

OPU 유래 한우 수정란 생산 및 이식

진종인¹ · 최병현¹ · 김성수¹ · 조현태¹ · 선두원¹ · 임현태¹ · 이정규¹ · 민찬식² · 공일근^{1,3,*}

¹경상대학교 응용생명과학부 축산학과, ²경상남도 농업기술원, ³농업생명과학연구원

Transplantation and Production of OPU Derived Hanwoo IVP Embryos

Jong-In Jin¹, Byung-Hyun Choi¹, Seong-Su Kim¹, Hyun-Tae Jo¹, Du-Won Sun¹, Hyun-Tae Lim¹,
Jung-Gyu Lee¹, Chan-Sik Min² and Il-Keun Kong^{1,3,*}

¹Department of Animal Science, Division of Applied Life Science (BK21Plus Program),
Jinju 660-701, Republic of Korea

²Gyeongsangnamdo Agriculture Research & Extension Services, Jinju 660-985, Republic of Korea

³Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

ABSTRACT

This study was carried out to establish the system of OPU derived embryo production, management of recipients as well as offspring production. OPU derived embryo production system was carried out of aspiration of immature oocytes 2 times per week, total 24 times for 3 months by an ultrasonographic guided follicular aspiration system and then produced *in vitro*-produced blastocysts by *in vitro* maturation, fertilization and culture system. This work was collected total 13,866 oocytes, average 8.2 ± 4.5 oocytes per session and 8,170 G1 + G2 grade oocytes, average 4.8 oocytes per session by 1,692 times session of total 71 donors for 4 years from 2010 to 2013. The rate of cleavage and blastocyst developmental competence were obtained 11,825 (85.3%) and 5,032 (36.3%) that was 7.0 ± 3.8 cleaved embryos and 3.0 ± 2.5 blastocysts per session. OPU derived embryo transfer were taken place in 2, 4, 6 and 7 local governments at 2010, 2011, 2012 and 2013 for 4 years and pregnancy rate were obtained 41.2, 43.9, 46.5 and 49.7% in each years. It means that pregnancy rate was continuously improved according of every year for 4 years. Pregnancy rate was significantly different according to individual local government in which was 62.7% in B, but 24.2% in F at 2012. Paternity identification was carried out total 26 offspring in C local government of 2012 and then confirmed 100% agreement of its analysis. In conclusion, the results obtained the possibility of mass production of elite cow embryos as well as offspring by OPU derived embryo production system, of which could be decreased the required time of genetic improvement.

(Key words : OPU, embryo, recipient, synchronization of estrus, pregnancy, delivery)

서 론

세계 무역시장의 FTA 체결로 무한경쟁과 지구 온난화에 따른 곡물 가격의 급등으로 축산물의 생산비 상승과 구제역 등의 질병 확산으로 생산 기반의 총체적 난관에 봉착되고 있다. 따라서 축산업에서 수입 쇠고기에 대한 경쟁력 확보 및 낙농 분야에서는 원유 생산비 절감이 유일한 대안으로 각 품종의 경제 형질에 따라 유전적 가치가 우수한 고능력우를 이용하여 집중 개량으로 고급육과 고급원유를 대량 생산하여 경쟁력을 확보할 수 있을 것이다.

현재까지 가축의 개량에 기여한 기술은 인공수정 기술이

가장 크게 기여하였다. 그러나 인공수정은 선발된 우수한 응성의 유전 능력을 이용한 개량 기술로서 개량을 완성하는데 최소 5세대 이상, 즉 최소 15~20년 이상이 소요되어 개량 속도가 상대적으로 느리다는 것과 수컷의 유전 능력만을 이용함으로써 개량의 효율적인 측면에서 한계점을 가지고 있다. 시간적 한계를 극복하기 위하여 응성과 자성의 유전자원을 동시에 활용하는 수정란 이식 방법으로서 도축 난소의 난자를 이용하는 체외 수정란 생산 방법과 호르몬 처리에 의한 과배란 처리에 의한 체내 수정란 생산 방법(Seidel, 1981; 손 등, 2000; Andrade 등, 2003, 송 등, 2012)을 보고하였다. 도축 난소 유래 수정란 생산 방법은 개량 효율 한계, 근친 위험성, 친

* 본 연구는 IPET(Grant No. 110020-5 and 112020-3) 및 농촌진흥청(Grant No. 0077572014)의 지원에 의하여 수행되었음.

† Correspondence : Il-Keun Kong (ikong7900@gmail.com).

