

유전자 분석을 통하여 선발된 한우로부터 초음파 유래 체외수정란  
이식에 의한 고품질 한우 생산기술의 실용화  
I. DNA 검정우에서 초음파기기를 이용한 난포란의 채란에 관한 연구  
박희성 · 이지삼 · 진종인 · 박준규 · 홍승표 · 이명열 · 정장용<sup>†</sup>  
진주산업대학교 동물생명과학과

**Practical Applications of DNA Marker-Assisted Selection and OPU-Derived IVF Embryo Transfer for the Production of High Quality Meat in Hanwoo**

**I. Collection of Follicular Oocytes with Ultrasound-Guided Transvaginal Ovum Pick-Up from DNA Marker-Proved Hanwoo**

**H. S. Park, J. S. Lee, J. I. Chin, J. K. Park, S. P. Hong, M. Y. Lee and J. Y. Jung<sup>†</sup>**

*Dept. of Animal Science & Biotechnology, Chinju National University,  
Chinju 660-758, Republic of Korea*

**SUMMARY**

This study was designed to establish the superior method for IVF embryos from DNA marker-proved Hanwoo cattle. DNA markers related to marbling score were identified using DNA fingerprinting with M13 probe and restriction enzyme Hae III. Oocytes were aspirated from unstimulated, immature ovarian follicles using a combined method of rectal ovarian-palpation and transvaginal ultrasound-guidance(6.5MHz) under local abesthesia. The aspirated oocytes were washed twice with fresh D-PBS containing 5% FBS and were rewashed 4 to 5 times with TCM-199 containing 5% FBS. A morphological grade of I to IV was assigned to each oocyte. Data were analyzed using the GLM procedure of SAS.

Mean number of follicles identified on ultrasound was  $5.5 \pm 2.9$  in right and  $4.3 \pm 2.8$  in left ovaries, respectively. The highest follicles( $16.6 \pm 2.6$ ) were found in 5101 cow compared to others. Recovery rate of follicular oocytes in individual cow was highest in 5101 cow with 89.3% in  $> 2\text{mm}$  and 94.0% in  $< 2\text{mm}$  follicles. Total recovery rate was significantly( $P < 0.01$ ) higher in  $\leq 2\text{mm}$ (85.7%, 130/154) than  $> 2\text{mm}$  follicles(74.2%, 201/271). Significantly more oocytes of Grade IV were recovered from  $> 2\text{mm}$  follicles. Mean number follicles recovered was  $4.8 \pm 3.7$ ,  $3.0 \pm 3.4$  and  $0.3 \pm 0.6$  in  $< 2\text{mm}$ ,  $2 \sim 6\text{mm}$  and  $\geq 6\text{mm}$  follicles, respectively.

Our results imply that the more fertilizable oocytes can be recovered from invisible-immature follicles by the combination of simultaneous rectal ovarian-palpation and ultrasound-guided approach in Hanwoo cattle.

(Key words : DNA marker, ovum pick-up, follicle, oocyte, rectal-palpation, Hanwoo)

서 론

생명공학 기술의 발달로 가축의 수정란이식 분야에서도 다양한 축종에서 여러 가지 방법으로

\* 본 연구는 경상남도 생명공학산업화과제 연구개발비 지원에 의하여 수행되었음.

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : jychung@chinju.ac.kr

수정란의 생산과 이식이 이루어지고 있으나, 가축의 개량을 위해서는 유전적으로 우수한 수정란의 다량확보가 필수적이다. 체외수정란 생산기술의 진보는 도축장유래 체외수정란 뿐만 아니라 초음파 기기를 이용하여 체내에서 회수한 난포란으로부터 체외수정란의 생산이 가능하기에 이르렀다. 이는 유전적으로 우수한 형질을 지닌 공란우로부터 반복적 생산이 가능하므로 가축개량에 기여도가 매우 높은 기술이다(Pieterse 등, 1988).

초음파유도에 의한 체외수정란의 생산은 정상우 뿐만 아니라 임신우(Meintjes 등, 1995 ; Reinders와 van Wagtenonk-de Leeuw, 1996), 번식 장애우(Pieterse 등, 1992), 미성숙 송아지(Tervit, 1996 ; Fry 등, 1998)등에서도 난포란을 채취할 수 있으며, 고능력 가축으로부터 미성숙 난포란을 주기적으로 다량 채취할 수 있으므로 수정란이식 후 태어난 산자의 능력과 모계에 대한 혈통 및 능력을 알 수 있기 때문에 가축개량 측면에서 매우 효과적인 방법이다.

