

## OPU(Ovum Pick-Up) 채란기간이 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향

진종인<sup>1</sup>, 권태현<sup>1</sup>, 최병현<sup>1</sup>, 김성수<sup>1</sup>, 조현태<sup>1</sup>, 공일근<sup>1,2,\*</sup>  
<sup>1</sup>경상대학교 응용생명과학부 축산학전공(BK21), <sup>2</sup>농업생명과학연구소

### Effect of OPU (Ovum Pick-Up) Duration on the Rate of Collected Ova and *In Vitro* Produced Blastocyst Formation

Jong-In Jin<sup>1</sup>, Tae-Hyeon Kwon<sup>1</sup>, Byeong-Hyun Choi<sup>1</sup>, Sung-Soo Kim<sup>1</sup>, Hyun-Tae Jo<sup>1</sup> and Il-Keun Kong<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, Division of Applied Life Science (BK21 Program), Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

#### ABSTRACT

This study was performed to identify the optimal timing for oocyte donor replacement during OPU procedure. OPU was carried out to collect oocytes from every donor at an interval of 3~4 days (2 times a week). The collected oocytes were matured *in vitro* in TCM-199 supplemented with 10% FBS, 10 mg/ml of FSH and 1 mg/ml of estradiol for 24 h. After 24 h of exposure to sperm, the presumptive zygotes were cultured in CR1aa medium supplemented with 4 mg/ml of BSA for 3 days before being changed to CR1aa medium with 10% of FBS for another 3~4 days. The mean numbers of retrieved oocytes were remained constantly up to 3 months (6.0±0.5, 6.2±0.7, 5.2±0.6), but significantly decreased at over 4 to 6 months (3.7±0.5, 2.8±0.4, 1.2±0.2) ( $p<0.05$ ). The blastocyst development potential was also very similar rate from 1 to 3 months (37.2%, 40.4% and 44.6%), but significantly decreased from 4 to 6 months (24.8%, 29.3% and 28.6%, respectively) ( $p<0.05$ ). The production of OPU derived embryos in periods of 1 to 3 months (2.2±0.3, 2.5±0.3 and 2.3±0.4) were significantly higher than those in 4 to 6 months (0.9±0.2, 0.8±0.2 and 0.3±0.2, respectively) ( $p<0.05$ ). In conclusion, the efficient periods for the production of OPU derived embryos was until 4 months, twice per week to produce over 64 transferable embryos and then replace new donor after 3 months use. The best replacement time is 3 months and could be maximized production of OPU derived embryos.

(Key words : OPU, duration, bovine, oocyte, blastocyst)

#### 서 론

수정란이식은 우수한 유전 형질을 보유하는 암소로부터 다수의 수정란을 생산하여 유전 능력이 떨어지는 다른 대리모에게 이식하여 송아지를 생산함으로써 우수한 유전 형질을 가진 소를 효과적으로 증식시킬 수 있고, 형질이 동일한 여러 마리의 소를 대량 생산함으로써 능력 검정 등의 효율성을 높임으로써 소의 개량에 매우 유용하게 이용할 수 있는 기술이다(김 등 1998, 2002; 최 등 2005). 소를 대상으로 한 수정란이식은 1951년에 개복수술에 의해 수정란을 이식하여 송아지를 생산한 것이 최초로서, 우리나라의 소 수정란이식은 1979년부터 이루어진 이래로 1980년대 과배란 유기에 대한 난소의 반응, 비외과적 수정란 회수와 이식시험이 집중적으로 이루어져 왔

