pISSN 1225-4991, eISSN 2288-0178
J. Emb. Trans. (2015) Vol. 30, No. 3, pp. 149～159
http://dx.doi.org/10.12750/JET.2015.30.3.149

OPU 유래 수정란의 대량생산을 위한 고능력 공란우 반복사용 가능성에 관한 연구

진종인[1,2,3] · 최병현[1,3] · 김성수[1,3] · 박번영[3] · 이정규[1,3] · 공일근[1,2,†]

[1]경상대학교 응용생명과학부(BK21 Plus) 축산학과, [2]농업생명과학연구원, [3]경남동물과학기술(GAST)

Possibility of Repeated Use of Elite Donor Cows for Mass Production of OPU-Derived Embryos

Jong-In Jin[1,2,3], Byung-Hyun Choi[1,3], Seong-Su Kim[1,3], Bun-Young Park[3], Jung-Gyu Lee[1,3] and Il-Keun Kong[1,2†]

[1]Dept. of Animal Science, Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Jinju 52828 , Korea
[2]Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
[3]Gyeongnam Animal Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

This study was designed to know the possibility in repeat uses of elite donor cows for getting mass production of OPU-derived embryo production (OPU-IVP). Ultrasound transvaginal ovum pick-up (OPU) performed in 6 Korean native cows was aged 4 to 10 years old. The aspiration of immature oocytes for OPU derived embryo was carried out 2 times per week, and OPU-IVP of 1st period was carried out 22～48 sessions from each donors. And the break time for OPU-IVP of 2nd period after 1st OPU from each donors were 2～25 months. The OPU-IVP of 2nd period each donors conducted total 15～65 times for 2～8 months by an ultrasonographic, was guided follicular aspiration system. The average numbers of collected oocytes, grade 1 + grade 2(G1+G2) oocytes and cleavage embryo from 1st period OPU-IVP were significantly differences between donors (p<0.05). Total collected oocytes of donor D were significantly higher compared with donors of A, B, C, E and F (average 17.0 per session vs. 11.2, 10.1, 8.5, 10.2 and 9.6; p<0.05) and also oocytes of G1+G2 were significantly higher compared with r A and D and subsequently to donors of B, C, E and F (average 7.9 and 8.5 per session vs. 5.0, 2.7, 6.0 and 1.6; p<0.05). Cleavage rate of donor D was significantly higher compared with donors of A, B, C, E and F (average 13.1 per session vs. 10.1, 9.1, 6.9, 8.9 and 6.7; p<0.05). The average numbers of OPU-IVP for 1st period was significantly higher from donors of B, D and E than those from donors of A, C and F (average 6.5, 7.1 and 6.5 per session vs. 3.5, 4.2 and 2.8; p<0.05). The possibility investigation of 2nd OPU-IVP was carried out after 2～25 months rest periods from 1st period OPU session. Total average numbers of collected oocytes, cleavages and blastocyst development rates were significantly higher from 1st period OPU compared with 2nd period one (p<0.05). The OPU-IVP efficiency by break for more embryo production from elite cow was analysis comparing without rest of donor A, under 6 months rest period as B and over 6 months rest period as C and then the average numbers of collected oocytes, cleavages and blastocysts were significantly higher from A group (11.8, 9.5 and 5.2 per session) than those from B and C groups (7.9, 6.2 and 2.6 vs. 9.2, 7.5 and 3.9, p<0.05), and also C group was significantly higher than B group. In conclusion, 1st period OPU-IVP was more efficient compared with 2nd period repeated uses of donor, and the break times for additional production of embryo on donor were needed more than over 6 months after 1st period OPU-IVP. This repeating uses of elite donor cows given more emphasis for getting the opportunity on mass production of elite cow OPU-IVP embryo should be increased G1+G2 possibility of genetic improvement of livestock within short period.

(Key words: OPU, embryo, synchronization of estrus, pregnancy, repeat use of donor)

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원(Grant #: IPET 315017-5)의 지원에 의하여 수행되었음.
† Correspondence : ikong7900@gmail.com

서 론

현재 FTA 체결에 의한 농축산물의 수입개방으로 국내 축산농가 및 한우산업의 경쟁력 향상을 위해 육량과 육질이 우수한 고품질 쇠고기의 대량 생산체계 개발이 어느 때보다 절박한 시점이나, 현실은 축산농가에서 한우 가임암소를 도체등급의 하락을 우려하여 2～3산 이전에 비육 출하함으로써 우량종축암소가 다산 목적으로 번식에 활용되지 못하고 있는 실정이다. 축산물품질평가원 축산물유통종합정보센터(www.ekapepia.com)의 소 도체등급판정통계 자료에 의하면 2014년도에 한우가 총 920,944두가 도축되었고, 그 중 육질과 육량이 우수한 1^{++}과 1^{++}A 등급이 87,561두와 24,447두로 9.5%와 2.7%가 매년 도축되고 있으며, 또한 1^{++} 등급 이상의 우수한 유전자를 보유하고 있으며, 수정란 생산이 가능한 암소가 연간 15,549두로 3.5%, 그 중 1^{++}A의 등급은 4,271두로 1.0%가 조기에 도태되는 실정이다. 이러한 경제적 및 유전적 가치가 우수한 암소를 종빈우로 대량개량에 활용한다면 그 효과는 극대화 될 것이다.

지금까지 한우개량을 위해 가장 많이 활용되는 번식기술은 종모축의 정액을 이용한 웅성 유전능력만을 활용하는 체계로써 개량을 위해 최소 5세대 이상, 즉 15～20년 이상의 시간이 소요되므로 개량의 효율적인 측면에서 그 한계점을 가지고 있었다. 그 대안으로 아비와 어미의 유전자를 결합시킨 수정란을 대리모에 이식하는 수정란이식 기술이 개발되었다. 그러나 수정란의 생산방법에서 도축된 난소의 난자 활용은 하나 또는 두개 이상의 수정란 이식으로 가축의 수량 확대를 위한 방법에서 장점이 있으나, 태어나는 자손의 성비가 다른 경우의 freemartin 부작용, 모체에 대한 정보의 부재로 혈통보존부분에서 유전적 가치의 효율성과 개량을 위한 활용도 측면에서도 선 세대에 대한 정보부재로 후 세대에 대한 유전적 가치의 전달능력 예상이 불가능하고, 근친의 위험성이 항상 상존하고 있다.

