

한우 육질등급이 난포란의 배반포 체외생산에 미치는 영향

김강식¹ · 이홍철¹ · 박용수² · 김소섭³ · 박흠대^{1*}

¹대구대학교 생명공학과, ²경북축산기술연구소, ³(주)광개토탄한우농업법인

Correlation of Hanwoo (Korean Native Cattle) Carcass Classification and Oocyte Donor for Blastocyst Production *In Vitro*

Kang-Sig Kim¹, Hong-Chul Lee¹, Yong-Su Park², So-Sub Kim³ and Hum-Dai Park^{1*}

¹Dept. of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

²Kyongbuk Livestock Research Institute, Yeongju 750-871, Korea

³Gwanggaeto Hanwoo Agricultural Company Corporation. Inc, Gyeongsan 712-803, Korea

ABSTRACT

These studies were conducted to establish the practical Hanwoo (Korean native cattle) improvement system through the combining of embryo transfer technology and confirming individual Hanwoo oocyte culture system and to investigate that correlation of Hanwoo carcass classification (intramuscular marbling) and oocyte donor for blastocyst production *in vitro*. In case of Hanwoo, the carcass meat quality grades were divided to grade 1⁺⁺, 1⁺, 1, 2, and 3 depends on fat distribution of longest muscle cross-sectional surface. As results, the numbers of follicular oocytes collected from individual fundamentally-registered Hanwoo yielded 1⁺⁺, 1⁺, 1, 2 and 3 meat quality were 9.5, 9.4, 8.5, 8.8 and 8.8 per ovary, respectively. The numbers of retrieval oocyte from follicles were significantly higher in the cattle yield 1⁺⁺, 1⁺ meat quality than in the cattle yield 1, 2 and 3 meat quality ($p < 0.05$). The rates of blastocyst formation were 18.2, 21.3, 29.4, 30.9, and 31.5% in the cattle yield 1⁺⁺, 1⁺, 1, 2 and 3 meat quality of after *in vitro* maturation, respectively. It was significantly lower in the cattle yield 1⁺⁺ and 1⁺ meat quality than in the cattle yield 1, 2 and 3 meat quality ($p < 0.05$). In order to evaluate embryos quality, TUNNEL assay was conducted for each meat quality grade using blastocyst stage embryo on day 8. The results showed that apoptosis cell number was higher tendency in the cattle yield 1⁺⁺ and 1⁺ meat quality (81 and 79, respectively) than in the cattle yield 1, 2 and 3 meat quality (51, 48 and 50, respectively) but there was no statistical significance in each group. After embryo transfer, the conception rate of recipient was 53.5 (23 out of 43), 52.1 (38 out of 73) and 58.0% (58 out of 100) in the meat quality of 1, 1+ and 1⁺⁺, respectively. These results showed that the conception rate was significantly higher in the cattle yield 1 meat quality than in the cattle yield 1⁺⁺, 1⁺, 2, and 3 meat quality ($p < 0.05$). In summary, these results indicate that the application of confirming Hanwoo individual oocyte culture system and embryo transfer technology can make good use of the genetic resources conservation and improvement of Hanwoo. Relevance of the meat quality grade and reproductive ability of carcasses of Hanwoo will be considered to be one of the effective means for the associated research with obesity and reproduction.

(Key words : Hanwoo, carcass classification, individual culture system, embryos transfer, conception rate)

서 론

우리나라의 현행 가축의 개량 체계는 당대 및 후대 검정만으로 우량 종모우를 선발하고, 이들로부터 생산된 보증 종모우 정액을 사용하여 인공수정의 방식으로 진행되고 있다. 황 등 (2004)은 이러한 인공수정 기술은 한우 개량과 번식효율 증대 등에 크게 기여하였으나, 이는 종모축 중심의 가축 개량이라

는 기술의 한계성이 있다고 지적했다. 또한 종모우의 선발지수가 육질보다는 체형과 육량 위주로 되어 있어서 한우의 유전적인 육질 개량은 저조한 실정이다(조 등, 1992; 박 등, 2001). 따라서 한우 품종의 경쟁력 제고를 위해서는 육량이나 육질 등과 같은 경제적 형질이 우수한 개체를 선발, 관리하는 유전형질의 보존 측면과 이러한 개체를 계획 교배 등을 통해 유전적으로 개량하는 등의 다양한 측면에서 연구가 필요하다. 이리

