimilar superscripts with in columns denote statistical differences
(^ap<0.001, ^bp<0.01, ^dp<0.05)

3 OPU

1.

EFS PG + Gly (56.5 vs. 331.%) (49.4
 13.2%) (Table 33). Ethylene glycol PG glycerol
 ,(34) Ficoll
 ,(14)
 sucrose
 ,(36)
 EFSm Eg + Gly 2 3
 가

Table 33. *In vitro* development and hatching rates of *in vitro* produced bovine embryos vitrified with EFS, EFSm, or EG + Gly

Treatments	Embryos	development (%)	hatching (%)
Pg+Gly	151	50 (33.1) ^a	20 (13.2) ^c
EFS	154	87 (56.5) ^b	76 (49.4) ^d
EFSm	147	91 (61.9) ^b	79 (53.7) ^d
Eg+Ely	160	93 (58.1) ^b	82 (51.2) ^d

^{abcd} Values with different superscripts with colvmns differ significantly (^ap<0.05, ^c p<0.01)

2.

Table 34
 slow-freezing vitrification . slow-freezing
 가
 vitrification slow-freezing

Table 34. Re-expanded blastocysts during IVC following cryopreservation and thawing

cryopreservation	No. of cryopreserved	Re-exB 24hrs.	Re-exB 48hrs.
slow-freezing	67	51 (76.2)	47 (70.1)
vitrification	69	49 (71.0)	43 (62.3)

3. LAA 가

가 LAA가 가 (19.1%)
 가 (37.2 58.8%) (Table 35).
 가 가
 . LAA 가
 linoleic acid가
 가

Table 35. Effect of different timing of LAA exposure on the post-thaw survival of *in vitro* produced bovine embryos

Exposure to LAA		embryos	survived
20 90hpi	90 138hpi		
-	-	141	27 (19.1) ^a
-	+	145	61 (42.1) ^b
+	-	140	54 (37.2) ^b
+	+	141	83 (58.8) ^c

significantly different between ^a and ^b (p<0.02), ^b and ^c (p<0.001)

4. 가

가.

가

(Table 36),
 1 2 , 90
 1 (28.1 32.6%) 2 good
 15 mm
 가

Table 36. Effects of corpus luteum(CL) & blastocyst quality on pregnancy rates after transfer of bovine embryos derived from OPU

CL grade*	BL quality**	No. of embryos transferred	No(%) of pregnant at***	
			Day 45	Day 90
	Excellent	32	12 (37.5)	9 (28.1)
	Good	43	16 (37.2)	14 (32.6)
	Excellent	36	11 (30.6)	8 (22.2)
	Good	34	7 (20.6)	5 (14.7)

* : normal size(15-25 mm) with good crown, : small size(<15 mm) with palpable crown.

** Grading bovine embryos by morphological features was followed by Kennedy et al.(1983)

*** The pregnancy diagnosis was confirmed by ultrasonography and rectal palpation

. hCG

가 OPU hCG
 1,500 IU (Table 37), small size(< 15 mm) 가
 (41.2%) (28.6%)
 hCG Table 38 , 6 hCG 1500 IU
 35.5% 0, 10 (26.1 22.2%)

progesteron
 estrogen 가 estrogen 가
 progesteron 6 (
 1) hCG estrogen
 progesteron

	(E/P)			
		hCG	6	가
가		0	10	estrogen

Table 37. Effects of human chorionic gonadotrophin(hCG) on pregnancy rates after transfer of bovine embryos derived from OPU

CL grade*	hCG treatment**	No. of embryos transferred	No(%) of pregnant at day 45***
	+	20	7 (35.0) ^{ab}
	-	17	6 (35.3) ^{ab}
	+	17	7 (41.2) ^a
	-	14	4 (28.6) ^b

* : normal size(15-25 mm) with good crown, : small size(<15 mm) with palpable crown.

** hCG (1500 IU) was injected at day6

*** The pregnancy diagnosis was confirmed by ultrasonography and rectal palpation

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

Table 38. Effect of hCG injection time on pregnancy rates after transfer of bovine embryos derived from OPU

day of injection	No. of embryos transferred	No(%) of pregnant at	
		day 45	Day 90
0	23	7(30.4)	6(26.1) ^a
6	31	13(41.9)	11(35.5) ^b
10	27	8(29.6)	6(22.2) ^a

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

(Table 39)

(48.8%)

(28.1%)

(13.9).