근친의 위험성, 친자에 대한 한계점 등을 극복하기 위한 방법으로 근래에 과배란 처리에 의한 수정란의 생산방법(Seidel, 1981; Andrade 등, 2003; Moreira 등, 2002; 손 등, 2000; 송 등, 2012)은 선 세대의 정확한 정보로 후대에 대한 정보는 정확하나, 수정란의 생산량이 1회당 평균 5개 정도로 우량가축의 대량개량을 위해 수정란을 생산하기 위한 방법으로는 한계가 있으며, 그것으로 인하여 수정란의 대량생산을 위해서는 유전적 가치가 우수한 공란우의 선발강도가 낮아진다. 또한 호르몬 과다 투여에 의한 일정한 휴식기간이 필요하고, 연간 3～4회 정도 수정란 생산이 가능하므로 이식 가능한 수정란은 연간 20여개 생산되고 있는 실정이다. 따라서 가축의 대량개량을 위한 수정란의 대량생산 측면에서 그 효율성의 한계가 있으며(김 등, 2004; 신 등, 2009), 또한 연속 반복생산을 위한 호르몬 투여는 생식기능 저하 등의 부작용으로 추가 반복사용이 불가능하다. 이러한 한계점을 극복하기 위해 새로운 수정란 생산방법의 Ovum pick-up(OPU) 기법은 사람의 불임클리닉에 활용하는 초음파기구를 개조 제작하여 살아있는 가축의 난소에서 미성숙된 난자를 채취하여 이를 체외에서 성숙(*in vitro* matura- tion), 후대의 유전능력치 최대 개선을 위해 공시된 공란우와 가장 적합한 종모축의 정자를 이용한 수정(*in vitro* fertilization)과 배양(*in vitro* culture)의 수정란을 생산하는 기법이 Pieterse 등(1988)에 의해 소개되었다.

수정란 생산의 효율성을 높이기 위해 FSH 호르몬을 이용한 과자극 및 무 처리에 의한 난포란 회수법(Pieterse 등, 1992; De Roover 등, 2005, 2008; Chaubal 등, 2007), 일반 생식기능 저하와 다리골절 등에 의한 불임 개체의 활용 가능성(Looney 등, 1994), 유전적 가치가 우수한 개체의 수정란 생산량 증대를 위한 임신 초기의 공란우 활용 가능성(Aller 등, 2012; 진 등, 2011), 주 1회 또는 2회 채란에 의한 효율적인 채란방법(Hasler 등, 1995; Garcia과 Salahddine, 1998; Chaubal 등, 2006, De Roover 등, 2008)의 개선, 채란 시 외부환경의 변화 및 난포란 채란에 따라 난자 품질과 수정란 생산에 미치는 영향 등을 조사하였고(Merton 등, 2003; Roth와 Hansen, 2004; 김 등, 2014), 3～4일 간격의 매주 2회 채란으로 OPU 유래 수정란 생산 및 이식으로 가축개량의 산업화를 위한 수정란의 적정 생산기간이 3～4개월 정도이며(진 등, 2011), 또한 OPU 유래 생산된 수정란을 이식하여 분만된 송아지와 공여된 공란우 간의 친자 확인(진 등, 2014) 등의 각 연구진들에 의해 OPU 유래 수정란 대량생산, 개량체계의 산업화 및 수정란의 생산효율을 높이기 위해 다양하게 연구가 진행되었다(Mapletoft와 Hasler, 2005; Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006; Pontes 등, 2011).

따라서 본 연구는 OPU 유래 수정란 생산 system을 이용하여 개량가축의 대량생산에 필요한 수정란의 대량생산을 위한 Elite cow의 반복 활용을 위해 첫 번째 채란기간의 난포란 채란에 의한 외래상처가 적절한 휴식으로 생식기능의 회복 가능한 시간과 보다 효율적인 수정란 생산을 위한 두 번째 채란기간과 수정란 생산으로 공란우의 반복사용 가능성 및 OPU-IVP 체계가 가축개량에 필요한 수정란의 대량생산으로 산업화 활용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공란우 선발

한우 공란우의 선발은 각 지역의 축산업협동조합 및 사단법인 한국종축개량협회(www.aiak.or.kr)의 자료를 기초로 외조부, 외조모가 등록된 3계대 이상의 혈통 및 고등등록, 후대에

게 물려줄 수 있는 예상유전 전달능력(EPD; Expected Progeny Difference), 후대 및 형매의 도축 출하된 성적 등의 자료를 비교분석하여 체형에 관련된 외모심사 및 초음파 진단기에 의한 육질검사 등을 통하여 개체의 경제형질이 우수하다고 판정된 개체를 직장검사를 통해 생식기관의 상태와 비만도(BSC; body score condition)를 점검하였다.

또한 가축의 이동에 관련한 법적인 질병감염(구제역 황체 형성, 브루셀라, 요네병, 결핵) 여부 등의 검사를 실시하여 4～10세 연령의 공란우를 선발하였다. 두 번째 기간의 수정란 생산용 공란우는 짧은 기간의 공태상태(휴식기간)에서 휴식, 첫 번째 기간의 수정란 생산 후 인공수정으로 자우생산, 인공수정에 의한 초기 임신상태에서 약 4개월 동안 채란 후 임신 후반의 휴식 및 분만에 의한 각각의 휴식 등으로 첫 번째 채란 기간 수정란 생산에 이용된 공란우의 반복사용을 위해 초기 공란우 선발의 조건과 동일하게 전염성 질병 감염 여부를 확인하여 공란우로 다시 사용하였다.

2. 난포란의 채란

최종 선발된 공란우에서 첫 번째 수정란 기간의 채란은 각각 11～24주(22회～48회)까지 실시하였고, 두 번째 OPU-IVP 채란을 위해 2～6개월 동안 공태상태, 채란 후 인공수정으로 임신에 의한 분만 또는 임신초기 채란과 분만 등 각각의 적절한 휴식으로 두 번째 기간의 채란은 각각의 공란우에서 2～7개월 동안 전과 동일하게 3～4일 간격으로 매주 2회씩 OPU 방식으로 수정란 생산을 위해 채란을 실시하였다(진 등, 2011; 최 등, 2011).

생체 내 난포란의 관찰은 MyLab^{TM}30VETGOLD(Esaote, Genova, ITALY) 및 탐촉자(EC123; Micro-Convex 9～3 MHz, Esaote, Genova, ITALY)는 6.6 MHz convex scanner를 사용하였고, 미성숙 난자 흡인에 일회용 주사침(18 G)을 사용하였다(Bungartz 등, 1995; Bols 등, 1996). 흡인용 배양액은 10 IU/ml Heparin이 첨가된 기본배양액(HEPES + 10 IU Heparin)으로 난자의 유착과 원활한 흡입을 위해 주사침과 실리콘 흡입관 내를 도포 및 충전하였다. 또한 공란우는 개조된 보정틀을 이용하여 움직임을 최소화하였고, 복부 및 질벽의 긴장 완화를 위해 7 mg Xylazine HCl(Rompun, ㈜바이엘)과 2% Lidocaine (㈜대한)을 두당 0.3 ml와 3～4 ml를 각각 미 정맥 및 미추 1번과 2번 사이에 투여하였다(이 등, 1998).

난포 관찰은 난소를 견인하여 질 내에 고정된 탐촉자 선단부에 밀착하여 Monitor에 전달되는 난포를 확인하였고, 채란 가능한 난포는 Monitor의 Biopsy Line에 횡/절단시켜 난포의 외각선이 뚜렷하게 관찰되도록 조정 및 고정하였다. Monitor Image에 고정된 2 mm 이상의 난포를 일회용 주사침(18 G)을 이용하여 난포란 흡입으로 난포의 수량을 확인하였다. 이때 사용된 진공 음압은 50～70 mm Hg(10～15 ml/min)의 압력으로 채란 완료까지 진행 및 유지하였다. 여기에서 중점사항은 발달과정의 미성숙 난자를 유실없이 채취하는 것과 채란과정에서 유입된 혈액과 미성숙 난포란(Cumulus Oocyte Complexs: COCs)의 유착을 방지하기 위해 10 IU Heparin을 첨가하는 것이다. 이러한 과정을 공란우마다 3～4일 간격으로 매주 2회 반복 및 연속적으로 실시하였다.