자 감별의 한계점 등을 가지고 있다. 또한, 축산물품질평가원 축산유통종합정보센터 2013년도 한우에서 도축 출하 성적의 통계 자료(암소, 수소 및 거세우)에서 1++A(2.7%), 1++B(4.0%), 1++C(2.5%) 등급에서 총 1++는 9.2%의 성적을 보였고, 공란우의 유전적 가치를 보유한 우수한 암소는 16,486두로 전체 도축두수 대비 1.7%로서, 도축 공란우의 난소를 이용한 수정란 생산용으로 활용하는 것은 한계가 있다. 또한 과배란 처리 방법은 공란우와 증빈우의 유전적 가치를 동시에 활용함으로써 개량 효과는 매우 크지만, 생산할 수 있는 수정란의 수가 호르몬 처리 후 일정한 휴식 기간을 두고, 연속 4회 FSH 200 mg과 400 mg을 이용한 처리구에서 평균 5.48개와 4.58개(신 등, 2009), 산차별(1~2산, 3~5산 및 >6산) 및 계절별에서 평균 5.13개 및 평균 5.15개(송 등, 2012), 한우(15두) 및 젖소(12두) 27두에서 총 68개를 회수하여 평균 2.51개(김 등, 2004)로 각 연구자에 따라 연간 평균 약 20여 개 이식 가능한 수정란을 생산하여 생산 효율 측면에서 한계점이 있다.

이러한 한계점을 극복할 수 있는 새로운 수정란 생산 방법의 Ovum Pick-Up(OPU) 기법은 초음파 기구를 이용하여 살아있는 소의 난소에서 미성숙 난자를 채취하여, 이를 적정 정자와 체외 수정란을 생산하는 기술로서, 대량 생산을 위해 많은 연구자들의 연구가 이어지고 있다(Pieterse 등, 1988). FSH 처리 또는 무처리 방법의 비교(Pieterse 등, 1992; Kruip 등, 1994; Looney 등, 1994; Hasler 등, 1995), 성 성숙이 완성되지 않은 송아지를 공란우로 활용하여 세대 간격 단축(Brogliatti와 Adams, 1996; Duby 등, 1996; Presicce 등, 1997), 불임 우의 활용 가능성(Looney 등, 1994), 임신 초기우의 공란우 활용 가능성(Reinders 등, 1996; 진 등, 2011), 주 1회 또는 2회 난포란 채란으로 효율적인 채란(Hasler 등, 1995; Garcia와 Salahddine, 1998), 공란우 반복적 활용 가능 여부(Pieterse 등, 1988) 등의 다양한 방법이 시도되었다. 또한 생산된 수정란을 산업적으로 이용(Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995), 성장 단계의 미성숙 난자 채란을 위해 주 2회 연속적인 채란 방법으로 수정란 대량 생산 가능한 기간(진 등, 2010), 선발된 공란우의 각 개체별 수정란 생산 방법 (Deb 등, 2011), OPU 유래 수정란을 한우 및 젖소 대리모에 이식 후 태어난 송아지의 임신 기간과 생시 체중에 대한 분석(최 등, 2011), 젖소에서 개량의 효율성을 높이기 위한 성별 구분의 수정란 생산 방법의 개선(Jo 등, 2013) 등의 보고로 OPU 유래 수정란 생산 및 이식에서 산업화의 가능성을 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 OPU 유래 수정란 생산으로 우수한 후대의 대량 생산 가능성을 확인하고자 수년간 실시한 연구 결과를 분석하여 산업화 가능성을 확인해 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 공란우 선발

한우 공란우는 2010년부터 2013년까지 연도별 각 지역에서 선발된 공란우를 활용하였다. 공란우의 선발 조건은 3계대 이상 혈통 등록, 즉 외조모와 외조부가 등록된 개체, 한국축육 개량협회 및 지역축협에 등록된 후대 및 친형매의 도체 성적에서 A1++을 받아본 경험이 있는 개체, 외모 심사 및 초음파 진단에 의한 육질 검사를 통해 유전적 형질이 우수한 개체, 직장 검사에 의한 생식 기관의 상태와 비만도(BSC : body score condition) 점검, 질병 감염 검사를 실시하여 공란우를 선발하였다. 각 년도 별로 6두에서 35두까지 총 71두를 최종 선발하여 본 연구에 활용하였다. 살아있는 공란우의 체내에서 초음파 기구를 이용한 난자 채취는 2010년부터 2013년까지 4년 동안 공란우 71두를 이용하여 1,692회 채란을 실시하였다.