* Correspondence : kim730306@hanmail.net

한 유전적인 개량 효율을 높이기 위한 지표로서는 세대간격(*generation interval*), 유전능력 평가의 정확도(*selection accuracy*), 선발강도(*selection intensity*), 유전적 다양성(*genetic variability*) 등을 고려해야 하며, 개량의 효율을 높인다는 것은 일정기간 내에 보다 더 유전자 구성 변화를 중심으로 육종을 행해야 한다(Wu 등, 2012). 인공수정 기술과 더불어 가축 개량 효율을 촉진할 수 있는 또 하나의 기술인 수정란 이식 기술은 공란축의 생식기로부터 착상 전의 수정란을 회수하거나, 체외에서 수정시킨 수정란을 조작, 배양하여 수란축의 생식기에 이식하여 착상, 임신, 분만을 유도하는 생명공학기술이다. 이 기술은 능력이 우수한 송아지를 일시에 많이 생산(김 등, 2006)할 수 있을 뿐만 아니라, 모체의 유전능력 개량에 활용할 수 있는 장점을 가진 방법이기도 하며, 나아가서 희귀동물의 보존과 복제동물, 질환모델동물, 인공장기생산 동물 등과 같은 형질전환동물의 생산을 가능하게 한다(Thibier, 2001). 현재 수정란이식기술을 이용한 소의 품질개량을 위한 실용적 방법으로는 주로 체내수정란을 이용하는 것으로서, 유전적으로 우량하고 우수한 체격과 능력을 가진 암소에게 호르몬 처리 등을 통해 난자가 많이 배반되게 유도한 뒤, 우수한 종모우의 정액으로 수정 후 착상 전에 자궁에서 수정란을 회수하여 대리모의 자궁에 이식, 임신, 분만하게 하는 기술이다. 이러한 방식은 국내에서는 고 등(1981)에 의해 체내수정란의 비외과적 회수 및 이식, 생산 성공 보고를 시작으로 가축 개량의 한 방편으로 농가 현장에 적용되어져 왔으나, 개체 특성에 따른 과배란 처리의 어려움과 비용 등의 문제점 등이 대두되고 있다(박 등, 2005). 이러한 단점을 보완한 체외수정란을 이용하는 방법은 Brackett 등(1982)이 도축된 소의 난소로부터 회수한 미성숙 난포란을 이용하여 송아지 생산에 성공한 이래로 체외 수정란의 이식 및 생산 연구 등 다양한 측면에서 활용되어졌다(Rosenkrans 등, 1993; Wiemer 등, 1991; Kajihara 등, 1992; Blondin 등, 1995; Carolan 등, 1996; 황 등, 2004). 다만 도축된 암소의 난소를 이용한 체외수정란의 생산 이식 방식은 무작위의 난소를 사용하는 체계로서, 암소가 가지고 있는 유전형질을 알 수 없는 단점이 있기 때문에 유전 육종에 있어서 부정적인 영향을 줄 수 있다(김 등, 2000). 이러한 문제점 해결을 위한 도축장에서 개체의 정보가 기록된 난소의 개체별 채취와 개체별 배양의 기법의 적용은 가축 개량의 효율성을 극대화함과 동시에, 도축장에서 사라지는 우수한 유전 형질들의 보존 및 개량에 이용할 수 있는 좋은 방안이라 사료된다.

한편, 한우 도체의 육질등급은 도축장에서 도축 시 배최장근 단면에 나타난 지방의 분포 정도에 따라 1⁺⁺, 1⁺, 1, 2, 3등급으로 구분되어진다. 경제적으로 가치가 높은 1⁺⁺등급의 육질은 3등급에 비해 생리학적으로는 일종의 비만이라고 가정할 수 있다. 일반적으로 농장에서 가축들은 생산성 증대를 위

해 인간에 의해 사육되어지고, 사육 목적에 따라 섭취의 양상이 변화하므로 심각한 건강상의 문제를 야기하기도 한다(Wathes 등, 2007). 또한 이러한 체지방의 증가는 일반적으로 생식능력에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Farley 등, 2009). 체지방의 증가와 생식력과의 연관된 최근의 보고 자료를 보면 쥐에게 사료급여 조절을 통한 체지방의 정도에 따라 적은(<7%), 표준(7~8%), 약간 많은(8~11%), 매우 많은(>11%) 그룹으로 분류한 뒤, 그룹별 체내수정란의 발달율을 조사한 결과, 체지방이 매우 많은 그룹(>11%)과 적은 그룹(<7%)에서 배반포의 발달율이 적었고, 배반포의 전체 세포수에서 죽은 세포가 많으며, 죽은 세포의 기원이 세포자연사(*apoptosis*)라고 보고되었다(Kubandova 등, 2014). 이러한 실험 모델의 설계가 어려운 대동물인 한우는 도축장에서 도축되어진 후 육량과 육질에 따라 정확히 구분되어지며, 그 중 육질은 배최장근 단면에 나타난 지방의 분포 정도를 기준으로 각각의 등급으로 구분되어지므로 Kubandova 등(2014)의 연구모델과 유사한 실험군으로 설정하면 체지방 함량과 생식력과의 비교 연구가 가능하다고 사료된다.