고, 현재까지 활발하게 이루어지고 있다. 이와 함께 체외수정란 생산 기술은 ovum pick-up(OPU), 동결, 정자 분별과 같은 보조적인 번식 기술들과 함께 낙농과 육우산업에 오랫동안 사용되어져 온 기술들이다(Brackett 등, 1982, 1989; Xu 등, 1987; Cran 등, 1993; Yang 등, 1993; Kubota 등, 1998; Pierson 등, 1999). 1980년 말 이래로, 체외생산이 뒤따르는 소의 OPU는 잘 알려진 배아 생산 기술이 되었고, 연구 분야와 상업적인 생산 체계를 만들어냈다. 국제 수정란이식학회(IETS) 통계는 체내 유래 난자에서 생산된 체외수정란이 245,000개가 2007년 세계에서 이식되고 있다고 보고되었다(Thibier 등, 2008). 이와 같은 OPU 수정란의 생산 체계의 성공과 효율은 COCs(Cumulus-Oocyte Complexes)의 양과 질 모두에 좌우된다. 예를 들면, OPU technician, OPU 보조, OPU 간격, 호르몬 처리, 그리고

\* 본 연구는 IPET (108068-03-1-SB010)의 지원에 의하여 수행되었음.

\* Correspondence : E-mail : ikong@gnu.kr

동기화 등이다(Merton 등 2003). OPU-IVP의 첫 소개 이후 배아 생산 효율을 개선시키기 위한 많은 노력들이 이루어져 왔다 (Van 등, 2000; Merton 등, 2003; Lonergan 등, 2006). 이들 모두 비유전적인 요인들에 초점을 맞추어 왔다. 몇몇 결과에서는 OPU-IVP 프로그램에서의 유전적 분석을 하였으나, 매우 제한적이었다는 점을 보고하였다(Machado 등, 2006). 서로 관련 없는 동물보다 혈연관계의 동물에서 체외수정란 생산과 OPU 결과, 번이가 적다는 보고가 있었지만 매우 제한적이었다.

현재 OPU 방법을 통한 수정란 생산 기술이 상당한 수준으로까지 향상되어 배반포기로의 발달율이 향상되었다고 하나, 필요로 하는 만큼의 배반포배의 공급을 충당할 수준까지 이른 것은 아니다. 그래서 공란우의 나이(Su 등, 2009), 체외-체내성숙에 따른 배반포 발달율(Hendriksen 등, 2000; Rizos 등, 2002), FSH 처리(Blondin 등, 1997) 등에 따라 여러 연구자들이 수행하여 보고하고 있으나, 아직 정확한 공란우의 사용기간에 대한 보고는 이루어지지 않았다. OPU 방법을 이용한 체외수정란 생산 시스템의 실용화를 위해서는 우선적으로 공란우의 효율적인 활용 방법이 확립되어야 할 것이다.

따라서 본 연구의 목적은 OPU 방법으로 체내 유래난자를 채취하여 수정란을 생산하는 과정에서 체란 기간별로 난자회수율, 난자의 등급, 배반포 발달율, 1회 채란 시 생산하는 수정란 개수를 분석하여 공란우를 효율적으로 활용할 수 있는 기간을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 공란우의 선발

한우 공란우는 농가에서 사육중인 고등등록우 중에서 후대검정을 통해 자손의 비육 출하 성적이 A1++ 등급을 획득한 경험이 있는 암소를 최우선적으로 선발하였다. 또한 직장 검사에 의한 난소와 자궁 등의 번식 기계의 상태와 비만도를 체크할 수 있는 body score, 질병 감염 등의 기록을 검토하여 최종 선발 이용하였다.

### 2. 정액의 선정

선발된 공란우를 기준으로 근친도를 고려하고 개량 방향에 맞춰 중모우를 선정하였다. 선정된 중모우 중 체외수정율 및 배발달율에 있어서도 각기 다르기 때문에 효율적인 수정란 생산을 위해서 6종류의 정액을 선정 후 최종 3종류의 정액을 선택하여 활용하였다.