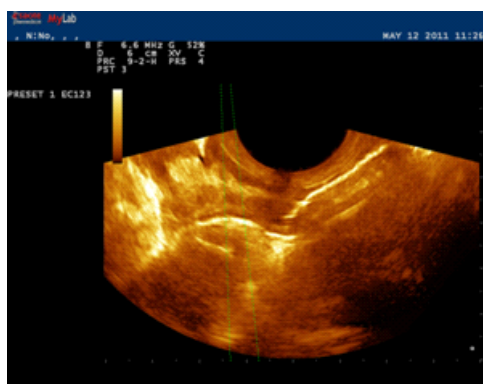
2. 난포란의 채란

최종 선발된 공란우에서 3~4개월 동안 매주 2회 OPU 방법으로 미성숙 난자를 채란하여 체외 수정으로 이식 가능한 수정란을 생산하고, 수란우에 이식 후 송아지를 생산하였다. 생체 내 미성숙 난자 채란을 위한 난포의 확인은 MyLab™30-VETGOLD(Esaote, Genova, Italy), 6.6 MHz convex scanner 탐촉자(EC123; Micro-Convex 9~3 MHz, Esaote, Genova, Italy), 미성숙 난자 흡인에는 일회용 주사침(18 G)을 사용하여 10 IU/ml Heparin이 첨가된 기본 배양액(HEPES + 10 IU Heparin)으로 주사침 및 실리콘 흡인관 내를 충전하여 채취하였다. 또한 공란우는 개조된 보정틀을 이용하여 움직임을 최소화하였으며, 채란의 원활한 진행을 위해 직장 내의 분변 제거와 미부를 고정하고, 흐르는 물을 이용하여 외음부의 오물을 세척한 다음, 20% 희석된 Povidone Iodine 및 70% alcohol로 외음부를 소독하였다. 복부 및 질벽의 긴장을 완화시키기 위해서 7 mg Xylazine HCl(Rompun, (주)바이엘)과 2% Lidocaine(주)대한)을 두당 0.3 ml와 3~4 ml를 정맥 및 미추 1번과 2번 사이에 투여하였다.

난소는 직장을 통해서 상태, 위치 등의 확인 및 견인하여 질 내에 있는 탐촉자 선단부에 밀착시켜 초음파의 Monitor 화면으로 검은 흑점으로 나타나는 난포의 상태가 뚜렷하게 보이도록 조정하여 난포의 개수를 확인하였으며, 채란 가능한 난포를 Monitor 상의 Biopsy Line이 난포를 횡 절단할 수 있도록 위치시켜 난포 외벽선이 뚜렷하도록 난소를 조작하였다. 일회용 주사침으로 Monitor Image의 난소에서 확인된 2~6 mm 크기의 난포를 흡입하였다(Fig. 1). 이때 진공 압력은 60~70 mmHg(10~15 ml/min) 음압을 유지하였다. 이와 같은 방법으로 연속하여 난포란을 흡입하며, 모니터 상에서 난포가 완전히 흡입되는 것을 확인하고, needle을 다음 난소로 이동시켜 반복적인 방법으로 채란하였다. 흡입된 난포란은 실제



(A)



(B)

Fig. 1. Image of ovum pick-up process by ultrasonograph. The image of cow ovary with several numbers of follicles is shown (A) and disappeared its image of aspirated follicle sites (B).

현미경으로 난자를 회수하였고, 난포란의 등급 분류는 세포질 색의 분포도와 난구 세포 부착 정도에 따라 평가 기준을 Grade I~IV까지 설정하여 분류하였으며, 회수된 모든 난자를 체외 성숙에 제공하였다.

3. 체외 성숙

성숙 배양액(TCM-199)에 10%(vol/vol) fetal bovine serum (FBS, Gibco), 호르몬(10 µg/ml FSH, 1 µg/ml Estradiol-17β)과 항생제 (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)를 첨가하여 18시간 이상 전배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 채취된 난자는 99% 습도, 38°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양 후 체외 수정에 공시하였다.

4. 체외 수정

체외 수정을 위한 정액 선정은 본 연구에 공시된 사단법인 한국중축개량협회 및 농촌진흥청 국립축산과학원 등에서 제공된 근친 여부 조회 및 한우 교배 계획 길라잡이 프로그램을



(A)



(B)

Fig. 2. Hanwoo calf produced by OPU scheme. (A) farm of Changnyung-gun area and (B) farm of Gyeongju livestock industry cooperative.

이용하여 공란우와 근친 여부, 혈통을 통한 자손의 능력 예측치 등을 분석하여 선정하였다. 체외 수정 배양액에 6 mg/ml BSA를 첨가하며, 항생제(100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin)을 첨가한 배양액을 5 ml 분주하고, 배양기에서 18시간 전 배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 체외 수정을 위해 한우 동결 정액 straw를 38°C에서 1분간 용해 후 10 ml 정자 세척액(D-PBS, Gibco)에 넣은 후, 1,800 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. Pellet 정자는 20 µg/ml Heparin을 넣어 배양기에서 15분간 수정능 획득을 유도하였고, 최종 농도가 1 × 10⁶ sperms/ml로 5% CO₂, 99% 습도, 38.5°C CO₂ 배양기에서 24시간 동안 체외 수정을 유도하였다.

5. 체외 배양

체외 배양은 CR1aa 배양액에 4 mg/ml BSA, 10% FBS를 첨가하여 이용하였다. 체외 수정 18~22시간 후에 3 mg/ml BSA가 첨가된 CR1aa 배양액으로 2~3회 세척한 후, 3일간 체외 배양을 실시하여 분할이 일어난 수정란만을 선발하여 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액으로 2차 체외 배양을 3일간 한 후 배반포를 생산하였다.