Table 39. Pregnancy rate following transfer of bovine embryos at two locations in the uterus

Embryo Placement	Embryo quality		
	Grade 1	Grade 2	Total
Deep	58.3% (14/ 24)	36.8% (7/ 19)	48.8% (21/ 43) ^a
Shallow	29.4% (5/ 17)	26.7% (4/ 15)	28.1% (9/ 32) ^b

^{a,b} means in same column with different superscripts are different, p<0.01

.

Table 40

(39.1%) (28.9%)

가

Table 40. Comparison of Pregnancy rate between fresh and cryopreserved bovine embryos derived from OPU-IVP

Treatment	No. of embryos transferred	No.(%) of pregnant
Fresh	64	25(39.1) ^a
Slow freezing	38	11(28.9) ^b

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

. OPU

OPU

(Table 41).

4

OPU

OPU system

OPU가
table 11
data OPU
674 45 151
, 294
37.1% 109
42
OPU 가 , 가

Table 41. Pregnancies after OPU-IVP treatment

Name of donor cow	No. of embryos produced	No. of embryos frozen	No. of embryos transferred	No. of pregnancies	No. of calves born
73	47	8	2	1	1
24	108	29	61	19	4
26	39	-	6	-	-
195	41	11	7	2	1
41	47	17	12	4	1
152	29	-	5	3	2
118	132	33	86	39	17
10	23	-	3	-	-
	46	6	11	2	-
	84	21	52	23	11
105	18	26	49	16	5
Totals	674	151	294	109	42

Table 41. Pregnancies after OPU-IVP treatment

Name of donor cow	No. of embryos produced	No. of embryos frozen	No. of embryos transferred	No. of pregnancies	No. of calves born
스터피 73	47	8	2	1	1
리갈 오디세이 24	108	29	61	19	4
인그레이버 26	39	-	6	-	-
카스피 에어로스타 195	41	11	7	2	1
프로제니터 41	47	17	12	4	1
리코 일루시브 152	29	-	5	3	2
제이드 벤자민 118	132	33	86	39	17
알린다 10	23	-	3	-	-
인그레이버 니트로	46	6	11	2	-
프릴루드 블로섬	84	21	52	23	11
싸이먼 펜시폴 105	18	26	49	16	5
Totals	674	151	294	109	42

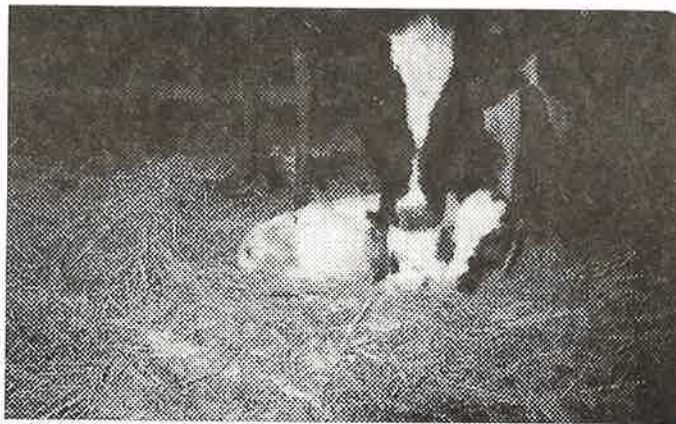


Figure 8. OPU 유래 고능력 산사 소견

제 4 절 고능력우 선발기준 설정

본 과제의 결과물들을 바탕으로 하여, 제 1~3절에서 언급했던 OPU - IVP - ET 기술 발전 및 이로 인한 고능력우의 대량생산 체계가 설정됨에 따라 뛰어난 유전능력을 보유한 외국산 젖소 보증 종빈우의 국내 도입으로 국내 젖소의 유전형질 개량에 기여하고자 고능력우의 선발기준을 설정하였다(Table 42).

특히 국내 젖소 개량에 적합한 능력(체형개량 및 산유능력)의 특징점을 보유한 최고 수준의 강건한 종빈우를 확보하고자 하였으며, 이를 통해 고능력 수정란을 대량으로 생산하고, 현 조합 육성우목장 내 수란우(2000년; 약 200두 규모) 및 조합원 보유 수란우에 공급하여 농가의 이익을 증대하고자 하였다.

아래에서 언급한 종빈우의 도입규격은 농림부 고시(제1996-97호)를 바탕으로 그 규격을 준수하였으며, 고능력우의 수준을 더욱 향상시켜 첨단기법을 이용한 단기간 내 유전형질 개량을 도모하고자 능력기준을 한 층 고수준으로 제한하였다.