### 3. 난포란의 채란

난포란의 채란은 1주일에 2회, 즉 3~4일 간격으로 실시하였으며, 방법은 다음과 같다. 공란우를 보정틀에 고정시켜 움직임 최소화 한 후 2% 리도카인 마취제를 약 3~7 ml를 경

막의 국소마취를 시키고 꼬리를 묶어 고정하였다. 이후 물로 외음부 세척을 한 후 70% 알코올과 2%로 희석된 povidone iodine으로 외음부를 소독하였다(Fig. 1). 직장 검사용 장갑으로 난소점검을 하고, 초음파 채취기를 직장 검사용 장갑으로 보호하여 질내로 삽입하고, 초음파 채취기기를 통해 난포의 개수를 확인하고, 일회용 long 주사침(19 G)를 이용하여 2~6 mm 크기의 미성숙 난자를 채취하였다. 주사침 및 흡입되는 관내에는 흡입용 배지(HEPES+10 IU Heparin)를 충전하였다. 초음파 진단기는 준비된 transducer guide 내에 장착되어 있고, guide는 질내로 삽입하여 난소의 난포를 관찰할 수 있게 고안되었다. 질벽을 통해 난소를 견인하여 transducer에 최대한 밀착시킨 후 난포를 확인하여 미성숙 난자를 채취하였다. 흡입은 vacuum pump를 작동시켜서 작업을 용이하게 하였다. 초음파 상에서 난포를 확인한 후 needle을 삽입하여 monitor 상에 needle을 횡절단할 수 있도록 위치시켰다. 질벽을 관통하여 복강 내로 들어가 난소에서 확인된 난포 내에 needle을 삽입한 후 vacuum pump의 foot switch를 작동시켜 미성숙 난자와 포함된 난포액을 흡입하여 배지에 정지시켰다.

초음파 화상에서 난포가 완전히 사라질 때까지 vacuum pump를 작동시켜 음압을 유지시켜 흡입하여 난자를 흡입하게 하였다. 2~3개의 난포 흡입 후에 배지로 세척하는 것을 모든 난포의 흡입이 끝날 때까지 반복하였다. 채취 기술에서의 핵심은 주 2회에 소량의 미성숙 난자를 채취함에 있어서 한 개의 유실 없이 채취하는 것이다. 이를 위해서 유입된 혈액과 붙는 현상을 막기 위해 배지에 10 IU Heparin을 첨가하였고 반복적으로 배지로 세척하였다.

채취된 체내 유래 난자는 세포질의 색깔과 난구세포 평가에 근거하여 Grade 1~4까지 분류하였다 (Fig. 2; Merton 등, 2003; Petyim 등, 2003; Jeong 등, 2009).

### 4. 체외성숙

성숙 배양액(TCM-199)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), 호르몬(FSH 10 mg/ml, Estradiol 1 mg/ml)과 항생제(100

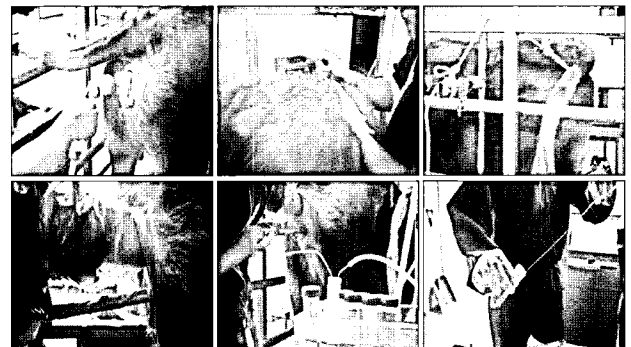


Fig. 1. Collection of *in vivo* oocytes using ultrasound-guide system.