초음파유도 난포란의 채란은 무엇보다도 회수율을 개선이 이루어져야 하며, PMSG 처리(Pieterse 등, 1992), 난포의 puncture 효율개선(Gibbons 등, 1994), FSH 처리여부(Looney 등, 1994), BST (bovine somatotropin) 처리(Bols 등, 1998), transducer의 개선(Hashimoto 등, 1999) 등 여러 측면에서 연구가 수행되어져 왔다. 그러나 초음파유도 난포란의 채취는 도축장유래 난포란에 비하여 개체에 따라 회수율과 회수난포란의 등급에 대한 변이가 심하며, 고비용과 낮은 회수율, 고가의 장비 확보 및 기술적인 어려움 등으로 제한적으로 이용하고 있는 실정이다(De Roover 등, 1997). 뿐만 아니라 초음파유래 난포란의 채란은 도축장유래 난포란의 채란과는 달리 난포의 크기가 회수율과 회수란의 등급에 미치는 영향은 아직도 명확하게 밝혀진 것이 없는 실정이다(Goodhand 등, 1999; Seneda 등, 2000).

본 연구는 고품질육의 DNA marker가 검정된 한우로부터 초음파유도 난포란의 연속적 채취를 통하여 능력이 우수한 한우 수정란을 대량생산하는 방법의 확립과 이를 한우농가에 응용하고자 초음파 난자채취기를 이용하여 DNA marker가 규명

된 검정우로부터 개체별 난포수, 채취방법 및 회수한 난포란의 등급 등을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

초음파 채란용 한우는 경상남도내 인근 농가에서 사육중인 185두의 한우를 DNA 분석을 실시하여 등지방층두께, 일당증체량, 근내지방도 및 배최장근 단면적에 연관된 DNA marker를 보유하고 있는 임상적으로 건강하고 번식장애가 없으며, 정상적인 발정주기를 반복하는 한우 5두를 선발하여 본 연구에 공시하였다. 공시동물은 진주산업대학교 실험동물사육장에서 한우 사양표준에 준하여 사양관리를 하였으며, 정기적으로 질병과 건강상태 유무를 검진하면서 실험에 사용하였다. 고품질육에 대한 DNA marker의 규명은 0.5M EDTA가 포함된 주사기로 혈액을 채취하여 영남대학교 축산학과 유전학교실에서 실시하였다(Fig. 1).

### 2. 채란 기구

생체내 난포발육의 관찰과 난자채란에 사용된 기구는 동물용으로 개발되어진 SONOACE-600형 (Medison Co., 한국) 초음파기기를 사용하였으며, 탐촉자는 6.5MHz convex scanner(Medison Co., 한국)를 사용하였고, 채란에 사용된 needle은 가축용



Fig 1. DNA markers related to marbling score of Hanwoo cattle using DNA fingerprinting with M13/Hae III.

으로 개발되어진 long non-disposable needle(Cook, Australia)로써, 총 길이는 136cm, 17-gauge의 직경과 63cm iron-tubing, silicon tubing 73cm가 연결된 것을 사용하였다.

### 3. 난포 확인

초음파 채란을 위한 마취는 Bergfelt 등(1995)의 방법을 응용하여 실시하였다. 즉 xylazine hydrochloride(Rompun, Bayer, 한국)을 0.1ml/100kg 용량으로 미정맥 또는 정맥주사 후 국소마취를 위하여 2% lidocaine(Jeil chem., 한국) 2ml/100kg을 미주 1번과 2번 사이의 경막외에 주사하여 마취를 유도하였다. 마취가 도입된 소는 직장내의 변을 완전히 제거하고 외음부를 깨끗이 세척한 후 70% alcohol cotton을 이용하여 외음부를 소독하였으며, 멸균된 생리식염수로 3~4회 질 세척을 실시하였다. 난포의 확인은 탐촉자(6.5MHz; Sonovet-600; Medison, Co., 한국)와 손가락 감각을 이용하여 확인하였으며, 탐촉자를 질에 삽입하여 자궁경관입구의 질벽에 고정된 후 난소를 견인하여 난소의 크기와 난포의 수를 확인하였다. 소난포(small follicles)의 촉지는 손가락 끝부분을 약간 세워 손가락 힘을 조절하면서 촉지하였는데, 소난포가 존재하는 부위는 난소의 표면보다 약간 솟아 있거나 또는 약간 함몰되는 듯한 느낌을 감지할 수 있었으며, 난포가 존재하는 부위는 난소의 실질조직보다 탄력을 느낄 수 있었다. 이러한 방법으로 감지된 난포를 소난포로 판단하여 채란을 실시하였다. 이때 난포가 흡입되는 것은 손가락 감각에 전달되며, 또한 needle silicon-tube를 통하여 난포액이 이동되는 것을 확인하였다.