본 연구는 경제적 가치가 높은 육질등급, 즉 체지방의 정도에 따라 도축 암소 유래의 난자를 개체별로 채취하여 개체별 수정 및 배양 후 수정란 이식을 수행하여 이러한 개체별 한우 수정란 이식 기술이 농가 현장에 적용 가능한지 확인하고, 나아가서 체지방의 함량에 따른 체외 수정란의 발달율과 품질 및 임신을 등의 상관관계를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 배양액

미성숙 난포란의 회수 및 세척용 배양액은 10 mM HEPES (Sigma, H-6147)와 3.0 mg/ml bovine serum albumin(BSA, Sigma, A-9647)이 첨가된 HEPES buffered Tyrode's medium (TL-HEPES)이고, 미성숙 난자의 체외성숙용 배양액은 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS: Gibco BRL, 26140-070)이 첨가된 TCM-199(Gibco BRL, 12340-030) 배양액에 1 µg/ml follicle stimulating hormone(FSH: Sigma, F-4021), 1 µg/ml estradiol-17β(Sigma, E-6253)을 첨가하여 사용하였다. 정자의 세정을 위한 배양액은 Sperm Tyrode Albumin Lactate Pyruvate Medium(Sp-TALP; Parrish *et al.*, 1988)를 사용하였고, 체외수정을 위한 배양액은 modified Tyrode Albumin Lactate Pyruvate Medium(Fer-TALP; Bavister and Yanagimachi, 1977)을 사용하였다. 초기배(2~8세포기) 난자의 배양을 위한 배양액은 0.3% bovine serum albumin (BSA: Sigma, A-6003)이 첨가된 CR1aa, 후기 배(8세포기~배반포) 배양을 위해서는 10% FBS가 첨가된 CR1aa를 사용하였다. 모든 배양액은 사용하기 2주 전에 제

조하여 0.22 µm membrane filter(Gelman Science, Ann Arbor, MI)로 여과하고, 4°C 냉장고에 보관한 후 사용하기 전에 반드시 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 4~5시간 이상 평형한 후 사용하였다.

2. 개체별 난소 채취

경상남도 김해시 어방동에 소재한 김해 축산물 공판장에서 도축된 한우로부터 개체별로 채취한 난소를 난소 표면의 혈액과 이물질을 제거하고, 개체별로 번호를 붙인 폴리 아마이드팩에 담은 뒤 30~33°C의 25 mg/ml gentamycin(Gibco, 15750-011)이 첨가된 0.9% 생리식염수가 들어있는 보온병에 담아, 도축 후 2~4시간 이내 실험실로 운반하였다(Fig. 1). 이때 질병 및 혈통 체계 유지를 위하여 브루셀라 검사 증명서와 도축우 난소 혈통 및 검역 확인원을 발급받았다. 한우에 있어서 근내 지방도는 배최장근 단면에 나타난 지방의 분포 정도에 따라 1++등급, 1+등급, 1등급, 2등급 그리고 3등급 등 5등급으로 구분하였으며, 그 기준표의 사진은 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 익일 축산물등급판정소의 소 도체등급 판정기록표에 의거 채취한

난소의 도축번호와 대조하여 도체의 육질등급과 육량등급을 기록하였고, 한국종축개량협회의 한우개체정보 조회를 이용한 바코드로 개체별로 추적하여 혈통과 생년월일을 조사하였다.