Table 42.

		(PTAM)	- 10% 2 - TPI 10%	30%	80%	
		(PTAF)				
		(PTAP)				
		(PTAT)				
			(PTAM)	- 10% 2 - CTPI 10%	30%	45%
			(PTAF)			
			(PTAP)			
			(PTAT)			
		(EBVM)	- 5% 2 - LPI 5%	20%	80%	
		(EBVF)				
		(EBVP)				
		(F,C)				
			(EBVM)	- 5% 2 - CLPI 5%	20%	45%
			(EBVF)			
			(EBVP)			
			(F,C)			

- Predicted Transmitting Ability(PTA) milk/ fat/ protein/ type; Estimated Breeding Value(EBV) ; LPI(Lifetime Profit Index), TPI(Type Production Index)

- (UDC; udder composition, MS; mammary system) 30%

- : 90 (), 85 ()

가 .
15 Heifer OPU (2
/ 100) , OPU
가 ,
가 , 가
heifer 가 , 가
2 3 가 .
heifer
가 (3)

2000

(2000 ; 20)

) 8

(, ,),

(,)

(. ,)

가

4

OPU

Becker (1996)

15

1

가 COC 가 가 (62% vs 66%).

IVF

OPU

가

Ian Gordon

가 long non-disposable

1

stainless steel connector

silicone tube

stainless steel tube

가

needle guidance system

transducer

OPU

가

가 46 55 %

18-g

가

3 4

가 OPU

. de Roover (1997) OPU

5

가

(Cumulus Oocyte Complex)

. COC

가

3

가

(19-g)

(50 70 mmHg)

가

Becker (1996)

가

COC

, COC가

OPU

COC

가

100

OPU

OPU

2mm

가 . 2mm

가

가 가

OPU

가

OPU

가

OPU

. Pieterse (1996)

OPU

Brown et

al.(1996)

OPU

가

OPU

2 3

가

OPU

가

가

OPU

. 가

lidocain

가

가

COC

1

2

OPU

3

OPU

4

7

OPU

.

OPU

3

.

1

2

OPU

가

가

OPU

가

OPU

3 10mm

가

OPU 가 가 가 가
 가 가
 FSH
 2 가
 1
 가 somatotropin
 somatotropin 가 가 가
 IGF-1 가
 BST
 가 가
 가 FSH 가 COC
 Blondin (1995) FSH
 가 OPU-IVP
 BST OPU
 OPU-IVP
 가
 가
 가 Rieger (1991)
 FSH BST
 가 Gray (1993)
 가 가
 Kuehner (1993) FSH BST
 가 가 가 FSH PMSG
 BST
 COC 가
 OPU-IVP 가
 Looney (1994) Hasler (1995) OPU-IVP

, Donnay (1997) OPU
 가 20 2
 26% 2 2 5
 가
 45%
 55%
 10%
 가
 가 가
 가 7
 Kruip (1997) , ,
 OPU-IVP 가 IVP AI
 가 IVF
 가가 , ,
 12 OPU-IVF ,
 1 가 1 가 .
 IVF
 OPU
 IVF 가

- Anderson GB, Cupps PT, Drost M. 1979. Induction of twins in cattle with bilateral and unilateral embryo-transfer. *J. Anim. Sci.* 49, 1037-1042.
- Baker AA, Kobayashi G, Jillella D. 1983. A comparison of the pregnancy following non-surgical and surgical transfer and visual grading of bovine embryos on farms in South-Eastern Queensland. *Theriogenology* 15, 214(Abstr.).
- Bavister BD. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 29, 143-154.
- Boland MP. 1988. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21, 126-137.
- Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick-up in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43, 677-687.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27, 147-158.
- Brinster RL. 1971. Measuring embryonic enzyme activity. In: Daniel, J.C.Jr. *Methods in mammalian embryology*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA, pp. 215-227.
- Bumgarez L, Lucas-Hahn A, Rath D, Niemann H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology* 43, 667-676.
- Camous S, Heymen Y, Méziou W, Ménézo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.* 72, 479-485.
- Chandley AC. 1987. Meiotic analysis in germ cells of man and the mouse. In "Mammalian development : a practical approach", M. Monk, ed., IRL Press Ltd., Oxford, U.K., pp. 73-74.
- Chang MC. 1959. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature* 184, 466-467.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis GL, Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert. 86, 679-688.