### 4. 난포란의 채란

채란은 공시된 공란우로부터 2주당 1~2회 반복채란을 실시하여 회수율과 난포란의 등급을 조사하였다.

#### 1) Monitor image 상의 난포란 채란

Needle의 준비는 난포란이 needle 내에서 유착의 방지 및 혈액의 응고방지와 흡입시 난포란의 유입이 원활히 이루어지도록 0.2% heparin과 5%

FBS가 첨가된 D-PBS(Sigma, U.S.A) 배양액을 주사침강 및 연결된 흡입관에 흡입하여 채운 후 사용하였다. 채란은 needle이 needle-guide를 통하여 monitor 상에 biopsy line이 설정된 방향으로 진입시켜 난소의 실질조직을 찌르면서 난포강으로 밀어 넣어 화면상에서의 위치와 난소내로 needle이 들어가는 감각이 전달될 때 regulated vacuum pump를 이용하여 난포강내의 난자와 난포액을 모두 흡입하였다. 즉 needle의 끝이 난포강으로 진입하는 것을 감각과 monitor image상으로 확인할 수 있었으며, 검게 나타난 난포의 부위가 monitor상에서 완전히 사라지고 주사침의 끝이 난포벽에 닿아 음압이 차단 될 때까지 계속하여 실시하였으며, 흡입시 주사침을 회전하면서 흡입하였다. 이때 사용되어진 흡입용 진공펌프(Cook, Australia)의 압력은 60~70mmHg가 유지되게 조절하였다. 연속하여 난포란을 흡입할 경우 첫 번째의 난포에 needle을 난포강에 진입한 다음 흡입 후 난포강으로부터 needle을 제거하지 않은 상태에서 다음 흡입할 난포강에 진입하여 흡입을 실시하였다.

#### 2) 손가락 감각을 이용한 난포란 채란

초음파 image상에 뚜렷하게 나타난 난포들을 모두 흡입한 다음 초음파기기의 monitor에 나타나지 않거나, 뚜렷하게 보이지 않은 난포란의 채란을 위하여 난소분을 약지와 소지사이에 끼워 난소를 고정된 후 잔존 난포들을 손가락의 감각을 이용하여 위치를 확인하였다(진 등, 2000). 그리고 needle-tip의 위치는 직장벽을 통하여 손가락 감각에 전달되는 것을 이용하여 위치를 확인하였다. 감각을 이용한 소난포의 흡입방법은 난포의 크기가 needle-tip 사각면의 길이(약 4mm)보다 작으므로 난포를 직접 흡입하는 방법을 이용할 경우에 needle-tip 이 난포를 찌름과 동시에 난포액과 난포란이 복강으로 유실될 우려가 있으므로, 이를 방지하기 위하여 needle-tip을 난포 주변의 난소실질로 찌른 다음 난포강으로 진입하여 난자와 난포액을 흡입하였다.

### 5. 난포란의 회수 및 등급분류

채란 후 즉시 난포란과 난포액이 들어 있는

conical tube(12~50ml)는 37°C로 유지하면서 실험실로 운반하여 수정란 회수용 filter(FHK, Japan)에 분주 후 5% FBS가 첨가된 D-PBS로 1~2회 세척한 후 40배 배율의 도립 현미경(Nikon, Co., Japan) 하에서 난포란을 회수하였으며, 기본배양액(TCM-199+5% FBS)을 이용하여 4~5회 세척한 후 난포란의 등급분류는 다음과 같이 분류하였다.

Grade I : 4층 이상의 난구세포층이 층만하면서 균일한 세포질을 가진 것.

Grade II : 2~3층의 난구세포층을 가진 것.

Grade III : 1층의 난구세포층을 가진 것.

Grade IV : 난구세포층이 없거나 투명대 손상이 있는 것.