6. 수란우의 선발 및 발정 동기화

대리모 선발 대상 농가의 사육규모, 환경 및 조사료 위주의 사양 조건 등을 점검하여 수란우가 정상적인 발정주기를 반복하는 개체, 건강하며 내병성이 있고 임신 장애의 질환이 없는 개체, 포유 능력이 우수한 개체로써 BCS가 2.5~3.5이면서 수정 기록이 없는 개체를 대리모로 선발하였다. 발정 동기화는 이식 일정에 따라 GnRH(0일, Gonadotropin releasing hormone, Gonadon, (주)동방) → PGF₂α(7일, Lutalyse, (주)동방) → GnRH(9일, Gonadon, (주)동방) → 발정 관찰(10일) → ET(17일)의 방법으로 발정 및 수정란의 발달 단계와 동기화를 유도하여 동기화된 개체만을 대리모로 활용하였다.

7. 수정란 이식

수정란 이식은 각 지역 및 연도별 3개월에서 4개월 단위로 수정란을 생산하여 2010년부터 2013년까지 실시하여 총 2,156두에 이식하였다. 호르몬에 의해 발정 동기화된 수란우는 정상적인 발정 증상이 보이는 개체를 관찰하고, 이식 시술은 수정란 이식 전일 또는 이식 당일, 즉 발정 6~7일째에 직장 검사를 통하여 자궁 및 난소의 상태 확인, 황체의 유무 및 크기(15~25 mm)와 형태를 확인하고, 이식 가능한 수란우에 최소의 자궁 자극으로 자궁경관 경유법으로 실시하였다.

8. 친자 확인

2012년 C지역의 공란우 2두를 이용하여 2012년 10월부터 2012년 12월까지 수정란을 생산하고, 53두의 수란우에 이식하여 송아지 26두가 생산되었다. C지역은 각 년도에 생산된 송아지 전두수 친자 검정을 실시하는 지역으로써 수정란 생산에 사용된 종모우의 정자(KPN-768), 난자를 제공한 공란우와 생산된 송아지의 모근을 채취하였고, 경상대학교 학교기업(GAST) 유전자분석연구소에 13개의 MS markers(BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA23, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53, COW_ch_X, COW_Y)를 이용하여 친자 검정을 실시하였다(Table 5).

9. 통계 처리

본 실험에서 얻어진 결과들의 값은 Mean ± SD으로 표시하

였고, 그룹 간의 통계학적 분석은 SPSS package(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였으며, 유의 수준 5%에서 검증하였다. 회수된 난자의 등급, OPU 채란당 회수된 난자 수, 난자 등급, 연도별, 지역별 임신율, 생산된 산자의 성비 등은 *t*-test를 이용하여 유의성을 분석하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 연도별 OPU 유래 회수된 난포란의 등급

살아있는 공란우의 체내에서 초음파기구를 이용한 난자 채취는 2010년부터 2013년까지 4년 동안 연도별 공란우 6두에서 35두까지 총 71두를 이용하여, 1,692회 채란을 실시한 결과는 Table 1과 같다. 2010, 2011, 2012 및 2013년에 공란우 6, 8, 22 및 35두에서 106, 249, 607 및 730회 채란으로 회수된 난자는 800, 1,891, 5,827 및 5,348개, 총 13,866개를 회수하여 연도별 55.4, 47.7, 54.6 및 44.5%, 전체 평균 49.4%의 회수율을 보였고, 채란 회수당 7.5 ± 4.2, 7.6 ± 4.5, 9.6 ± 4.9 및 7.3 ± 3.7개가 회수되어 총 평균 8.2 ± 4.5개를 회수하였다. Chaubal 등(2006)은 Angus-cross를 이용하여 주 1회, 2회, >5 mm 이상 우점난포 제거 후 주 1회, 우점난포 제거 및 FSH 1회 처리 후 주 1회와 FSH 처리 후 주 2회의 다양한 방식의 채란에서 회수된 난자는 평균 4.6개, 3.9개, 5.3개, 10.6개와 4.9개의 난자를 회수하였고, 우점 난포 제거 후 FSH 처리로 매주 1회 채란군과 Garcia와 Salahddine(1998)의 육성우를 이용한 주 1회 및 2회 채란 방법의 비교(평균 5.4 및 7.7개)에서 매주 2회 채란이 본 연구의 3~4일 간격으로 주 2회 채란 방식의 결과와 유사하였으나, 그 외 처리군은 본 연구의 결과보다 낮았다. Merton 등(2003)이 발정 주기의 1일에 난포의 파동이 시작되어 3일에 4~8 mm의 난포가 성장하고, Garcia와 Salahddine(1998)의 연구에서 주 1회 채란보다 2회 채란이 난자의 품질이 우수한 것은 즉, 본 연구의 3~4일 간격에 주 2회 채란으로 성장 단계의 미성숙된 난자 채란이 가능한 것으로 사료된다. 이러한 보고는 본 연구에서 G1, G2등급 난자가 회수된 비율이 2010년에서 2013년 현재까지 77.8, 62.3, 68.3 및 44.7%, 전체 평균은 58.9%로 난자의 품질이 우수한 것으로 판단된다. 또한, 1회 채란으로 두당 G1 + G2 등급의 채취 난자 수는 2010년에서 2013년 현재까지 각각의 연도별 평균 5.9 ± 3.0, 4.7 ± 3.2, 6.6 ± 3.9 및 3.3 ± 2.7개로서, 전체 평균은 4.8 ± 3.6개의 난자를 회수한 결과는 진 등(2011)이 한우 임신 초기에 3~4일 간격으로 주 2회 채란에서 임신우가 평균 4.9개 및 비임신우는 3.7개를 회수한 결과와 유사한 결과를 보였다. 또한 Di Francesco 등(2012)의 계절별 비교 채란에서 봄과 가을이 하 등급 난자의 비율이 증가하는 보고는 본 연구의 각 연도별 G1 + G2등급 회수율의 차이가 채란 시 외기 온도 및 환경 등의