흡입된 난포란은 2～3회 washing으로 혈액 등의 이물질을 제거하여 실체현미경 하에서 회수하였고, 난자의 등급분류는 세포질의 분포도와 난구세포 부착 정도에 따라 평가기준을 Grade Ⅰ～Ⅳ까지 설정하여 분류하였다(Merton 등, 2003; Petyim 등, 2003). 회수된 모든 난자를 각 공란우별 각각의 체외성숙용 배지에 제공하였다.

3. 체외성숙

체외성숙은 Deb 등(2011)의 방법으로 성숙배양액(TCM-199)에 10%(vol/vol)의 fetal bovine serum(FBS, Gibco), 10 mg/ml의 FSH(follicle stimulation hormone, Sigma), 1 mg/ml의 Estradiol (Sigma)과 항생제(100 IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin)를 첨가된 체외성숙용 배양액은 배양기에서 4～5시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 각 공란우에서 회수된 난자는 98～99% 습도, 38℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간동안 배양으로 성숙을 유도하였고, 난구세포의 팽창과 세포질의 충실도 등으로 체외성숙을 판정하여 체외수정에 공시하였다.

4. 체외수정

OPU 유래 체외수정란 생산용 정액 선정은 본 연구에 선발된 한우 공란우를 사단법인 한국종축개량협회 및 농촌진흥청 국립축산과학원 등에서 제공된 근친도 확인 및 계획교배 프로그램을 이용하여 근친 여부와 후대의 예상능력치 등을 확인 및 분석으로 개량의 효율을 극대화를 위해 각각의 공란우와 적합한 국내에서 생산되고 있는 KPN(Korean Proven Bull No) 정액을 선정하였고, 체외수정은 공란우에 따라 개체별 실시하였다. 체외수정 배양액에 6 mg/ml의 BSA를 첨가하고, 100 IU/ml의 penicillin, 100 μg/ml의 streptomycin 항생제가 첨가된 배양액을 배양기에서 4～5시간 전 배양을 실시하여 평형을 유도하였다.

동결정액 straw를 38℃의 온수에서 1분간 융해 후 10 ml 정자 세척액(D-PBS, Gibco)에 넣은 후 1,800 × rpm에서 5분간 원심분리를 실시하였다. Pellet 형태의 정자는 20 μg/ml Heparin이 첨가된 배양액으로 배양기에서 15분간 수정능획득을 유도하였고, 수정능력 획득된 정자는 1～2 × 10^6 sperms/ml가 되도록 최종농도를 조정한 후 98～99% 습도, 38℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 체외수정을 유도하였다.

5. 체외배양

각 공란우에서 회수된 난자의 성숙과 수정 후 체외배양은 CR1aa 배양액(Rosenkrans 등, 1993)에 3 mg/ml BSA와 10% FBS를 첨가하여 이용하였다. 체외수정 18～22시간 후에 3 mg/ml BSA 첨가된 CR1aa 배양액으로 2～3회 세척한 후 3일간 체외배양을 실시하고, 분할된 수정란을 선발하여 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액으로 3일간 2차 체외배양으로 배반포를 생산하였다.

6. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과들의 값은 Mean±SE으로 표시하였고, 개체별, 그룹 간의 통계학적 분석은 SPSS 19.0 for Window package(Statistical Package for Social Science, SPSS Ince, Chicago, IL, USA)를 이용하였으며, 유의적 수준은 5%에서 검증하였다. 각 공란우에서 채란 당 관찰 및 흡입된 난포의 수, 회수된 난자의 수, 첫 번째 및 휴식기간에 따른 두 번째 기간의 수정란 평균 생산량 등은 ANOVA를 이용하여 유의성을 분석하였다(p<0.05).

결과 및 고찰

1. 첫 번째 채란기간의 공란우별 수정란 생산효율 비교

공란우 6두에서 매주 2회 각각 22～48회 채란으로 첫 번째 채란기간의 각 공란우에 따른 수정란 생산은 Table 1과 같다.

각 지역에서 공란우의 선발조건에 따라 냉도체중, 배최장근단면적, 등지방 두께 및 육질 등의 형질 개량용으로 선발된 한우 A, B, C, D, E 및 F에서 26, 25, 22, 48, 25 및 40회 난포란 채란으로 회수된 난자는 총 188에서 816개를 각각 48.6～64.7%의 회수율을 보였으며, 각 공란우에서 횟수 당 평균 11.2±0.6, 10.1±0.5, 8.5±0.9, 17.0±0.9, 10.2±0.7 및 9.6±0.6개의 난자를 회수하여 각 개체 간 회수된 난자의 평균은 D 공란우(17.0±0.9)가 유의적으로 높았다(p<0.05). 회수된 G1+G2 등급의 난자는 A와 D(7.9±0.6와 8.5±0.7)의 공란우가 B, E보다, C, F(5.0±0.5, 6.0±0.5 vs. 2.7±0.3, 1.6±0.3)의 공란우보다 유의적으로 높았다(p<0.05). 또한 배반포로 형성된 수정란은 각 공란우에 따라 총 92～341개를 생산하여 횟수 당 평균은 A, C 및 F(3.5±0.5, 4.2±0.5 및 2.8±0.4개)보다 B, D 및 E(6.5±0.6, 7.1±0.6 및 6.5±0.5개)의 공란우가 유의적으로 높았다(p<0.05). 그러나 각각의 공란우에서 회수된 난자의 평균수량이 D 개체를 제외한 그 외 공란우는 비슷하였으나, 수정란의 평균 생산량과 생산비율(각각 28.8～64.4%)은 각각 다르게 나타났다.

동일한 방법으로 수정란 생산을 위해 각 공란우에서 채란 시 성장되는 난포, 회수된 난자의 품질 및 수량, 수정란의 분할 및 배반포까지 발달되는 수량이 다르게 나타난다. 이것은 각 지

Table 1. Comparison of produced embryos quantity of each donors on primary OPU-IVP