## 6. 통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과들의 통계학적 분석은 SAS package의 GLM procedure를 이용하여 각 요인의 유의성 검정을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 개체별 난포 크기 및 난포수

고품질육의 DNA marker가 규명된 한우 5두에 개체별 난포의 크기를 각각 large( $\geq 6\text{mm}$ ), medium(2~6mm) 및 small follicles( $\leq 2\text{mm}$ )로 세분하여 난포의 수를 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

한우 5두의 개체별 난포수는 6, 10, 5, 4 및 11회 관찰하여 59개( $9.8 \pm 4.5$ 개), 82개( $8.2 \pm 4.8$ 개), 83개( $16.6 \pm 2.6$ 개), 50개( $12.5 \pm 0.5$ 개) 및 79개( $7.2 \pm 3.1$ 개)의 난포를 확인할 수 있었으며, 전부 36회 관찰하여 353개( $9.8 \pm 4.9$ 개)개의 난포를 확인하였다. 36회에 걸친 난소의 난포수는 오른쪽과 왼쪽이 각각 large(7 : 7개), medium(65 : 47개), small follicles(126 : 101개) 순이었으며, 전체 개수에 있어서 small(227개), medium(112개), large follicles(14개) 순으로 나타났다. 또한 오른쪽 난소의 난포수가 198개( $5.5 \pm 2.9$ 개)로서 왼쪽 난소의 난포수 155개( $4.3 \pm 2.8$ 개)보다는 높게 나타났으나, 통계적인 유의성은 없었다. 개체별 평균 난포수는 5101번 개체가 평균  $16.6 \pm 2.6$ 개로서 가장 높았으며, 반면에 8489번 개체는 평균  $7.2 \pm 3.1$ 개로서 낮았다.

Machatkova 등(2000)은 Holstein 우에서 발정주기에 따라 평균 난포수가  $13.7 \pm 1.0 \sim 11.9 \pm 2.7$ 개였으며, 공란우당 평균 large( $\geq 5\text{mm}$ ) 난포수도  $9.1 \pm 2.7 \sim 3.8 \pm 0.8$ 개로서 공란우의 조건에 따라서 많은 차이를 보였다고 하였다. Konishi 등(1996)은 일본 화우에서 large, medium 및 small follicles의 수가 각각  $1.1 \pm 0.1$ 개,  $1.7 \pm 0.2$ 개 및  $9.1 \pm 0.5$ 개로서 소난포수가 가장 많았다고 하였고, Boni 등(1997)은 Holstein 우의 난소 위치별 난포수의 조사에서 난소 당 오른쪽과 왼쪽이 각각  $7.4 \pm 3.7$ 개 및  $7.1 \pm 3.4$ 개로서 차이가 없었다고 하였다.

이상의 결과로 볼 때 난포수는 개체별, 발정주

Table 1. Number of follicles with different size by ultrasound in DNA marker-proved Hanwoo

No. of cow	No. of session	No. of follicles by size(%)								Total no. of follicles
		Large ( $\geq 6\text{ mm}$ )		Medium (2~6 mm)		Small ( $\leq 2\text{ mm}$ )		Total		
		Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	
151	6	1	0	13	5	20	20	34( $5.7 \pm 2.7$ )	25( $4.2 \pm 2.7$ )	59( $9.8 \pm 4.5$ )
157	10	2	2	13	9	33	23	48( $4.8 \pm 3.2$ )	34( $3.4 \pm 2.5$ )	82( $8.2 \pm 4.8$ )
5101	5	1	0	21	13	25	23	47( $9.4 \pm 1.9$ )	36( $7.2 \pm 2.3$ )	83( $16.6 \pm 2.6$ )
8488	4	0	0	7	13	17	13	24( $6.0 \pm 1.2$ )	26( $6.5 \pm 1.1$ )	50( $12.5 \pm 0.5$ )
8489	11	3	5	11	7	31	22	45( $4.1 \pm 1.5$ )	34( $3.1 \pm 2.2$ )	79( $7.2 \pm 3.1$ )
Total	36	7	7	65	47	126	101	198( $5.5 \pm 2.9$ ) <sup>a</sup>	155( $4.3 \pm 2.8$ ) <sup>a</sup>	353( $9.8 \pm 4.9$ )

\* Mean $\pm$ SEM

\*\* Values with the same superscripts were not significantly( $P < 0.05$ ) different.