Table 1. Number and grade of follicular oocytes collected from OPU by each year

Years	No. of donors	No. of session	No. of follicle aspirated (Mean ± SD)	No. of collected oocytes (%)	Grade of oocyte (%)					Mean of per session	
					G1	G2	G1+G2	G3	G4	Mean per session	G1 + G2 (mean)
2010	6	106	1,444 (13.6±7.2)	800 (55.4)	314 (39.3)	308 (38.5)	622 (77.8)	143 (17.9)	35 (4.4)	7.5±4.2	5.9±3.0 ^b
2011	8	249	3,967 (15.9±6.4)	1,891 (47.7)	583 (30.8)	595 (31.5)	1,178 (62.3)	462 (24.4)	251 (13.3)	7.6±4.5	4.7±3.2 ^c
2012	22	607	10,665 (17.6±6.0)	5,827 (54.6)	2,556 (43.9)	1,426 (24.5)	3,982 (68.3)	1,127 (19.3)	718 (12.3)	9.6±4.9	6.6±3.9 ^a
2013	35	730	12,015 (16.5±4.4)	5,348 (44.5)	1,327 (24.8)	1,061 (19.8)	2,388 (44.7)	2,004 (37.5)	956 (17.9)	7.3±3.7	3.3±2.7 ^d
Total	71	1,692	28,091 (16.6±5.7)	13,866 (49.4)	4,780 (34.5)	3,390 (24.4)	8,170 (58.9)	3,736 (26.9)	1,960 (14.1)	8.2±4.5	4.8±3.6

^{a~d} Values with different superscripts were significantly different ($p<0.05$). (Mean ± S.D) denotes mean ± S.D per session.

영향에 따라 난자의 품질에 영향이 미치는 것으로 판단된다.

2. 연도별 OPU 유래 수정란 생산

각 연도별 OPU 유래 수정란 생산은 Table 2와 같다. 2010년에서 2013년까지 분할율은 94.1, 87.6, 87.0 및 81.2%로 평균 85.3%, 2010년 공란우 6두에서 320개, 2011년 8두에서 560개, 2012년 22두에서 1,961개 및 2013년 35두에서 2,191개로서 총 71두의 공란우에서 1,692회 채란으로 평균 3.0개, 총 5,032개, 3~4개월 동안 두당 평균 75.0개의 이식 가능한 수정란을 생산하였고, 총 회수 난자로부터 배반포 발달율은 평균 36.3%였다. 또한 G1 + G2 등급의 난자 수로부터는 61.6%의 배발달율을 보여 수정란의 질적 수준이 높은 것으로 판단된다. 이는 도축장 유래 채외 수정란의 생산 시 평균 20~30%

발달율과 비교해서 월등히 높은 발달율을 보이고 있는데, 난자의 질적 수준이 높은 것을 의미하고, 체내에서 채란된 난자를 직접 활용함으로써 난자의 질적 저하를 방지할 수 있는 것으로 판단된다. 또한, 1회/두당 채란 시 이식 가능한 수정란의 생산은 평균 3.0개로 주2회/4주/3개월로 계산하면, 약 75.0여 개의 이식 가능한 수정란을 생산할 수 있을 것이다. 이러한 생산 효율은 고능력우 1두를 이용해 약 3개월 동안에 약 70~80여 개의 수정란을 생산하여 이를 대리모에 이식할 수 있는 생산 체계를 구축하였다. 수태율을 50% 정도로 단순 계산으로 1두의 고능력 공란우로부터 약 35~40여 두의 고능력 한우 밀소를 대량 생산이 가능하므로, 개량의 효율을 극대화 할 수 있는 기술 체계로 판단된다.