Name of donor	No. of session	No. of follicle aspirated (Mean±SE)	No. of collected oocytes (Mean±SE, %)	No. of oocytes (Mean±SE, %)					No. of cleavage (Mean±SE, %)	No. of blastocysts (Mean±SE, %)
				G1	G2	G1+G2	G3	G4		
A	26	529 (20.3±0.4)^{b}	292 (11.2±0.6^{b}, 55.2)	146 (50.0)	60 (20.5)	206 (7.9±0.6^{a}, 70.5)	57 (19.5)	29 (9.9)	262 (10.1±0.6^{b}, 89.7)	92 (3.5±0.5^{b}, 31.5)
B	25	457 (18.3±0.4)^{b}	253 (10.1±0.5^{b}, 55.4)	78 (30.8)	46 (18.2)	124 (5.0±0.5^{b}, 49.0)	103 (40.7)	26 (10.3)	227 (9.1±0.5^{b}, 89.7)	163 (6.5±0.6^{a}, 64.4)
C	22	387 (17.6±0.8)^{b}	188 (8.5±0.9^{b}, 48.6)	27 (14.4)	32 (17.0)	59 (2.7±0.3^{c}, 31.4)	97 (51.6)	32 (17.0)	151 (6.9±0.8^{c}, 80.3)	93 (4.2±0.5^{b}, 49.5)
D	48	1,262 (26.3±1.0)^{a}	816 (17.0±0.9^{a}, 64.7)	192 (23.5)	216 (26.5)	408 (8.5±0.7^{a}, 50.0)	219 (26.8)	189 (23.2)	630 (13.1±0.7^{a}, 77.2)	341 (7.1±0.6^{a}, 41.8)
E	25	476 (19.0±0.4)^{b}	255 (10.2±0.7^{b}, 53.6)	85 (33.3)	64 (25.1)	149 (6.0±0.5^{b}, 58.4)	83 (32.5)	23 (9.0)	223 (8.9±0.6^{b}, 87.5)	162 (6.5±0.5^{a}, 63.5)
F	40	770 (19.3±0.4)^{b}	385 (9.6±0.6^{b}, 50.0)	27 (7.0)	38 (9.9)	65 (1.6±0.3^{c}, 16.9)	206 (53.5)	114 (29.6)	266 (6.7±0.5^{c}, 69.1)	111 (2.8±0.4^{b}, 28.8)
Total	186	3,881 (20.9±0.4)	2,189 (11.8±0.4, 56.4)	555 (25.4)	456 (20.8)	1,011 (5.4±0.3, 46.2)	765 (34.9)	413 (18.9)	1,759 (9.5±0.3, 80.4)	962 (5.2±0.3, 43.9)

$^{a\sim c}$ Values with different superscripts were significantly different (p<0.05).

(Mean±S.E.) denotes mean±S.E per session.

OPU (ovum pick up) period of each donors : A; 13 weeks, B; 12.5 weeks, C; 11 weeks, D; 24 weeks, E; 12.5 weeks, F; 20 weeks.

역에서 선발된 공란우가 성장단계에 각기 다른 사양관리 및 환경조건 등이 생식기능 발달에 미치는 영향 등으로 한 발정주기에 연속적으로 난포의 성장, 퇴화 및 배란 기전 흐름의 부재로 인하여 미성숙된 난자의 성장 부족 등으로 채란 시 회수되는 난자의 품질 및 수량과 비율에 따라 이식가능한 수정란의 생산량과 비율이 다른 것으로 판단된다.

Merton 등(2003)이 소에서 1회 발정주기에 2～3번의 난포파동으로 난포가 성장과 폐쇄가 연속 진행되고, 발정과 배란의 3일째에 4～8 mm의 난포가 성장하고, Garcia와 Salahddine (1998)는 매주 1회 채란보다 2회 채란된 난자의 품질이 우수한 것은 성숙단계에 있는 미성숙된 난자의 채란이 가능한 것으로 판단된다. 이러한 사항은 본 연구의 3～4일 간격에 매주 2회 채란이 미성숙 난자, 즉 성장과 발달단계의 난포란 채란과 난자 회수가 가능한 것으로 판단된다. 진 등(2014)은 4년 동안 공란우 71두를 이용하여 매주 2회 1,692회 채란으로 공시된 총 13,866개의 난자에서 총 5,032개, 회수 당 평균 3.0개 및 36.3%의 수정란을 생산하였고, G1+G2 등급의 난자에서 생산된 수정란의 비율이 61.6%가 보여, 도축장 유래 체외수정란 생산보다 높은 발달율을 보이는 것은 도축 및 수송시간 등에 따른 난자의 품질 저하 등으로 OPU 체계의 수정란 생산효율에 미치지 못하는 것으로 판단된다. 또한 본 연구의 공란우 6두를 이용하여 첫 번째 기간의 OPU 유래 생산된 수정란은 각각 3～6개월 동안 두당 평균 160개의 수정란을 생산한 것은 Elite cow의 공란우 1두에서 수태율 50%를 가정하여 80두 이상의 자손을 대량생산이 가능한 것을 의미한다.

Chaubal 등(2006)은 젖소 교잡종(Angus cross) 공란우에서 OPU-IVP system을 이용하여 난자 및 수정란 생산효율을 증가시키기 위해 다양한 호르몬 처리(CIDR+FSH+LH, CIDR+FSH, FSH+LH 및 FSH)군에서 FSH+LH 처리군이 7일에 25.8%(평균 2.89개)와 8일에 31.2%(평균 3.44개)의 배반포가 형성되었으나, 호르몬을 이용한 과자극에 따른 부작용 등으로 인공수정 등과 같은 번식의 추가 활용 측면에서 공란우의 재 사용기간이 감소할 것으로 판단된다.

De Roover 등(2008)은 OPU 유래 효율적인 수정란 생산방법에서 매주 2회 OPU-IVF는 회당 평균 0.7개, 자극에서 2주마다 1회 OPU-IVF는 평균 3.4개, 최고 수정란 생산 군에서 1996년에서 199년까지의 기간의 2주 기간 당 및 1999년에서 2003년까지의 기간에 호르몬을 이용하여 FSH 자극된 5두에서 34회 및 49회 채란으로 평균 6.9개 및 6.4개, Merton 등(2013)은 OPU 유래 수정란 생산효율을 높이기 위해 아미노산의 일종의 cysteamine을 첨가 및 무첨가군에서 1.73개 및 1.06개의 수정란을 생산한 보고는 본 연구의 매주 2회 채란으로 개체별 평균 2.8～7.1개 및 전체 평균 5.2개의 생산은 품종의 종류, 개체간의 차이, 배양 기법 및 채란 기술 등에 따라 영향이 있는 것으로 사료된다. 그러나 De Roover 등(2008)은 매주 2회 채란에서 평균 57%의 난자 회수율은 본 연구와 유사하였다.

2. 공란우 반복사용에서 휴식시간이 수정란 생산에 미치는 영향

유전적 가치가 우수한 공란우의 수정란 및 자우를 보다 많이 생산하기 위한 공란우 반복사용 가능성 조사를 위해 첫 번째 채란기간의 수정란을 생산한 다음, 인공수정으로 두 번의 송아지를 생산한 공란우, 임신초기 약 3개월 동안 채란 후 분만을 위한 생식기능의 휴식 및 채란 후 공태상태에서 일정한 휴식으로 두 번째 채란을 위해 각 공란우에서 첫 번째 기간의 채란과 동일방법으로 매주 2회 총 15～65회 반복사용에 활용한 결과는 Table 2와 같다. 각각의 휴식으로 회수된 난자가 10개월 휴식의 A개체는 29회 채란으로 평균 10.9±0.8개, 2개월 휴식의 B개체는 평균 5.2±0.4개, 임신초기 약 3개월 채란 후 분만을 위한 7개월 휴식의 C개체는 8.9±0.5개, 첫 번째 기간의 채란 후 인공수정으로 2번의 분만으로 25개월 휴식의 D개체는 평균 12.6±1.3개, 3개월 휴식의 E개체는 평균 6.6±0.5개, 6개월 휴식의 F개체는 평균 9.9±0.5개를 회수하여 첫 번째 수정란의 생산기간보다 A, C 및 F개체를 제외한 모든 개체에서 회수된 난자의 평균수는 감소하였다.