기, 체란회수 및 연령이나 영양상태와 같은 기타 요인들에 따라서 차이가 있을 것으로 생각되며, 난포수는 본 결과에서와 같이 large follicles 보다는 medium 및 small follicles에서 많은 경향을 보였다.

## 2. 개체별 난포의 크기에 따른 난포란의 회수율 및 등급

고품질육의 DNA marker가 규명된 한우 5두에서 개체별로 >2mm(초음파 image)와 ≤2mm(손가락 촉지) 난포에서 반복 채란을 실시하여 회수한 난포란의 회수율과 등급은 Table 2에서 보는 바와 같다.

개체별 난포란의 회수율은 5101번 개체는 89.3%(>2mm) 및 94%(≤2mm)로써 가장 높게 나타났으나, 157번 개체는 각각 53.8 및 80.0%로써 가장 낮은 회수율을 보였다. 5두 전체 회수율은 ≤2mm(손가락 촉지)가 85.7%(132/154)로서 >2mm(초음파 image)의 74.2%(201/271)보다 유의적(P<0.01)으로 높게 나타났다. >2mm(초음파 image)의 난포에서 채취한 회수란의 등급은 1.0%(G I), 5.0%(G II), 31.3%(G III) 및 62.7%(G IV)로 나타났으며, ≤

2mm(손가락 촉지)의 난포로부터 채취한 회수란은 각각 2.3%(G I), 16.7%(II), 38.6%(G III) 및 42.4%(G IV)의 등급별 회수율을 보였다. 본 연구의 결과에서 G IV 난포란의 회수율은 >2mm 난포에서 현저히(P<0.01) 높았는데, 이는 난포의 크기가 클수록 난포란의 등급이 저하되는 경향과 일치하는 결과이다.

Hashimoto 등(1999)은 생우와 도축장유래 난소의 난포를 5.0MHz 및 7.5MHz 탐촉자를 이용한 난자 회수율에서 난포의 외벽선이 선명하게 보이는 것과 선명하지 않는 난포가 평균 5.0MHz에서 3.2±0.8개와 4.3±0.8개, 7.5MHz에서는 9.0±1.1개와 0.9±0.4개로 초음파 진단기의 해상도가 높을수록 난포란 채란이 용이하다고 보고하였고, 진 등(2000)은 초음파 감시하에 직장벽을 통한 손가락 감각에 의한 난소촉지법으로 초음파 monitor 상에 보이는 난포의 수보다 월등히 많은 난자를 채취할 수 있었다고 하였는데, 본 연구에서도 6.5MHz를 이용하여 난포의 외벽선이 선명하지 않은 난포는 손가락 촉지(≤2mm)를 이용하여 높은 채란율을 얻을 수 있었다. Imai 등(2000)은 탐촉자 7.5MHz

Table 2. Effect of repeated collection of follicular oocytes by ultrasound in DNA marker-proved Hanwoo

No. of cow	No. of sessions	Collection methods	No. of oocytes /follicles(%)	No. of oocytes by grade (%)			
				G I	G II	G III	G IV
151	7	T	32/ 45(71.1)	1(3.1)	1( 3.1)	13(40.7)	17(53.1)
		TR	15/ 20(75.0)	1(6.7)	1( 6.7)	8(53.3)	5(33.3)
157	10	T	28/ 52(53.8)	0(0.0)	1( 3.6)	8(28.6)	19(67.8)
		TR	24/ 30(80.0)	0(0.0)	5(20.8)	9(37.5)	10(41.7)
5101	6	T	50/ 56(89.3)	1(2.0)	2( 4.0)	17(34.0)	30(60.0)
		TR	47/ 50(94.0)	1(2.1)	5(10.7)	15(31.9)	26(55.3)
8488	5	T	60/ 65(92.3)	0(0.0)	4( 6.7)	16(26.7)	40(66.6)
		TR	26/ 28(92.9)	1(3.8)	6(23.1)	10(38.5)	9(34.6)
8489	10	T	31/ 53(58.5)	0(0.0)	2( 6.5)	9(29.0)	20(64.5)
		TR	20/ 26(76.9)	0(0.0)	5(25.0)	9(45.0)	6(30.0)
Total	38	T	201/271(74.2) <sup>a</sup>	2(1.0) <sup>a</sup>	10( 5.0) <sup>a</sup>	63(31.3) <sup>a</sup>	126(62.7) <sup>a</sup>
		TR	132/154(85.7) <sup>b</sup>	3(2.3) <sup>a</sup>	22(16.7) <sup>b</sup>	51(38.6) <sup>a</sup>	56(42.4) <sup>b</sup>

\* T : Transvaginal OPU(>2mm follicles)

TR : Transvaginal + Rectal-palpated OPU(≤2mm follicles)

\*\* Values with the different superscripts in the same column were significantly(P<0.01) different.