3. 개체별 난포란 회수 및 체외성숙

도축장에서 개체별로 운반된 난소는 생리 식염수로 2~3회 세척하여 난소 표면의 혈액과 이물질을 제거한 후, 1회용 10 ml 주사기에 18 gauge 주사침을 부착하여 2~8 mm 직경의 가시난포로부터 난포란을 개체별로 회수하였다. 회수한 난포란을 TL-HEPES 용액으로 2~3회 세척한 후 상층액을 제거하고, 실체현미경(×100~×200)하에서 모든 난포란을 회수하여 개체별로 35 mm petri dish(Falcon, 3001)에 분주하였다. 개체별로 회수한 난포란은 체외성숙용 배양액으로 1~2회 세척한 후, mineral oil(Sigma, M-8410)로 피복된 50 µl의 체외성숙용 배양액에 각각 10~20개씩 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 동안 각각 배양함으로써 체외성숙을 유도하였으며, 배양 후 난구세포가 잘 확산된 난포란을 선발하여 체외수정에 사용하였다.



Fig. 1. Collection process of individual Hanwoo ovaries.

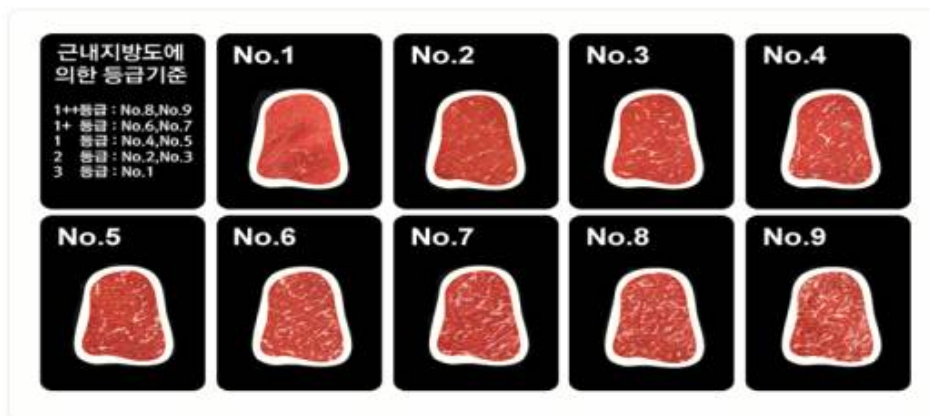


Fig. 2. Rating criteria by intramuscular marbling. (사진출처:한국종축개량협회)

4. 체외수정 및 체외 배양

체외수정용 정자는 농협중앙회 가축개량사업소에서 선정한 중모우 동결정액(-196℃)을 사용하였다. 동결정액은 상온에서 10초간 방치한 후 39℃의 물에서 20초간 침적하였고, 소독한 가위로 straw 양끝을 자르고, 미리 준비해둔 각 2 ml의 Sp-TALP 배양액에 45%와 90% Percoll(Sigma, P-4937)로 층이 만들어진 15 ml 원심분리관(Falcon, 2097)에 조심스럽게 정액을 넣고, 2,000 rpm으로 20분간 원심분리를 한 후 하층부의 정자 괴만을 회수하였다. 회수한 정자괴를 Sp-TALP 배양액에서 700 rpm으로 5분간, 2회 원심분리한 후 최종 정자농도가 1×10^6 마리/ml가 되도록 조절하여 체외수정용 정자로서 준비하였다. 체외수정을 위해 형태적으로 난구세포가 확장된 난포란만을 선별하여 0.03% hyaluronidase(Sigma, H-3507) 첨가 Fer-TALP 용액으로 처리하여 난구세포를 제거하고, 체외수정에 제공하였다. 체외수정은 체외성숙한 난포란을 1~2회 세척한 후, 미리 준비해둔 60 mm petri dish(Falcon, 3002)에 mineral oil로 피복된 50 μ l drop의 Fer-TALP 배양액에 넣고, 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 정자와 난자를 24시간 동안 공배양하여 체외수정을 유도하였다. 24시간동안 체외수정을 실시한 후, 개체별 난포란은 200 μ l의 micropipette(Gilson, Pipetman P200)을 이용한 pipetting으로 난구세포 층을 제거하고, 실제 현미경하에서 난자 내 제 2극체 유무와 관계없이 형태적으로 정상이라고 판단되는 난자를 회수하였다. 회수된 개체별 체외수정란을 미리 준비해둔 0.3% BSA가 첨가된 CR1aa 용액으로 2~3회 washing 한 후, 60 mm petri dish에 30 μ l drop의 배양액에 넣어 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 48시간째에 10% FBS가 첨가된 CR1aa배양액으로 교체하였으며, 그 후 48시간마다 신선 배양액으로 교체하면서 7~8일째까지 계속 배양하여 배반포로의 발달을 확인하였다.