또한 휴식에 의한 공란우의 반복사용에서 회수된 난자의 평균수는 휴식시간이 짧은 개체(B와 E)보다 휴식시간이 긴 개체(A와 D)가 유의적으로 높았다(p<0.05). 보다 많은 수정란 생산을 위한 각각의 휴식기간으로 두 번째 수정란 생산기간에서 배반포까지 발달된 수정란의 평균수는 3.1±0.4개, 1.7±0.4개, 4.3±0.4개, 4.7±1.0개, 2.9±0.4개 및 2.9±0.4개로 짧은 휴식의 개체(B, E 및 F)가 유의적으로 감소하였다(p<0.05). 그러나 회수된 난자의 비율은 첫 번째와 두 번째의 채란기간에서 개체에 따라 48.6～64.7%와 44.1～55.7%, 수정란 생산 비율에서도 28.8～64.4%와 28.1～48.0%로 동일한 조건의 수정란 생산방법에서 각 개체에 따라 다르게 나타났다. 이러한 결과는 각 개체의 성격, 연속적인 채란기간에 대한 stress, 환경적 조건, 휴식시간의 기간 등이 회수되는 난자의 수와 수정란 생산에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

첫 번째와 두 번째의 OPU-IVP에 대한 비교분석은 Table 3과 같다. 즉, 휴식 전과 후에서 총 186회와 212회 채란으로 평균 20.9±0.4개와 17.6±0.3개의 난포란를 흡입하여 회수된 난자는 평균 11.8±0.4개와 9.0±0.3개, 수정란으로 분할되는 평균수는 9.5±0.3개와 7.1±0.3개, 배반포 형성은 5.2±0.3개와 3.3±0.2개로 난포란 흡입에서 수정란의 생산까지 각각의 단계에서 휴식 전(첫 번째 OPU-IVP)이 유의적으로 높았다(p<0.05). 그러나 첫 번째와 두 번째 수정란 생산기간의 난자 회수율(56.4%와 51.0%), 분할율(80.4%와 79.4%) 및 배반포까지 형성되는 비율(43.9%와 37.3%)은 각 단계에서 유사하였고, 또한 두 번째

Table 2. Comparison of produced embryos quantity of each donors on secondary OPU-IVP through each rest time

Name of donor	No. of session	No. of follicle aspirated (Mean±SE)	No. of collected oocytes (Mean±SE, %)	No. of oocytes (Mean±SE, %)					No. of cleavage (Mean±SE, %)	No. of blastocysts (Mean±SE, %)
				G1	G2	G1+G2	G3	G4		
A	29	613 (21.1±0.3)^{a}	317 (10.9±0.8^{ab}, 51.7)	41 (12.9)	54 (17.0)	95 (3.3±0.5^{b}, 30.0)	137 (43.2)	85 (26.8)	232 (8.0±0.6^{b}, 73.2)	89 (3.1±0.4^{bc}, 28.1)
B	22	261 (11.9±0.6)^{c}	115 (5.2±0.4^{c}, 44.1)	22 (19.1)	37 (32.2)	59 (2.7±0.4^{b}, 51.3)	46 (40.0)	10 (8.7)	92 (4.2±0.5^{c}, 80.0)	37 (1.7±0.4^{c}, 32.2)
C	65	1,170 (18.0±0.5)^{b}	579 (8.9±0.5^{b}, 49.5)	38 (6.6)	118 (20.4)	156 (2.4±0.3^{b}, 26.9)	300 (51.8)	123 (21.2)	467 (7.2±0.4^{b}, 80.7)	278 (4.3±0.4^{ab}, 48.0)
D	15	341 (22.7±2.8)^{a}	189 (12.6±1.3^{a}, 55.4)	29 (15.3)	46 (24.3)	75 (5.0±1.1^{a}, 39.7)	96 (50.8)	18 (9.5)	172 (11.5±1.1^{a}, 91.0)	71 (4.7±1.0^{a}, 37.6)
E	31	448 (14.5±0.5)^{c}	205 (6.6±0.5^{c}, 45.8)	56 (27.3)	55 (26.8)	111 (3.6±0.4^{b}, 54.1)	87 (42.4)	7 (3.4)	192 (6.2±0.5^{b}, 93.7)	91 (2.9±0.4^{bc}, 44.4)
F	50	891 (17.8±0.4)^{b}	496 (9.9±0.5^{b}, 55.7)	2 (0.4)	22 (4.4)	24 (0.5±0.1^{c}, 4.8)	264 (53.2)	208 (41.9)	354 (7.1±0.6^{b}, 71.4)	144 (2.9±0.4^{bc}, 29.0)
Total	212	3,724 (17.6±0.3)	1,901 (9.0±0.3, 51.0)	188 (9.9)	332 (17.5)	520 (2.5±0.2, 27.4)	930 (48.9)	451 (23.7)	1,509 (7.1±0.3, 79.4)	710 (3.3±0.2, 37.3)

$^{a\sim c}$ Values with different superscripts were significantly different (p<0.05).
(Mean±S.E) denotes mean±S.E per session.
OPU(ovum pick up) period of each donors : A; 14.5 weeks, B; 11 weeks, C; 32.5 weeks, D; 7.5 weeks, E; 15.5 weeks, F; 25 weeks. Rest time of each donor for secondary OPU of Table 2 after primary OPU (ovum pick up) of Table 1: A; 10 months, B; 2 months, C; 7 months (twin calf birth after OPU(about 3 months) on early pregnancy), D; 25 months (2 calf births by 2 times AI), E; 3 months, F; 6 months.

Table 3. Investigation about repeat use possibility of donors for secondary OPU-derived embryo production after primary OPU-IVP

Group	No. of donors	No. of session	No. of follicle aspirated (Mean±SE)	No. of collected oocytes (Mean±SE, %)	No. of oocytes (Mean±SE, %)					No. of cleavage (Mean±SE, %)	No. of blastocysts (Mean±SE, %)
					G1	G2	G1 + G2	G3	G4		
1	6	186	3,881 (20.9±0.4)^{a}	2,189 (11.8±0.4^{a}, 56.4)	555 (25.4)	456 (20.8)	1,011 (5.4±0.3^{a}, 46.2)	765 (34.9)	413 (18.9)	1,759 (9.5±0.3^{a}, 80.4)	962 (5.2±0.3^{a}, 43.9)
2	6	212	3,724 (17.6±0.3)^{b}	1,901 (9.0±0.3^{b}, 51.0)	188 (9.9)	332 (17.5)	520 (2.5±0.2^{b}, 27.4)	930 (48.9)	451 (23.7)	1,509 (7.1±0.3^{b}, 79.4)	710 (3.3±0.2^{b}, 37.3)
Total	12	398	7,605 (19.1±0.3)	4,090 (10.3±0.3, 53.8)	743 (18.2)	788 (19.3)	1,531 (3.8±0.2, 37.4)	1,695 (41.4)	864 (21.1)	3,268 (8.2±0.2, 79.9)	1,672 (4.2±0.2, 40.9)

$^{a\sim c}$ Values with different superscripts were significantly different (p<0.05).
(Mean±S.E) denotes mean±S.E per session.
Rest time for OPU start of group 2 after ovum pick-up of group 1 were carried out on 2～25 months, respectively.