을 사용하여 3, 4 및 7일 간격으로 2mm 이상의 난포란 채란에서 채란의 숙련도가 높은 시술자와 낮은 시술자간의 난포 관찰에서는 평균 14.6, 18.9 및 26.9개와 18.1, 19.3 및 23.3개로 시술자의 숙련도가 난포 관찰에서는 차이 없었으나, 난자 회수율에 있어서는 시술당 평균 9.6, 15.0 및 23.6개와 7.5, 11.8 및 10.8개를 회수하여 채란자의 숙련도가 난포란의 회수율에 영향을 미친다는 보고와 같이 초음파기기를 이용한 난포란의 채란시 회수율을 높이기 위해서는 손가락으로 난포감지, needle의 크기, 난포를 찌르는 방향과 각도, 음압 및 첫 번째 난포 흡입 후 두번째 난포의 흡입방법 등이 많은 영향을 미치는 것으로 생각되며, 생체로부터 초음파 채란시 초음파 image 상에 뚜렷하지 않거나, 보이지 않는 난포로부터의 채란은 매우 어려운 기술이지만 많은 경험만 쌓으면 가능할 것으로 생각된다.

### 3. 난포 크기별 난포란의 회수율 및 등급

난포의 크기를  $\leq 2\text{mm}$ , 2~6mm 및  $\geq 6\text{mm}$ 로 각각 구분하여 반복채란을 실시하였을 때 난포란의 회수율 및 등급은 Table 3에서 보는 바와 같다.

1등급(G I) 난포란은 2~6mm 난포에서 1개(1.11%)였으며, 2등급(G II)은  $\leq 2\text{mm}$ , 2~6mm 및  $\geq 6\text{mm}$  난포에서 각각 5개(3.3%), 11개(11.7%) 및 3개(33.3%)로써  $\geq 6\text{mm}$  난포에서 가장 높게 나타났다. 3등급(G III) 난포란도 각각 43개(28.9%), 35개(37.2%) 및 5개(55.6%)로써  $\geq 6\text{mm}$  난포에서 가장 높았으나, 4등급(G IV) 난포란은  $\geq 6\text{mm}$  난포에서 1개(11.1%)로서  $\leq 2\text{mm}$  및 2~6mm 난포에서의 101개(67.8%) 및 47개(50.0%) 보다 매우 낮게

나타났다. 전체 회수된 난포란수도 4등급이 59.1%(149/252)로써 1, 2, 3등급의 0.4%(1/252), 7.6%(19/252) 및 32.9%(83/252) 보다 높게 나타났다. 1회 평균 회수된 난포란은  $\leq 2\text{mm}$  난포에서  $4.8 \pm 3.7$ 개로서 2~6mm( $3.0 \pm 3.4$ 개) 및  $\geq 6\text{mm}$ ( $0.3 \pm 0.6$ 개) 보다 높았으며, 난소 1개당 평균  $8.1 \pm 5.1$ 개의 난포란을 회수하였다.

Gibbons 등(1994)은 주당 1 및 2회 채란시 각각  $6.8 \pm 2.0$  및  $6.3 \pm 1.1$ 개, Hasler 등(1995)은  $4.9 \pm 4.5$ 개, Goodhand 등(1996)은 3.5~4.7개의 난포란을 회수하여 본 연구결과(2주에 1~2회 채란)보다는 다소 낮은 성적이었으며, Looney 등(1994)과 Bungartz 등(1995)의 1회당 6.3 및  $8.9 \pm 0.5$ 개의 회수율은 본 연구와 유사한 결과이다. 초음파유도 채취수정란 생산에 있어서 과배란 처리를 하지 않고도 주당 1회 이상 채란이 가능하며, 무엇보다도 공시 가능한 난포란을 많이 채란하는 것이 가장 중요한 관건이다. 본 연구에서 채란율은 84.0%(252/300)로 나타났으며, Garcia와 Salaheddine (1998)은 주당 1 및 2회 채란시 각각 44.2 및 45.2%, 박 등(2000)도 68%(주 1회) 및 64%(주 2회)의 회수율을 보였다고 하였는데, 초음파유도 채란시 난포란의 회수율은 시술자의 숙련도에 따라서 차이가 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 얻은 난포란중 실험에 공시할 수 있는 G III 이상의 회수율이 40.9%(103/252)로서 다른 연구자들의 83.7%(Looney 등, 1994), 77.0%(박 등, 2000), 65.2%(Bungartz 등, 1995), 52.5%(Gibbons 등, 1995)보다는 낮은 성적을 나타내었으며,  $\geq 6\text{mm}$  난포에서 회수한 난포란의 등급이 높은 것은 도축장유래 난소의 난포로부터 회수한 난포란의 등급과는 상반