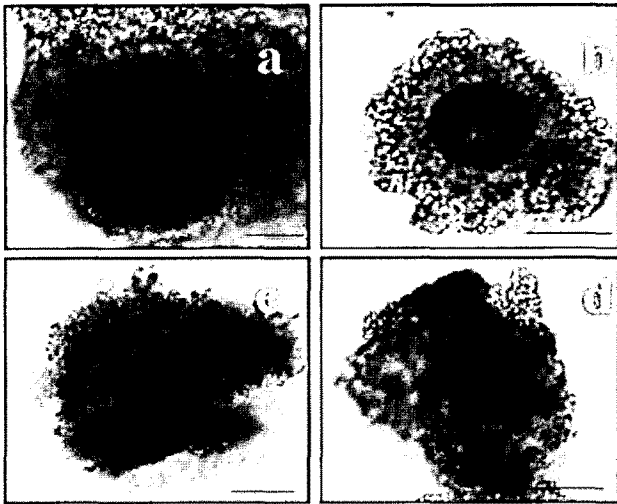


Fig. 2. Oocytes category, a) Grade 1, b) Grade 2, c) Grade 3, d) Grade 4.

U/ml penicillin G, 100 ug/ml streptomycin)을 첨가하여 체외 성숙을 유도하였고, 이와 같이 준비된 체외성숙 배양액은 18시간 이상 전배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 체외성숙은 TCM-199 배양액에 난포란을 난구세포의 충실도에 따라 Grade 1, 2, 3, 4로 구분하여 98~99% 습도, 38℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간동안 배양을 실시하여 난구세포의 팽창과 세포질의 충실도 등으로 체외성숙을 판정하여 체외수정에 공시 여부를 판단하였다.

5. 체외수정

체외수정 배양액에 6 mg/ml BSA를 첨가하고 항생제(100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin)를 첨가한 배양액을 5 ml 분주하여 배양기에서 18시간 전 배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 체외수정 시 액체질소에서 한우 동결정액 straw를 꺼내어서 38℃에서 1분간 용해 후 10 ml 정자 세척액(D-PBS, Gibco)에 넣은 후 1,800 rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 그리고 정자 펠렛을 얻은 다음 20 ug/ml heparin을 넣어 배양기에서 15분간 수정능 획득을 시킨 후 수정능이 획득된 정자의 최종 농도가 1×10<sup>6</sup> sperms/ml이 되도록 하였다. 98~99% 습도, 38℃ CO<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 난자와 같이 넣은 후 24시간 동안 체외수정을 유도하였다.

6. 체외배양

체외배양은 CR1aa 배양액에 3 mg/ml BSA, 10% FBS를 첨가하여 이용하였다. 체외수정 18~22시간 후에 3 mg/ml BSA 첨가된 CR1aa 배양액으로 2~3회 세척한 후 3일간 체외배양을 실시하여 분할이 일어난 수정란만을 선발하여 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액으로 2차 체외배양을 3일간 한 후 배반

포를 생산하였다.

7. 통계 처리

본 연구의 결과에 대한 통계분석은 실험 개체간의 결과 비교는 ANOVA를 이용하였다( $p < 0.05$ ).

결 과

1. 기간에 따른 난포 생성수

채취 기간별 난포의 생성수를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 1개월에서 5개월까지의 난포 생성수는 7.8±0.6, 9±0.7, 7.0±0.6, 7.2±0.8, 6.2±0.82개로 유의적인 차이가 없었으나( $p < 0.05$ ), 6개월째에는 2.8±0.4개로 급격하게 줄어든 것을 알 수 있었다.

2. 채란 기간에 따른 난자 회수율

채란 기간에 따른 난자 회수율은 Table 2와 같다. 채란 기간에 따른 난자 회수개수는 1개월에서 3개월까지는 6.0±0.5, 6.2±0.7, 5.2±0.6개로 유의적인 차이가 없었으나, 4개월부터 6개월까지 3.7±0.5, 2.8±0.4, 1.2±0.2개로 유의적으로 적어지는 것을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ). 난자 회수율 또한 1개월에서 3개월까지는 76.9%, 69.3%, 75.2%로 유의적인 차이가 없었으나, 4개월에서 6개월까지는 51.1%, 44.6%, 41.2%로 유의적으로 낮아지는 것을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ).