기간의 OPU-IVP에 의해 전체 평균 3.3개의 수정란이 생산되어 공란우 반복사용 가능성을 확인할 수 있었다.

Chaubal 등(2006)은 10주 동안 매주 2회 채란으로 평균 3.9개의 난자를 회수하여 배반포 형성율은 21.0%, Lopes 등(2006)은 홀스타인 및 Red와 White 번식우에서 9회와 8회 채란에서 평균 6.0개 및 4.3개의 난자를 회수하여 28% 및 25%의 배반포가 형성되었다고 보고하였다. Machado 등(2006)은 2～5세의 Simmental을 이용하여 11회 채란으로 평균 8.7개의 난자, 배반

포로 형성된 비율은 18.9%로, 본 연구의 공란우 6두를 이용하여 398회 채란으로 평균 10.3개의 난자의 회수, 배반포까지 형성된 평균수는 4.2개 및 40.9%가 형성되었다. A는 첫 번째 26회 채란 후 10개월의 휴식과 29회 채란으로 총 55회, B는 25회 채란 후 2개월의 휴식과 22회 총 47회, C는 22회 채란 후 7개월의 휴식과 65회 총 87회, D는 48회 채란 후 분만 등으로 25개월의 휴식과 15회 총 63회, E는 25회 채란 후 3개월의 휴식과 31회 총 56회, F는 40회 채란 후 6개월의 휴식과 50회 총 90회 채란으로 회수되는 난자, 등급 및 수정란의 평균수가 다르게 나타나는 것은 개체간의 차이, 사육되는 환경, 총 채란횟수, 첫 번째 기간의 채란횟수가 두 번째 기간의 채란에 미치는 영향, 휴식 기간 등이 난포의 성장, 난자가 회수되는 수량과 수정란으로 생산되는 평균수량에 영향 미치는 것으로 사료된다.

또한 첫 번째와 두 번째 채란기간 사이의 OPU 유래 수정란 생산에서 휴식기간이 짧을수록(A개체; 2개월, E개체; 3개월, F개체; 6개월 미만) 회수되는 난자와 배반포까지 발달되는 평균수에서 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$). 이러한 결과는 보다 많은 수정란의 추가생산을 위한 공란우의 반복사용 위해서는 첫 번째의 수정란을 생산한 다음 생식기능이 회복할 수 있는 적절한 휴식기간이 필요한 것으로 판단되었다.

3. 수정란 대량생산을 위한 적정한 휴식과 공란우의 반복사용 가능성

수정란 대량생산을 위한 적절한 휴식기간을 조사하기 위해 6개월 이상과 이하의 휴식을 통한 결과는 Table 4와 같다. 휴식 전(A군), 6개월 이하의 휴식(B군) 및 6개월 이상의 휴식(C군)의 개체군에서 186회, 103회 및 138회 채란으로 횟수 당 회수된 난자의 평균은 11.8±0.4개, 7.9±0.3개 및 9.2±0.4개, G1+G2 등급은 5.4±0.3개, 1.9±0.2개 및 3.2±0.2개, 배반포까지 발달된 수는 5.2±0.3개, 2.6±0.2개 및 3.9±0.3개로 A군이 B, C 군보다 유의적으로 높았고($p<0.05$), C군은 B군보다 유의적으로 높았다($p<0.05$).

그러나 수정란 생산을 위한 각각의 단계에서 휴식 전 A군, 6개월 이하 휴식의 B군 및 6개월 이상 휴식 C군의 난자 회수율은 56.4%, 51.0% 및 49.3%, 배반포까지 형성은 44.0%, 33.3% 및 42.1%로 각각의 단계별로 비슷한 비율을 보였다. 또한 Fig. 1에서 관찰되는 난포, 회수된 난자, 분할 및 배반포 형성에서 휴식기간의 증가에 따라 평균수량은 증가한다.

또한 수정란의 효율적인 생산측면에서 6개월 이상 휴식한 개체군이 회수된 난자가 평균 9.2개와 생산된 수정란은 평균 3.9개 이상으로 진 등(2014)이 한우개량을 위한 OPU 유래 수정란 생산에서 4년 동안 생산된 수정란의 평균수의 3.0개와 유사한 결과를 보였다. 이러한 결과는 유전적 가치가 우수한 Elite 공란우를 산업화에 활용하기 목적으로 보다 많은 수정란 생산을 위한 공란우 반복사용을 위해서는 6개월 이상의 공태 또는 채란 후 인공수정 등에 의한 임신과 분만 등으로 생식기관이 회복할 수 있는 일정한 휴식기간이 필요한 것으로 판단된다.

신 등(2009)은 한우 반복 과배란 처리에 의한 체내 수정란 생산에서 공란우 처리방법에 따라 각각 5두에 200 mg 또는 400 mg FSH를 1회 처리의 방법으로 1회, 2회 및 3회의 수정란 회수 후 1주, 2주 및 3주의 휴식으로 연속 4회 연속하여 실시한 결과, 200 mg의 처리군은 평균 6.0개, 6.8개, 6.4개 및

Table 4. Comparison of embryo production efficiency for repeated use of donor due to break after primary OPU-IVP

Group	No. of donors	No. of session	No. of follicle aspirated (Mean±SE)	No. of collected oocytes (Mean±SE, %)	Grade of oocyte (Mean±SE, %)					No. of cleavage (Mean±SE, %)	No. of embryos (Mean±SE, %)
					G1	G2	G1 + G2	G3	G4		
A	6	186	3,881 (20.9±0.4)[a]	2,187 (11.8±0.4[a], 56.4)	555 (25.4)	456 (20.9)	1,011 (5.4±0.3[a], 46.2)	765 (35.0)	413 (18.9)	1,759 (9.5±0.3[a], 80.4)	962 (5.2±0.3[a], 44.0)
B	3	103	1,600 (15.5±0.4)[c]	816 (7.9±0.3[c], 51.0)	80 (9.8)	114 (14.0)	194 (1.9±0.2[c], 23.8)	397 (48.7)	225 (27.6)	638 (6.2±0.3[c], 78.2)	272 (2.6±0.2[c], 33.3)
C	3	138	2,563 (18.6±0.4)[b]	1,264 (9.2±0.4[b], 49.3)	145 (11.5)	290 (22.9)	435 (3.2±0.2[b], 34.4)	593 (46.9)	236 (18.7)	1,039 (7.5±0.3[b], 82.2)	532 (3.9±0.3[b], 42.1)
Total		427	8,044 (18.8±0.3)	4,267 (10.0±0.2, 53.0)	780 (18.3)	860 (20.2)	1,640 (3.8±0.2, 38.4)	1755 (41.1)	874 (20.5)	3,436 (8.0±0.2, 80.5)	1,766 (4.1±0.2, 41.4)

[a~c] Values with different superscripts were significantly different ($p<0.05$).
(Mean±S.E) denotes mean±S.E per session.
OPU of A, B and C group was carried out on times of before break, to rest time of less than six months and over 6 months.