Table 3. Recovery rate and grade of follicular oocytes by ultrasound-guided aspiration in DNA marker-proved Hanwoo

Follicle size	No. of sessions	No. of follicles	No. of oocytes(%)	No. of oocytes by grade (%)				No. of oocytes /session
				G I	G II	G III	G IV	
$\leq 2\text{mm}$	31	190	149(78.4)	0(0.0)	5( 3.3)	43(28.9)	101(67.8)	$4.8 \pm 3.7$
2-6mm	31	99	94(94.9)	1(1.1)	11(11.7)	35(37.2)	47(50.0)	$3.0 \pm 3.4$
$\geq 6\text{mm}$	31	11	9(81.8)	0(0.0)	3(33.3)	5(55.6)	1(11.1)	$0.3 \pm 0.6$
Total	31	300	252(84.0)	1(0.4)	19(7.6)	83(32.9)	149(59.1)	$8.1 \pm 5.1$

되는 결과이다. 이 부분에 대하여는 앞으로 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이며, 또한 연구자들에 따라서 회수율의 차이가 나는 것은 적용한 등급기준과 needle의 크기, 난포를 찌르는 방향과 각도, 음압 등의 차이가 영향을 미치는 것으로 생각된다.

## 적 요

본 연구는 고품질육의 DNA marker가 규명된 한우로부터 초음파유도 난포란의 연속적 채취를 통하여 능력이 우수한 한우 수정란을 대량생산하는 방법의 확립과 이를 한우농가에 응용하고자 초음파 난자채취기를 이용하여 등지방층두께, 일당 증체량, 근내지방도 및 배최장근 단면적에 연관된 DNA marker를 보유하고 있는 한우 5두로부터 개체별 난포수, 채취방법, 회수한 난포란의 등급 등을 조사하였다.

한우 5두의 개체별 난포수는 6, 10, 5, 4 및 11회 관찰하여 각각 59개(9.8±4.5개), 82개(8.2±4.8개), 83개(16.6±2.6개), 50개(12.5±0.5개) 및 79개(7.2±3.1개)였으며, 모두 36회에 걸쳐 관찰하였던 바 353개(9.8±4.9개)의 난포를 확인할 수 있었다. 전체 난포수는 small(227개), medium(112개), large follicles(14개) 순으로 나타났으며, 개체별 평균 난포수는 5101번 개체가 평균 16.6±2.6개로써 가장 높았다. 개체별 난포란의 회수율은 5101번 개체가 89.3%(50/56 ; >2mm) 및 94%(47/50 ; ≤2mm)로써 가장 높게 나타났으며, 5두 전체 회수율은 ≤2mm(손가락 축지)가 85.7%(132/154)로써 >2mm(초음파 image)의 74.2%(201/271)보다 유의적(P<0.01)으로 높게 나타났다. >2mm의 난포에서 채취한 회수란의 등급은 각각 1.0%(G I), 5.0%(G II), 31.3%(G III) 및 62.7%(G IV)로 나타났으며, ≤2mm의 난포로부터 채취한 회수란은 각각 2.3%(G I), 16.7%(II), 38.6%(G III) 및 42.4%(G IV)의 등급별 회수율을 보였다. 1등급(G I) 난포란은 2~6mm 난포에서 1개(1.1%)였으며, 2등급(G II)은 ≤2mm, 2-6mm 및 ≥6mm 난포에서 각각 5개(3.3%), 11개(11.7%) 및 3개(33.3%)로써 ≥6mm 난포에서 가장 높게 나타났다. 3등급(G III) 난포란도 각각 43개(28.9%), 35개(37.2%) 및 5개(55.6%)로써 ≥