3. 채란 기간에 따른 난자 등급

채란 기간에 따른 난자 등급은 Table 3과 같다. 난자 등급은 Grade 1, 2등급 출현율이 1개월부터 3개월까지 Grade 1은 1.8±0.3, 2.2±0.3, 1.9±0.3, Grade 2는 2.1±0.3, 2.4±0.3, 2.1±0.3로 유의적으로 차이가 없었으나, 4, 5개월에는 Grade 1은 1.7±0.3, 1.1±0.3, Grade 2는 1.3±0.3, 0.7±0.2로 유의적으로 줄어들었으며( $p < 0.05$ ), 6개월에는 Grade 1은 0.3±0.1, Grade 2는 0.5±

Table 1. Effect of OPU durations on the number of follicle formation

Months	No. of session	No. of follicle (mean±SEM)
1	40	311 (7.8±0.6) <sup>a</sup>
2	54	486 (9.0±0.7) <sup>a</sup>
3	48	334 (7.0±0.6) <sup>a</sup>
4	33	237 (7.2±0.8) <sup>a</sup>
5	21	130 (6.2±0.8) <sup>a</sup>
6	12	34 (2.8±0.4) <sup>b</sup>

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

Table 2. Effect of OPU duration on the rate of oocyte collection

Months	No. of oocytes collected/ month (mean±SEM)	Percentage of oocytes collected/total follicles
1	239 (6.0±0.5) <sup>a</sup>	76.9
2	337 (6.2±0.7) <sup>a</sup>	69.3
3	251 (5.2±0.6) <sup>a</sup>	75.2
4	121 (3.7±0.5) <sup>b</sup>	51.1
5	58 (2.8±0.4) <sup>b</sup>	44.6
6	14 (1.2±0.2) <sup>c</sup>	41.2

<sup>a-c</sup> Values with different superscript were denoted significantly different ( $p<0.05$ ).

0.2로 현저히 줄어든 것을 알 수 있었다. Grade 3과 4의 출현율은 유의적으로 차이가 없었다( $p<0.05$ ).

#### 4. 체란 기간에 따른 배반포 발달율

체란 기간별 배반포 발달율은 Table 4와 같다. 1~3개월까지의 배반포 발달율은 37.2%, 40.4%, 44.6%로 높은 발달율을 보이며 차이가 없었으나, 4, 5, 6개월째에는 24.8%, 29.31%, 28.6%로 급격하게 줄어드는 것을 알 수 있었다. 1회 체란 시 수정란의 생산 개수 또한 1~3개월까지는  $2.2\pm 0.3$ ,  $2.5\pm 0.3$ ,  $2.3\pm 0.4$ 개로 유의적인 차이가 없었으나( $p<0.05$ ), 4~6개월까지는  $0.9\pm 0.2$ ,  $0.8\pm 0.2$ ,  $0.3\pm 0.2$ 개로 유의적으로 줄어드는 것을 알 수 있었다( $p<0.05$ ).

### 고 찰

본 연구는 OPU방법으로 체외수정란을 생산하여 1개월에서 6개월까지 기간별로 난포 생성수, 난자 회수율, 난자 등급

Table 4. Effect of OPU durations on the rate of blastocyst formation

Months	No. of oocytes	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of blastocysts	No. of transferable embryos (mean±SEM)
1	239	187 (78.2)	89 (37.2)	89 (2.2±0.3) <sup>a</sup>
2	337	261 (77.5)	136 (40.4)	136 (2.5±0.3) <sup>a</sup>
3	251	198 (78.9)	112 (44.6)	112 (2.3±0.4) <sup>a</sup>
4	121	81 (66.9)	30 (24.8)	30 (0.9±0.2) <sup>b</sup>
5	58	43 (74.1)	17 (29.3)	17 (0.8±0.2) <sup>b</sup>
6	14	7 (50.0)	4 (28.6)	5 (0.3±0.2) <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Values with different superscript were denoted significantly different ( $p<0.05$ ).