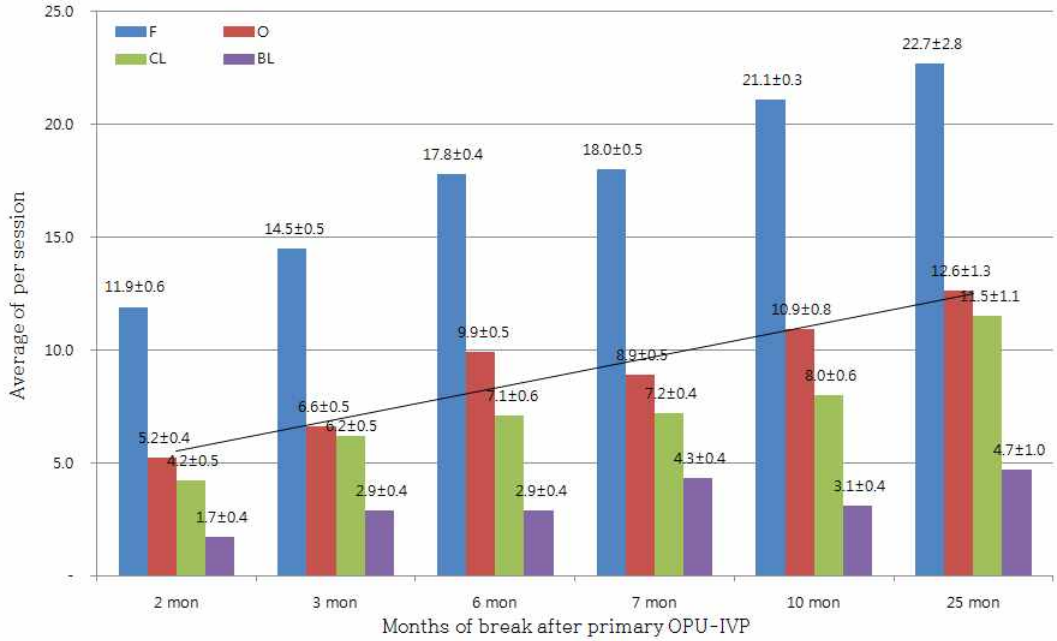

Fig. 1. Result of 2nd OPU-IVP after each break time on the donors. Also bar color and numeral is mean No. per session of F (follicle), O (oocyte), CL (cleavage) and BL (formation of blastocyst) by secondary OPU-IVP, respectively(p<0.05).

2.6개로 연속 반복됨에 따라 회수되는 수정란의 평균 수량은 감소, 400 mg의 처리군은 평균 5.0개, 4.6개, 4.2개 및 4.4개를 회수하여 전체 평균 5.48개와 4.58개로 다른 연구자들과 유사한다는 보고와 최 등(2005)은 한우에서 1~2개월 간격으로 연속 4회 FSH 이용한 과배란 처리 방식으로 이식 가능한 수정란은 평균 3.7개, 3.4개, 3.4개 및 5.7개를 회수하여 연속처리에 따른 차이 없다고 하였으나, 연간 생산되는 수정란의 수량은 한정되어 있다.

Roth 등(2008)은 Holstein의 육성단계, 분만 후 초기착유기 단계(분만 후 60~95일) 및 착유 중간단계(분만 후 120~225일) 군을 이용하여 각 처리군에 발정 후 4, 8, 11 및 15일에 각 4회 채란으로 두당 회수된 난자의 평균수는 13.2개, 17.2개 및 16.0개, Su 등(2012)은 12개월 령, 7~8세, 15세 이상의 연령별 처리군에 4일 간격 각 10회 채란으로 평균 7.3개, 6.1개 및 4.7개, Galli 등(2001)은 1997년에서 2000년 4개월까지 년도별 983회, 1,266회, 1,071회 및 345회 채란으로 평균 8.4개, 8.2개, 10.3개 및 9.4개를 회수하였다.

Galli 등(2014)은 Holstein 경산우, 임신된 육성우, 미임신 육성우 및 육성기 이전 단계에 평균 12.8개, 7.3개, 10.4개 및 10.9개, 진 등(2014)은 한우에서 2010년부터 2013년까지 4년 동안 매주 2회, 총 1,692회 채란으로 년도별 평균 7.5개, 7.6개, 9.6개 및 7.3개의 난자를 회수하였고, 본 연구는 6두를 이용하여 매주 2회 연속 427회 채란으로 평균 10.0개를 회수한 것은 각 연구지역과 품종, 연령, 채란방법에 따라 다른 것으로 사료된다.

OPU 유래 수정란 생산 체계에서 호르몬 자극 없이 매주 2회 채란이 난자 회수를 극대화 할 수 있는 가장 효과적인 프로토콜인 것으로 보고했다(Hasler 등, 1995; Galli 등, 2001; Merton 등, 2003). 또한 Galli 등(2001)은 년도별 이식 가능한 수정란의 생산은 평균 1.7개, 2.1개, 2.9개 및 3.0개로 년차적으로 증가하고, Galli 등(2014)은 공란우 연령에 따라 생산된 수는 2.49개, 1.43개, 1.86개 및 1.73개, 진 등(2014)은 2010년부터 2013년까지 한우 6두, 8두 22두 및 35두, 총 71두를 이용한 년도별 생산된 수정란이 평균 3.0개, 2.2개, 3.2개 및 3.0개, 총 5,032개(320개, 560개, 1,961개 및 2,191개), 두당 평균 70.9개를 생산한 것은 OPU 유래 수정란 생산방식으로 수정란의 대량 생산이 가능한 것으로 판단된다. 그러나 각 연구자별 평균수가 각각 다르게 생산된 것은 수정란의 생산지역, 채란방법, 연령에 따른 생식기능의 변화, 품종의 종류, 채란 시 외부환경 및 채란 여건(상태) 등에 따라 회수되는 난자의 평균수와 배반포의 형성율에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서 한우는 냉도체중, 배최장근 단면적, 등지방 두께와 근내지방도 등, 젖소는 유량, 유지방, 유단백질, 강건성 등 개량에 필요한 경제형질이 우수한 유전자를 보유한 Elite 개체에서 첫 번째 기간 OPU-IVP에 이용한 공란우를 보다 많은 수정란의 추가생산을 위해 공란우 반복 재사용을 위한 적절한 휴식시간을 조사한 결과, 휴식 전의 공란우 6두에서 평균 5.2개, 6개월 이하의 휴식군은 평균 2.6개 및 6개월 이상

의 휴식으로 평균 3.9개를 생산하여 첫 번째 기간에 수정란을 생산 후 공태 상태 또는 분만 등으로 최소 6개월 이상의 휴식이 필요한 것으로 판단된다. 또한 공란우 6두에서 총 427회 채란으로 4,267개의 난자를 회수하여 총 1,766개의 배반포가 형성되어 두당 평균 294.3개의 수정란을 생산한 결과는 OPU 유래 수정란 생산방식으로 두당 이식가능한 수정란의 대량생산이 가능하고, 보다 많은 수정란생산을 위해 첫 번째 수정란 생산 후 기능의 회복을 위한 적절한 휴식시간이 필요하며, 그것으로 인하여 공란우의 반복사용이 가능한 것으로 조사되었다.

이는 진 등(2014)이 4년 동안 OPU 방식으로 공란우 71두에서 5,032개(평균 70.9개/두당)의 수정란 생산과 2,156개를 이식하여 1,027두의 임신으로 4년 동안 평균 47.6%의 수태율과 2012년 C지역에서 OPU 유래 분만된 자우가 100%의 친자확인으로 후대에 대한 정확한 혈통정보와 검정으로 개량효과의 극대화 활용에 용이하다.