Coskun S, Sanbuissho A, Lin YC, Rikihisa Y. 1991. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor(EGF). Theriogenology 36, 485-494.

Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northy DL, First NL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology 25, 150(Abstr.).

Dauzier L, Thibault C. 1959. Dounees nouvelles fur lar fécondation *in vitro* de laeuf de la Lapine et de la Brebis. Acad. Sci. 248, 2655-2656.

de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip ThAM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Research 24, 197-204.

Dekel N, Sherizly I. 1985. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. Endocrinology 116, 406-409.

Dobrinsky, J.R., Johnson, L.A. and Rath, D. 1996. Development of a culture medium(BECM-3) for porcine embryos: Effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. Biol. Reprod. 55, 1069-1074.

Downes CP, Mac Phee CH. 1990. Myo-inositol metabolites as cellular signals. Eur J Biochem. 193, 1-18.

Downs SM. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. Biol. Reprod. 41, 371-379.

Edwards RG. 1962. Meiosis in ovarian oocytes in adult mammals. Nature 196, 446.

Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, fhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature 208, 349-351.

Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH. 1990. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. Biol. Reprod. 43, 97-104.

Eyestone WH, First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert. 85, 715-720.

- Fahy GM, Mac Farlane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification As an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426.
- Fleming AD, Evans G, Walton EA, Armstrong DT. 1985. Developmental capability of rat oocytes matured *in vitro* defined medium. *Gamete Res.* 12, 255-263.
- Fry RC, Simpson TL, Squires TJ, Parr RA, Damanik RM. 1994. Factors affecting transvaginal oocyte pick-up in heifers. *Theriogenology* 41, 197, abstr.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in-vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 92, 125-131.
- Fukui Y, Ono H. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Rec.* 122, 282.
- Fukui Y, Ono H. 1989. Effect of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in-vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 86, 501-506.
- Fukui Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 40-46.
- Fukushima M, Fukui Y. 1985. Effect of gonadotrophins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 9, 323-332.
- Gandolfi F, Brevini TAL, Moor RM. 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 38, 107-115.
- Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. 1994. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 41, 206, abstr.
- Goto K, Kajihara S, Kosaka M, Koba Y, Nakanishi Y, Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 83, 753-758.

- Goto K, Kajihara Y, Koba M, Kosaka S, Nakanishi Y, Ogawa K. 1989. In vitro fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci. 67, 2181-2185.
- Hanada A. 1986. *In vitro* fertilization of bovine oocytes. Consultant for Animal Science 258, 10-15(in Japanese).
- Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. Theriogenology 43, 509-522.
- Herrler A, Lucas-Hahn A, Nieman H. 1992. Effects of insulin-like growth factor-I on in-vitro production of bovine embryos. Theriogenology 37, 1213-1224.
- Hochi S, Senple E, Leibo SP. 1996. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. Theriogenology 46, 837-847.
- Kanitz W, Becker F, Spitschak M, Torner H. 1993. Method and results of ultrasound guided follicular aspiration in cattle. In Proc 9e Reunion AETE 1, 218, abstr.
- Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ, Kruip ThAM. 1990. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation in vitro. Mol. Reproduction Dev. 26, 222-226.
- Kruip ThAM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. Theriogenology 42, 675-684.
- Lee ES, Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by in vitro produced bovine morulae and blastocysts. Biol, Reprod 55, 1383-1389.
- Lehn-Jensen H, Willadsen SM. 1983. Deep-freezing of cow 'HALF' and 'QUARTER' embryos. Theriogenology 19, 49-54.
- Leibfried-Rutledge ML, Bavister BD. 1983. Fertilizability of *in vitro* matured oocyte from golden hamster. J. Exp. Zool. 226, 481-485.

Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, First NL. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biol. Reprod. 35, 850-857.

Li J, Foote RH. 1995. Effect of inositol and glycine with increasing sodium chloride and constant osmolality on development of rabbit embryos. J. Assist Reprod. Genet. 12, 141-146.

Liu, Z. and Foote, R.H. 1997. Effects of amino acids and α -amanitin on bovine embryo development in a simple protein-free medium. Mol. Reprod. Dev. 46, 278-285.

Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. Theriogenology 41, 67-72.

Lu KH, Boland MP, Crossby TF, Gordon I. 1987. *In vitro* fertilization of cattle oocytes matured *in vitro*. Theriogenology 27, 251(Abstr.).

Matsuyama K, Miyakoshi H, Fukui Y. 1993. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology 40, 595-605.