과배란 처리에 의한 수정란 생산에서 김 등(2004)은 젖소

Table 2. Comparison on each year of embryo produced by OPU from Hanwoo

Years	No. of session	No. of oocytes	G1+G2	No. of blastocyst developed (Mean ± SD, %)				
				No. of cleaved	No. of per session	No. of embryos/ total oocytes	No. of embryo/G1+G2	Mean no. of per session
2010	106	800	622	753 (94.1)	7.1±3.9 ^b	320 (40.0)	320 (51.4)	3.0±2.2 ^a
2011	249	1,891	1,178	1,657 (87.6)	6.7±3.3 ^b	560 (29.6)	560 (47.5)	2.2±2.0 ^b
2012	607	5,827	3,982	5,072 (87.0)	8.4±4.2 ^a	1,961 (33.7)	1,961 (49.2)	3.2±2.8 ^a
2013	730	5,348	2,388	4,343 (81.2)	5.9±3.2 ^c	2,191 (41.0)	2,191 (91.8)	3.0±4.5 ^a
Total	1,692	13,866	8,170	11,825 (85.3)	7.0±3.8	5,032 (36.3)	5,032 (61.6)	3.0±2.5

^{a~c} Values with different superscripts were significantly different ($p<0.05$). (Mean ± S.D) denotes mean ± S.D per session.

12두에서 94개를 회수하여 평균 7.8개, 한우에서 15두에서 46개를 회수하여 평균 3.1개를 회수하여 전체 평균 5.5개를 회수하였고, 최 등(2007)은 공시 동물 88두를 이용한 4 Group에서 각각 다른 방법의 과배란 처리 방법으로 이식 가능한 수정란이 평균 3.9개, 4.3개, 4.7개 및 3.7개를 회수하였다고 보고하였다. 또한 신 등(2009)은 한우의 반복 과배란 처리에 의한 체내 수정란의 생산과 이식에서 공란우 10두에 200 또는 400 mg FSH를 이용하여 연속 4회, 평균 34일 간격으로 과배란을 처리한 결과는 1, 2, 3 및 4회에서 6.0, 6.8, 6.4 및 2.6개로 회수가 반복되므로 감소하는 현상이 보였고, 두 가지 호르몬 처리 방법에서 평균 5.48와 4.58개를 회수된 것으로 보고하였다. 또한 과배란 처리 방법은 호르몬 투여에 의한 영향으로 약 3개월의 휴식 기간이 요구되고, 그로 인하여 연간 이식 가능한 수정란을 약 20여 개를 생산할 수 있다.

3. 수정란 이식에 의한 수태율

OPU 유래 생산된 수정란을 각 연도별 및 각 group에서 선란으로 이식한 결과는 Table 3과 같다. 2010년에 총 131두 이식하여 54두 임신으로 41.2%, 2011년에 총 285두 이식하여 125두 임신으로 43.9%, 2012년에 총 529두 이식하여 246두 임신으로 46.5%, 2013년에 1,211두 이식하여 602두 임신으로 49.7%로서 4년간 총 2,156두 이식하여 1,027두 임신으로 47.6% 수태율을 얻었다.

한우에서 각각의 과배란 처리 방식으로 회수된 수정란으로 최 등(2007)은 수란우 70두에 이식한 결과, 29두가 임신되어 평균 41.4%의 수태율을 보였고, 김 등(2004)은 한우와 젖소를 이용하여 7두와 10두에 이식한 결과, 각각 3두씩 수태되어 30.0%와 42.9%, 총 17두의 수란우에서 6두가 임신되어 평균 35.3%의 수태율을 보였으며, 신 등 (2009)은 과배란 처리군 200 및 400 mg 투여군에서 생산된 한우 수정란을 젖소 수란우에 이식한 결과, 61.9와 53.8%의 수태율을 보였다. 본 연구의 OPU 방법에 의해 생산된 수정란으로 연도별(2010, 2011, 2012 및 2013년) 이식한 결과, 평균 임신율은 41.2, 43.9, 46.5 및 49.7%로서 4년 동안 2,156두의 수란우에 1,027두가 임신되어 평균 47.6%의 수태율을 보였다. 2010년 A 및 B지역에서 수태율이 52.9와 18.2%, 또한 2012년도 B 및 F지역에서 62.7과 24.2%를 얻었다. 이러한 결과는 생산된 수정란의 질(Hasler 등, 1987; Abe 등, 2004; Lopez 등, 2005; Sakagami 등, 2010), 농가별 대리모 관리 상태(Hasler 등, 1987; Sreenan과 Diskin, 1989; 박 등, 1994), 시술자의 자질(Scheider 등, 1980), 이식 시점의 환경 조건 및 주관 기관의 관리 능력 등이 복합적으로 수태율에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 특히, 이러한 현장 관련 수정란 이식 사업을 수행하면서 가장 크게 느끼고 있는 점은 주관기관의 관리 능력과 시술자의 시술 능력이 임신율

에 결정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다(Scheider 등, 1980). 따라서 OPU 방법으로 적은 두수의 공란우로부터 대량의 수정란 생산이 가능하고, 이들 수정란을 이식하여 대량의 자손이 단기간에 확보가 가능하므로 가축 개량에 적합한 수정란 생산 방법인 것으로 판단된다.