따라서 유전적 가치가 우수한 Elite cow에서 보다 많은 수정란 생산을 위하여 첫 번째 채란기간 후 적절한 휴식(6개월 이상)과 두 번째 기간의 채란으로 공란우의 반복사용이 가능하고, 그것으로 인하여 개량 자우의 대량생산을 위한 개발압버으로 OPU 유래 수정란 생산 및 이식체계가 효율적인 것으로 판단된다.

REFERENCES

Aller JF, Mucci NC, Kaiser GG, Callejas SS and Alberio RH. 2012. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. Anim. Reprod. Sci. 133:10-5. (DOI:10.1016/j.anireprosci.2012.06.001)

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. 77:117-25. (DOI:10.1016/S0378-4320(03)00036-8)

Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A and de Kruif A. 1996. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. Theriogenology. 47:1221-36. (DOI:10.1016 /S0093-691X(97)00102-7)

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. 43:667-75. (DOI:10.1016 /0093-691X(94)00072-3)

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. 65:1631-48. (DOI:10.1016/j.theriogenology.2005.07.020)

Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PEJ, Rezamand P, Tian X and Yang X. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. Theriogenology. 67:719-28. (DOI:10.1016/j.theriogenology.2006.07.022)

De Roover R, Genicot G, Leonard S, Bols P and Dessya F. 2005. Ovum pick-up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted super-stimulation protocol. Anim. Reprod. Sci. 86:13-25. (DOI:10.1016/j.anireprosci.2004.05.022)

De Roover R, Feugang JMN, Bols PEJ, Genicot G and Hanze Ch. 2008. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: A retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. Reprod. Domest. Anim. 43:239-45. (DOI: 10.1111 /j.1439-0531.2007.00873.x)

Deb GK, Dey SR, Bang JI, Park HC, Lee JG and Kong IK. 2011. 9-*cis* retinoic acid improves developmental competence and embryo quality during *in vitro* maturation of bovine oocytes through the inhibition of oocyte tumor necrosis factor-alpha gene exppression. J. Anim. Sci. 89:2759-67. (DOI:10.2527/jas.2011-3848)

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R and Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. Theriogenology. 55:1341-57. (DOI:10.1016/S0093- 691X(01)00486-1)

Galli C, Duchi R, Colleoni S, Labutina I and Lazzari G. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. Theriogenology. 81:138-51. (DOI:10.1016/j.theriogenology.2013.09.008)

Garcia A and Salaheddine M. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. Theriogenology. 50:575-85. (DOI:10.1016/S0093-691X(98)001-629)

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Mc-Cauley AD, Hower SA, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production,

freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology. 43:141-59. (DOI:10.1016/0093-691X(94)00020-U)

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. (DOI:10.1016/S0093-691X(05)80050-0)

Lopes AS, Martinussen, T, Greve T and Callesen H. 2006. Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. Reprod. Domest. Anim. 41:196-203. (DOI: 10.1111/j.1439-0531.2006.00683.x)

Machado SA, Reichenbach HD, Weppert M, Wolf E and Gancalves PB. 2006. The variability of ovum pick-up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cow. Theriogenology. 65:573-83. (DOI:10.1016/j.theriogenology.2005.04.032)

Mapletoft R and Hasler J. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: A review. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 24:393-403. (PMID:16110904)

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. 59:651-74. (DOI:10.1016 /S0093-691X(02)01246-3)

Merton JS, Knijn HM, Flapper H, Dotinga F, Roelen BAJ, Vos PLAM and Mullarrt E. 2013. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. Theriogenology. 80:365-71. (DOI:10.1016/j.theriogenology.2013.04.025)

Moreira F, Badinga L, Burnley C and Thatcher WW. 2002. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. Theriogenology. 57:1371-87. (DOI:10.1016 /S0093-691X(01)00719-1)

Petyim S, Båge R, Hallap T, Bergqvist A, Rodríguez-Martínez 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. 60:175-88. (DOI:10.1016 /S0093-691X(02)01363-8)

Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TM and Taverne MA. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology. 30:751-62. (DOI: 10.1016/0093-691X(88)90310-X)

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 (Abstract). (DOI: http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(92)90342-O)

Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP and Seneda MM. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. Theriogenology. 75:1640-6. (DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.12.026)

Rosenkrans CF JR, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK and First NL. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. Biol. Reprod. 49:459-62. (DOI: 10.1095/biolreprod49.3.459)

Roth Z and Hansen PJ. 2004. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. Biol. Reprod. 71:1898-906. (DOI: 10.1095/biolreprod.104.031690)

Roth Z, Inbar G and Arav A. 2008. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. Theriogenology. 69:932-9. (DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.02.001)

Seidel GE. 1981. Superovulation and embryo transfer in cattle. Science. 211:351-8. (DOI: 10.1126/science.7194504)

Su L, Yang S, He X, Li X, Ma J, Wang Y, Presicce GA and Ji W. 2012. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. Reprod. Domest. Anim. 47:184-9. (DOI: 10.1111/j.1439-0531. 2009.01349.x)

Van Wagtendonk-de Leeuw A. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. Theriogenology. 65:914-25. (DOI:10.1016/j.theriogenology.2005.09.007)

김성수, 최병현, 조현태, 진종인, 하아나, 민찬식, 조규완, 공일근. 2014. OPU 채란계절이 한우의 난자 품질 및 발달 능력에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 29:265-71. (http://dx.doi.org/10.12750/JET.2014.29.3.265)

김용준, 송재웅, 서세현, 장구남, 김용수, 이해리, 신동수, 조성우, 김수희. 2004. 한우 및 젖소에서 과배란 처리를 이용한 체내수정란 생산과 신선 및 동결 수정란 이식 결과. 한국

수정란이식학회지 19:209-18.
손동수, 김일화, 류일선, 연성흠, 서국현, 이동원, 최선호, 박수봉, 이충섭, 최유림, 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 27:127-31.
신상민, 김용준, 이해리 신동수, 김용수, 김수희, 이영준. 2009. 한우의 반복 과배란 처리에 의한 체내 수정란의 생산과 이식. 한국수정란이식학회지 24:47-56.
이병천, 윤기영, 김정태, 이강남, 노상호, 신태영, 박종임, 김남렬, 주석천, 백남용, 이은송, 임정묵, 이우근, 황우석. 1998. 초음파 유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구. 2. 임신우 유래 난포란으로부터 산자생산에 관하여. 한국수정란이식학회지 13:77-86.
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.
진종인, 최병현, 김성수, 조현태, 선두원, 임현태, 이정규, 민찬식, 공일근. 2014. OPU 유래 한우 수정란 생산 및 이식. 한국수정란이식학회지 29:273-81.
최병현, 진종인, 권태현, 김성수, 조현태, 공일근, 2011. 한우와 젖소 대리모가 OPU 유래 한우 송아지의 체중과 임신기간에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 26:27-32.
최선호, 류일선, 손동수, 조상래, 한만회, 김현종, 최창용, 김영근. 2005. 한우의 반복 과배란 처리 및 산차가 수정란 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 20:185-90.

Received April 21, 2015, Revised May 8, 2015, Accepted May 18, 2015