율, 배반포 발달율 등을 조사함으로써 효율적인 공란우의 사용과 교체 시기를 제시하고자 하였다. 난포 생성수에 대한 조사는 1개월에서 5개월까지는 차이가 없고 6개월째에 급격하게 줄어든 것으로 조사되었다(Table 1). 난자 회수개수는 1개월에서 3개월까지는 유의적 차이가 없고, 4개월에서 6개월까지 점차적으로 낮아지는 것으로 조사되었다(Table 2). 난자 등급과 배반포 발달율 또한 1개월에서 3개월까지는 차이가 없고, 4개월부터 6개월까지 점차적으로 낮아지는 것으로 조사되었다(Table 3, 4). 이러한 결과는 4개월째부터 난포의 개수가 감소하면서 난자의 회수개수가 감소하여 1회 체란 시 배반포의 생성 수가 감소하는 것으로 보여진다.

1개월에서 3개월까지의 공란우의 사용은 난포 형성수, 채취된 난자의 수, 배반포 발달율 등 유의적인 차이가 없었는데, 이는 Chaubal 등(2006)의 연구에서 1주일에 1회, 1주일에 2회, 1~5일 간격으로 OPU 방법으로 체란하여 10주까지 난

Table 3. Effect of OPU durations on the quality of collected oocytes

Mon.	No. of oocytes collected/ month (mean±SEM)	Oocytes category			
		Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
1	239	72 (1.8±0.3) <sup>a</sup>	84 (2.1±0.3)	48 (1.2±0.2)	35 (0.9±0.2)
2	337	119 (2.2±0.3) <sup>a</sup>	130 (2.4±0.3)	70 (1.3±0.2)	18 (0.3±0.1)
3	251	92 (1.9±0.3) <sup>a</sup>	99 (2.1±0.3)	39 (0.8±0.2)	21 (0.4±0.1)
4	121	57 (1.7±0.3) <sup>a</sup>	44 (1.3±0.3)	17 (0.5±0.2)	3 (0.1±0.1)
5	58	24 (1.1±0.3) <sup>b</sup>	14 (0.7±0.2)	14 (0.7±0.2)	6 (0.3±0.1)
6	14	4 (0.3±0.1) <sup>c</sup>	6 (0.5±0.2)	1 (0.1±0.1)	3 (0.3±0.2)

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

포수, 난자수, 발달율 등 조사하였으나, 1주일에 1회 채란 시 배반포 생성 수가  $0.9 \pm 0.9$ , 1주일에 2회 채란 시 배반포 생성 수가  $0.8 \pm 0.9$ 로 2가지 방법 모두 본 연구의 결과보다 낮았지만 10주까지 채란 과정에서의 유의적인 차이는 없었다는 것이 본 연구 결과와 비슷하였다.

본 연구에서는 1주일에 2회 채란하였으며, 한 달에 8회 채란을 실시하여 1개월부터 3개월까지 1회 채란 시 수정란 생산 개수는  $2.2 \pm 0.3$ ,  $2.5 \pm 0.3$ ,  $2.3 \pm 0.4$ 였다.

다른 연구에서는 FSH를 사용하여 과배란 처리법을 이용하여 1달에 1회 채란을 실시하였으며, 난포개수는  $25.0 \pm 4.5$ ,  $38.3 \pm 8.2$ 로 높았으나 난자 회수가  $3.5 \pm 1.4$ ,  $11.3 \pm 3.6$ 로 적었으며, 배반포의 생성수는  $0.3 \pm 0.5$ ,  $6.2 \pm 1.9$ 로 낮았다(Sirard 등, 1999; Roover 등, 2005). 1회 채란 시  $6.2 \pm 1.9$ 개의 수정란 생산은 본 연구보다 높은 수치이지만, 본 연구에서는 한달에 8회 채란을 하였고, 이 연구에서는 1달에 1회 채란을 실시하였다. 따라서 본 연구에서의 수정란 생산 효율이 더 높았다.