4. 친자 확인

2012년도 C지역 공란우 2두를 이용하여 OPU 방법으로 생산된 수정란을 대리모 53두에 이식한 결과는 Table 4와 같다.

Table 3. Rate of pregnancy by embryo transfer of each year and area

Years	Group	No. of ET	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)
2010	A	87	46	52.9
	B	44	8	18.2
	Sub-total	131	54	41.2
2011	A	32	18	56.3
	B	100	41	41.0
	C	92	33	35.9
	D	61	33	54.1
	Sub-total	285	125	43.9
2012	A	90	49	54.4
	B	75	47	62.7
	C	53	26	49.1
	D	140	72	51.4
	E	51	23	45.1
	F	120	29	24.2
	Sub-total	529	246	46.5
2013	A	180	78	43.3
	B	500	251	50.2
	C	84	50	59.5
	D	100	54	54.0
	E	50	21	42.0
	F	80	37	46.3
	G	217	111	51.2
	Sub-total	1,211	602	49.7
Total		2,156	1,027	47.6

Table 4. Sex ratio of calf produced by OPU scheme

Donor name	No. of embryo transferred	No. of pregnancy and birth (%)	No. of calf (%)		
			Total	Female	Male
A	26	11 (42.3)	11	5 (45.5)	6 (54.5)
B	27	15 (55.6)	15	8 (53.3)	7 (46.7)
Total	53	26 (49.1)	26	13 (50.0)	13 (50.0)

총 26두가 임신되어 평균 49.1%의 수태율을 보였고, 이들 모두가 분만하였다. 분만된 암송아지 및 수송아지 각각 13두가 태어나, 탄생된 성 비율은 각각 50%로 나타났다. 공란우 2두에서 태어난 송아지 모두를 임 등(2005)의 한우 생산 이력제의 활용 가능한 MS markers 분석 방법의 유전 진단 키트를 이용하여 수정란 생산용 공란우 및 종모우 KPN-768에서 태어난 자손을 유전자 감식으로 친자 확인을 실시한 결과는 2두(A호 및 B호)의 공란우에서 생산된 송아지 11두 및 15두, 총 26두가 100% 친자인 것으로 분석되었다(Table 5).

참 고 문 헌

Abe H, Shiku H, Aoyagi S and Hoshi H. 2004. *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J. Mamm. Ova. Res.* 21:22-30.

Andrade JC, Oliveira MA, Lima PF, Guido SI, Bartolomeu CC, Tenorio Filho F, Pina VM, Iunes-Souza TC, Pauld NR and Freitas JC. 2003. The use of steroid hormones in superovulation of Neiore donors at different stages of estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 77:117-125.

Brogliatti GM and Adams GP. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology* 45:1163-1176.

Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PEJ, Riesen JW and Tian X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65:1631-1648.

Deb GK, Jin JI, Kwon TH, Choi BH, Bang JI, Dey SR, Cho IR and Kong IK. 2011. Improved blastocyst development of single cow OPU-derived presumptive zygotes by group culture with agarose-embedded helper embryos. *Biol. Reprod.* 9:1-12.

Table 5. Gene markers of confirm blood relationship through DNA test

Classify	Result of gene analysis																										
	BM 1824		BM 2113		ETH 10		ETH 225		ETH 3		INRA 23		SPS 115		TGLA 122		TGLA 126		TGLA 227		TGLA 53		COW_ch_X		COW_Y		
	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1	a2	a1
Calf (a)*	13	13	19	21	20	22	23	24	22	24	21	23	21	23	29	29	17	20	14	22	23	32	X	X			
Donor (A)***	13	14	19	21	18	20	23	24	23	24	23	24	21	24	29	29	20	21	14	20	23	28	X	X			
Bull (KPN-768)**	13	14	19	19	19	22	23	24	22	27	20	21	23	27	25	29	17	21	15	22	23	32	X	X	Y	Y	
Calf (b)*	13	13	19	21	18	22	24	25	22	22	21	21	21	27	29	29	17	17	20	22	23	32	X	X	Y	Y	
Donor (B)***	13	13	21	21	18	18	23	25	22	22	21	22	21	21	29	34	17	17	19	20			X	X			
Bull (KPN-768)**	13	14	19	19	19	22	23	24	22	27	20	21	23	27	25	29	17	21	15	22	23	32	X	X	Y	Y	

* Small letter "a", "b" is calf birthed by OPU scheme (by transfer with embryo produced from IVF using Donor and Breeding bull).