McLaughlin KJ, McLean DM, Stevens G, Ashman RA, Lewis PA, Bartsch BD, Seamark RF. 1990. Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. Theriogenology 33, 1191-1199.

Meintjes M., Bellow M.S., Broussard J.R., Paul J.B. and Godke R.A. : Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. Journal of Animal Science, 73:967-974, 1995.

Moor R.M, Trounson AO. 1997. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J. Repro. Fert. 49, 101-109.

Moreno JF, Flores-Foxworth G, Westhusin M, Kraemer DC. 1993. Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated post mortem. Theriogenolgy 39, 271, abstr.

Ng SC, Sathananthan H, Bongso A, Lee MN. 1988. The use of amniotic fluid and serum with propanediol in freezing of murine 2-cell embryos. Fertil. Steril. 50, 510-512.

- Palasz AT, Mapletoft RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes, Recent advances. *Bio tech Adv.* 14, 127-149.
- Park YS, Lin YC. 1993. Effect of epidermal growth factor(EGF) and defined simple media on *in vitro* bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology* 39, 475-484.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171-1180.
- Pemble, L.B. and Kaye, P.L.. 1986. Whole protein uptake by mouse blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 78, 149-157.
- Pieters MC, Kappen KA, Kruip ThM, Taverne MAM.1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenolgy* 30, 751-762.
- Pinyopummintr, T. and Bavister, B.D. 1996. Energy substrate requirements for *in vitro* development of early cleavage-stage bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 193-199.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 66, 161-168.
- Rafferty KA Jr. 1970. *Methods in experimental embryology of the mouse.* The Johns Hopkins Press. Baltimore and London. pp.42-50.
- Rall WF 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24, 387-402.
- Rath D. 1993. Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. *Embryo Transfer Mews* 11, 10-15.
- Rieger D. 1992. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology* 37, 75-94.
- Rodger D. 1986. The usefulness of the sperm penetration assay in predicting *in vitro* fertilization (IVF) success. *J. Vitro Fert. Embryo Transfer* 3, 209-211.

Rowe RF, Del Campo MR, Crister JK, Ginther OJ. 1980. Embryo transfer in cattle. Am. J. Vet. Res. 41, 1024-1028.

Scheffen B, Vauder Zwalmen P, Massip A. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. Cryo Letters. 7, 260-269.

Schultz RM. 1988. Role of protein phosphorylation in meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*. ANN. NY. Acad. Sci. 541, 219.

Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Paterson C, Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. Vet Rec 134, 440-443.

Seshagiri, P.B. and Bavister, B.D.. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "Crabtree effect". Mol. Reprod. Dev. 30, 105-111.

Shalgi R, Dekel N, Kraicer PF. 1979. The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert. 55, 429-435.

Sirard MA, Lambert RD, Ménard DP, Bedoya M. 1985. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. J. Reprod. Fert. 75, 551-556.

Sirard MA, Lambert RD. 1986. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. Vet. Rec. 119, 167-169.

Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. Biol. Reprod. 39, 546-552.

Stubbings R.B. and Walton J.S. : Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. Theriogenology, 43:705-712, 1995.

Takahashi Y, First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology 37, 963-978.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fert. 30, 493-497.

Thibault C, Szollosi D, Gerad M. 1987. Mammalian oocyte maturation. Reprod. Nutr. Develop. 27(5), 865-896.

- vander A, van der Westerlaken CAJ, de Wit AAC, Eyestone WM, de Boer HA. 1991. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 35, 288, abstr.
- Vos PLAM, de Loos FAM, Pieterse MC, Bevers MM, Taverne MAM, Dieleman SJ. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG-treated cows. *Theriogenology* 41, 829-840.
- Walker SK, Heard TM, Seamark RF. 1992. *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture: success and perspectives. *Theriogenology* 37, 111-126.
- Walton JS, Martineau NA, Stubrings RB. 1986. Pregnancy rates in Holstein embryo transfer recipients: Effect of treatment with progesterone or clenbuterol and of natural versus induced cycles. *Theriogenology* 26, 837.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH, Schultz GA. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod.* 30, 330-338.
- Wright RW, Bondoli KR. 1981. Aspect of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.* 53, 702-729.
- Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ, King WA. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 94, 33-43.
- Yohg NS, Lu KH, Gordon I, Polge C. 1992. Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology* 37, 326, abstr.
- Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T, Machida T. 1993. Cryopreservation of expased Mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solution. *J. Reprod. Fert.* 98, 139-145.