본 연구에서의 1 주일에 2회, OPU 방법으로 난자를 채란하여 수정란의 생산하는 것이 수정란의 생산 효율이 높다고 사료되며, 공란우를 보다 효과적으로 활용하기 위해서 1주일에 2회 채란하여 수정란을 생산하는 방법에서 채란 기간에 따라 생산 효율이 떨어지는 시기를 조사한 결과, 공란우를 3개월 동안 활용 후 교체하는 것이 경제적이며 효과적인 방법으로 보여진다.

## 적 요

본 연구에서는 OPU를 통한 체내 유래 난자를 이용한 수정란 생산 시 1개월에서 6개월까지의 연구 기간에 따른 난포 생성수, 난자 회수율, 난자 등급율, 배반포 생성률을 분석하여 공란우의 활용 기간에 관하여 조사하였다.

1. 채란 기간에 따른 난포 생성수는 1개월에서 5개월까지의 난포 생성수는  $7.78 \pm 0.57$ ,  $9 \pm 0.68$ ,  $6.96 \pm 0.60$ ,  $7.18 \pm 0.83$ ,  $6.19 \pm 0.82$ 개로 유의적인 차이가 없었으나, 6개월째에는  $2.83 \pm 0.39$ 개로 급격하게 줄어드는 것을 알 수 있었다.

2. 채란 기간에 따른 난자 회수개수는 1개월에서 3개월까지는  $6.0 \pm 0.5$ ,  $6.2 \pm 0.7$ ,  $5.2 \pm 0.6$ 개로 유의적인 차이가 없었으나, 4개월부터 6개월까지  $3.7 \pm 0.5$ ,  $2.8 \pm 0.4$ ,  $1.2 \pm 0.2$ 개로 유의적으로 적어지는 것을 알 수 있었다. 난자 회수율 또한 1개월에서 3개월까지는 76.9%, 69.3%, 75.2%로 유의적인 차이가 없었으나, 4개월에서 6개월까지는 51.1%, 44.6%, 41.2%로 유의적으로 낮아지는 것을 알 수 있었다.

3. 채란 기간에 따른 난자 등급은 Grade 1, 2등급 출현율이 1개월부터 3개월까지 Grade 1은  $1.8 \pm 0.3$ ,  $2.2 \pm 0.3$ ,  $1.9 \pm 0.3$ , Grade 2는  $2.1 \pm 0.3$ ,  $2.4 \pm 0.3$ ,  $2.1 \pm 0.3$ 로 유의적으로 차이가 없었으나, 4개월, 5개월에는 Grade 1은  $1.73 \pm 0.27$ ,  $1.14 \pm 0.33$ , Grade 2는

$1.33 \pm 0.28$ ,  $0.67 \pm 0.16$ 로 유의적으로 줄어들었으며, 6개월에는 Grade 1은  $0.3 \pm 0.1$ , Grade 2는  $0.5 \pm 0.2$ 로 현저히 줄어든 것을 알 수 있었다. Grade 3과 4의 출현율은 유의적으로 차이가 없었다.

4. 채란 기간에 따른 배반포 발달율은 1개월에서 3개월까지의 배반포 발달율은 37.2%, 40.4%, 44.6%로 높은 발달율을 보이며 차이가 없었으나, 4개월째에는 24.8%, 5개월째에는 29.3%, 6개월째에는 28.6%로 급격하게 줄어드는 것을 알 수 있었다. 1회 채란 시 수정란의 생산 개수 또한 1개월에서 3개월까지는  $2.2 \pm 0.3$ ,  $2.5 \pm 0.3$ ,  $2.3 \pm 0.4$ 개로 유의적인 차이가 없었으나, 4개월째부터 6개월까지는  $0.9 \pm 0.2$ ,  $0.8 \pm 0.2$ ,  $0.3 \pm 0.2$ 개로 현저히 줄어드는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 약 3개월까지는 공란우의 활용이 효율적인 점과 4개월부터는 난자 회수와 그에 따른 1회 채란 시 배반포의 생성 수 또한 점차 적으로 줄어드는 것을 알 수 있었다. 따라서, 공란우의 활용을 최대 3개월까지 활용하고, 교체한다면 3~4일 간격으로 1주일에 2회 OPU 방법으로 체내 난자를 채란 후 수정란을 생산하는 시스템은 1두에 3개월간 약 48개의 이식 가능한 수정란을 생산할 수 있고, 산술적으로 연간 1두당 약 200개의 이식 가능한 OPU 유래 수정란을 생산할 수 있을 것이다. 따라서 공란우를 3개월 활용 후 교체를 하는 것이 경제적이며 효율적인 방법이라고 사료된다.