** The KPN-768 is name of breeding bull provided for embryo production.

*** Capital "A", "B" is donor name of oocytes provided on embryo production.

- Di Francesco S, Novoa MVS, Vecchio D, Neglia G, Boccia L, Campanile G, Zicarelli L and Gasparrini B. 2012. Ovum pick-up and embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. *Theriogenology* 77:148-154.
- Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA and Robl JM. 1996. Prepubertal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology* 45:121-130.
- Garcia A and Salaheddine M. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50:575-585.
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Foote RH. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27:139-168.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, McCauley AD, Hower SA, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-159.
- Jo HT, Bang JI, Kim SS, Choi BH, Jin JI, Kim HL, Jung IS, Suh TK, Ghanem N, Wang Z and Kong IK. 2013. Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and developmental competence. *Theriogenology* 81:675-682.
- Kruip ThAM, Boni R, Roelofsen MWM, Wurth YA and Pieterse MC. 1994. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 39:251 (Abstr.).
- Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL and Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59:651-674.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cow. *Theriogenology* 41:67-72.
- Lopez AS, Larsen LH, Ramsing N, Lovendahl P, Raty M, Peippo J, Greve T and Callesen H. 2005. Respiration rates of individual bovine *in vitro*-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensors system. *Reproduction* 130:669-679.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TM and Taverne MA. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30:751-762.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip TM, Wurth YA, van Beneden TH, Willemse AH and Taverne MA. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG-treated cow. *Theriogenology* 37:273 (Abstr.).
- Presicce GA, Jiang, S, Simken M, Zhang L, Looney CR, Godke RA and Yang X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.* 56:386-392.
- Reinders JMC and Van Wagendonck-de Leeuw AM. 1996. Improvement of a moët program by addition of *in vitro* production of embryos after ovum pick up from pregnant donor heifers. *Theriogenology* 45:354.
- Sakagami N, Yamamoto T, Akiyama K, Nakazawa Y, Kojima N, Nishida K, Yokomizo S, Takagi Y, Abe H, Suzuki C and Yoshioka K. 2010. Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films. *J. Reprod. Dev.* 56:279-284.
- Seidel GE. 1981. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science* 211:351-358.
- Scheider HJ, Castleberry RS and Griffin JL. 1980. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* 13:73-85.
- Sreenan JM and Diskin MG. 1989. Effect of a unilateral or bilateral twin embryo distribution on twinning and embryo survival rate in the cow. *Biol. Reprod.* 87:657-664.
- 김용준, 송재웅, 서세현, 장구남, 김용수, 이해리, 신동수, 조성우, 김수희. 2004. 한우 및 젖소에서 과배란 처리를 이용한 체내 수정란 생산과 신선 및 동결 수정란 이식 결과. *한국수정란이식학회지* 19:209-218.
- 박무균, 상병돈, 전병순, 전기준, 한학석, 손동수. 1994. 수정란 이식에 의하여 생산된 한우의 능력에 대한 수란우의 모성 효과. *농촌진흥청축산기술연구소 축산시험연구보고서 국립종축원편*. pp. 279-285.
- 손동수, 김일화, 류일선, 연성흠, 서국현, 이동원, 최선호, 박수봉, 이충섭, 최유립, 안병석, 김준식. 2000. 젖소 MOET Scheme의 추진을 위한 수정란 생산과 이식. *한국수정란이식학회지* 15:57-65.
- 송상현, 장덕일, 민찬식, 박준규, 주영국, 이정규, 정기화. 2012. 과배란 처리된 한우의 수정란 생산에 미치는 산차와 계절의 효과. *한국수정란이식학회지* 27:127-131.
- 신상민, 김용준, 이해리, 신동수, 김용수, 김수희, 이영준. 2009. 한우의 반복 과배란 처리에 의한 체내 수정란의 생산과 이식. *한국수정란이식학회지* 24:47-56.

- 임현태, 민희식, 문원곤, 이재봉, 김재환, 조인철, 이학교, 이용욱, 이정규, 전진태. 2005. 한우 생산이력제에 활용 가능한 microsatellite의 분석과 선발. 한국동물자원과학회지 47:491-500.
- 진종인, 권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 공일근. 2010. OPU (Ovum Pick-Up) 채란기간이 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 25:15-20.
- 진종인, 권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 방재일, 김삼철, 조규완, 이정규, 공일근. 2011. 초기 임신우의 공란우 활용이 초음파 유도 난자 채취 및 수정란 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 26:19-25.
- 최병현, 진종인, 권태현, 김성수, 조현태, 공일근. 2011. 한우와 젖소 대리모가 OPU 유래 한우 송아지의 체중과 임신 기간에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 26:27-32.
- 최수호, 박용수, 손우진, 이준희, 노규진, 김주현, 최상용. 2007. FSH 투여 용량과 방법에 따른 한우의 과배란 처리 효율. 한국동물번식학회지 31:199-205.

Received September 5, 2014, Revised September 22, 2014,
Accepted September 23, 2014