6mm 난포에서 가장 높았으나, 4등급(G IV) 난포란은 ≥6mm 난포에서 1개(11.1%)로써 ≤2mm 및 2-6mm 난포에서의 101개(67.8%) 및 47개(50.0%)보다 매우 낮게 나타났다. 전체 회수 난포란수도 4등급이 59.1%(149/252)로써 1, 2, 3등급의 0.4%(1/252), 7.6%(19/252) 및 32.9%(83/252)보다 높게 나타났다. 1회 평균 회수 난포란은 ≤2mm 난포에서 4.8±3.7개로써 2-6mm(3.0±3.4개) 및 ≥6mm(0.3±0.6개)보다 높았으며, 1회당 평균 8.1±5.1개의 난포란을 회수하였다.

## 참고문헌

- Bergfelt DR, Lightfoot KC and Adams GP. 1995. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation heifers. *Theriogenology*, 42:895-907.
- Bols PEJ, Ysebaert MT, Lein A, Coryn M, Van Soom A and Kruif A. 1998. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an opu-ivf program. *Theriogenology*, 49:983-995.
- Boni R, Roelofsen MWM, Pieterse MC, Kogut J and Kruif ThAM. 1997. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, 48:277-289.
- Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D and 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*, 43:667-675.
- De Roover R, Donnay I, Kinnar T, Massip A and Dessy F. 1997. Follicular monitoring as a means to select donors for ovum pick up. *Theriogenology*, 47:154.
- Fry RC, Simpson TL and Squires TJ. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte reco-

- very from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology*, 49:1077-1082.
- Garcia A and Salaheddine M. 1998. Effect of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*, 50:575-585.
- Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE and Gwazdauskas FC. 1994. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 42:405-419.
- Gibbons JR, Krisher RL, Carlin RE, Pearson RE and Gwazdauskas FC. 1995. *In vitro* embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular oocyte aspiration. *Theriogenology*, 43:1129-1139.
- Goodhand KL, Broadbent PJ, Hutchinson JSM, Watt RG, Staines ME and Higgins LC. 1996. *In-vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production in cattle pre-treated with FSH, progestogen and estradiol. *Theriogenology*, 45:355.
- Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JSM and Broadbent PJ. 1999. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following fsh treatment. *Theriogenology*, 51:951-961.
- Hashimoto S, Takakura R, Minami N and Yamada M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: Effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. *Theriogenology*, 52:131-138.
- Hasler JF, Hendderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauly AD, Mower SA, Neely B, Shuery L, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequest calving results. *Theriogenology*, 43:141-152.
- Imai K, Kobayashi S, Tsujino T, Shin-noh M, Goto Y, Kaneyama K and Kojima T. 2000. Effect of the frequency of ovum pick-up intervals on follicle number, oocyte recovery and embryo production rates in cattle. *Theriogenology*, 53:359.
- Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T and Yazawo S. 1996. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of ivm-ivf bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, 45:573-581.
- 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 cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
- Machatkova M, Jokesova E, Horky F and Krepelova A. 2000. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology*, 54:543-550.
- Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB and Godke RA. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.*, 73:967-974.
- Pieterse MC, Kappen EA, Kruip ThAM and Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, Beneden VTH, Willemsse AM and Taverne MAM. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG-treated cows. *Theriogenology*, 37:273.
- Reinders JMC and van Wagendonk-de Leeuw AM. 1996. Improvement of a moet program by addition of *in vitro* production of embryos after



- ovum pick up from pregnant donor heifers. *Theriogenology*, 45:354.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM and Vantini R. 2000. Effect of follicular diameter on recovery, quality and developmental competence of oocytes obtained *in vivo*. In: Proceedings of the 14th International Congress of Animal Reproduction, Stockholm, Sweden, 1,p.62.
- Tervit HR, 1996. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.*, 42:227-238.
- 박성재, 양보석, 임기순, 성환후, 양병철, 장원경, 정일정, 정기화, 정기화, 심보웅, 박충생. 2000. 한우에 있어서 초음파기기를 이용한 생체내 개체별 난자 채취 빈도 및 수정란 생산효율에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 15(1):1-8.
- 진종인, 홍승표, 정자용, 이지삼, 박희성. 2000. 젖소에서 초음파기기를 이용한 난자 채취에 있어서 손가락 촉지틀 이용한 난포란의 채란. *한국수정란이식학회지*, 15(3):279-286.

---

(접수일: 2001. 9. 15/ 채택일: 2001. 11. 15)