## 참고문헌

- Blondin P, Guibault LA and Sirard MA. 1997. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology* 48:803-813.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147-158.
- Brackett BG, Younis AI and Fayer-Hosken RA. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertil. Steril.* 52:319-324.
- Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PEJ, Riesen JW, Tian X and Yang 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.
- Cran DG, Johnson LA, Miller NG, Cochrane D and Polge C. 1993. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilisation. *Vet. Rec.* 132:40-41.

- Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers MM and Dieleman SJ. 2000. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology* 53:11-20.
- Jeong WJ, Cho SJ, Lee HS, Deb GK, Lee YS, Kwon TH and Kong IK. 2009. Effect of cytoplasmic lipid content on *in vitro* developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology* 72:584-589.
- Kubota C, Yang X, Dinnyes A, Todoroki J, Yamakuchi H and Mizoshita K. 1998. *In vitro* and *in vivo* survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol. Reprod. Dev.* 51:281-286.
- Loneragan P, Fair T, Corcoran D and Evans ACO. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65:137-152.
- Machado SA, Reichenbach HD, Weppert M, Wolf E and Goncalves PB. 2006. The variability of ovum pick-up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cows. *Theriogenology* 65:573-583.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL and Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59:651-674.
- Petym S, Bage R, Hallap T, Bergqvist AS, Rodriguez-Martinez H and Larsson B. 2003. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: Effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology* 60:175-188.
- Pierson RA and Adams GP. 1999. Remote assessment of ovarian response and follicular status using visual analysis of ultrasound images. *Theriogenology* 51:47-57.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP and Loneragan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61:234-248.
- Roover RD, Genicota G, Leonarda S, Bolsb P and Dessya F. 2005. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Anim. Reprod. Sci.* 86:13-25.
- Sirard MA, Picard L, Dery M, Coenen K and Blondin P. 1999. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology* 51:699-708.
- Su L, Yang S, He X, Li X, Ma J, Wang Y and Presicce GA. 2009. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. *Reprod. Dom. Anim.* 10:1439-0531.
- Thibier M. 2008. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. *Embryo Transfer Newsletter (IETS)* 26:4-9.
- Van Wagendonck-de Leeuw AM, Mullaart E, Roos de APW, Merton JS, Den Daas JHG and de Ruigh L. 2000. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53:575-597.
- Xu KP, Greve T, Callesen H and Hyttel P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 81:501-504.
- Yang X, Jiang S and Foote RH. 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol. Reprod. Dev.* 34:94-100.
- 김덕입, 서상원, 정재경, 이규승, 서길웅, 박창식, 정영채, 박병권. 2002. 한우에 있어서 체내 수정란의 생산과 이식에 관한 연구: 한우 수정란 이식이 수태율에 미치는 요인. *한국수정란이식학회지* 17:33-44.
- 김홍률, 김덕입, 원유석, 김창근, 정영채, 이규승, 서길웅, 박창식. 1998. 한우에서 수정란 이식의 효율 증진에 관한 연구: 수정란 조건이 이식 후 수태율에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 13:53-60.
- 최선호, 류일선, 손동수, 조상래, 한만희, 김현중, 최창용, 김영근. 2005. 한우의 반복 과배란 처리 및 산차가 수정란 생산에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 20:185-190.