5. 수정란의 평가

체외생산된 배반포의 품질평가는 8일령 배반포의 전체 세포수와 세포자연사 유래 사멸 세포 수를 형광 현미경하에서 측정하였다. 배반포는 0.3% BSA가 포함된 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS; Gibco BRL, 14287-080) 용액으로 세척한 뒤, 상온에서 1시간 동안 4% paraformaldehyde(Merck, Darmstadt, Germany)가 포함된 DPBS 용액에서 고정시켰다. 고정된 배반포는 세척 후 1시간 동안 0.5% Triton X-100(Sigma-Aldrich) DPBS 용액에 처리하였다. 이렇게 처리된 배반포는 TUNEL 분석 시약(TUNEL, terminal deoxy nucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, *In Situ* Cell Death Detection Kit; Roche, Penzberg, Germany)으로 37℃, 어두운 곳에서 1시간 동안 처리하였다. TUNEL 시약 처리 후 모든 배반포는 Hoechst 33342(10 mg/ml in PBS; Sigma-Aldrich; stains all nu-

clei, shows nuclear morphology) 시약으로 상온에서 5분간 대비염색하여 형광현미경(BX50; Olympus)으로 관찰하였다

6. 수정란의 이식

수정란 이식을 위한 수란우는 경상남도 의령군 소재 합천목장에서 생후 16개월 이상된 건강한 미경산우의 F₁(한우×젓소)이었으며, 수정란 이식 시술을 하기 전 3회 이상의 정상적인 발정주기를 보인 미경산우만 선발하여, 발정 7일째에 직장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치(좌 또는 우)를 확인하고, 황체의 크기(직경 15~25 mm)와 형태가 정상인 수란우를 발정주기에 관계없이 25 ml의 prostaglandin F_{2 α} 를 11일 간격으로 2회 근육 주사하여 발정동기화를 유도하였다. 발정동기화를 유도한 수란우는 1일 3회, 1회 30분 이상 관찰하여 standing estrus(발정 0일)를 보이는 개체를 수란우로 판정하여 발정 7일째에 비 외과적 자궁경관 경유법에 의해 수정란을 이식하였다. 수란우의 수태율을 조사하기 위해 배반포를 이식한 후 50일째에 직장검사법으로 태막 및 양막낭을 촉진하였다.

7. 통계처리

통계적 유의성 검정은 SAS package program(version 8.0)의 GLM(General Linear Model)을 이용하여 분석하였고, 처리평균간 비교는 최소유의차 검정(LSD-test)을 통해 5%($p < 0.05$)일 때 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 도축 공란우 육질등급별 채취 난포란 수의 변화

도축 공란우의 육질등급(1⁺⁺, 1⁺, 1, 2, 3)에 따른 채취한 난포란 수는 Table 1과 같다. 실험 기간 동안 총 1,761두 3,522개의 난소에서 31,038개의 난포란을 채취하였으며, 도체 육질등급별 채취한 각각의 난포란 수는 1⁺⁺등급의 경우 총 278개 난소에서 2,639개로 평균 9.5개, 1⁺등급의 경우 418개 난소에서 3,949개로 평균 9.4개, 1등급의 경우 1,226개 난소에서 10,369개로 평균 8.5개, 2등급의 경우 1,224개 난소에서 10,770개로 평균 8.8개, 3등급의 경우 376개 난소에서 3,311개로 평균 8.8개로서, 육질등급 1⁺⁺, 1⁺등급의 난소에서의 채취한 난포란 수가 육질등급 1, 2, 3등급보다 유의적으로 많았다($p < 0.05$).

2. 도축 공란우 육질등급별 난포란의 체외 수정율 및 체외 발달율

도축 공란우에서 육질등급별로 채취한 개체별 난포란의 체외 수정율과 발달율은 Table 2에서 보는 바와 같다. 1⁺⁺등급의 경우 2,639개의 난포란 중에서 1,482개가 수정되어 56.2%, 1⁺

Table 1. The number of recovered follicular oocytes from slaughtered donor Hanwoo according to meat quality

Meat quality	No. (%) of Hanwoo	No. of ovary	No. of follicular oocyte	No. of follicular oocyte/ovary
1 ⁺⁺	139(7.9)	278	2,639	9.5 ^b
1 ⁺	209(11.9)	418	3,949	9.4 ^b
1	613(34.8)	1,226	10,369	8.5 ^a
2	612(34.7)	1,224	10,770	8.8 ^a
3	188(10.7)	376	3,311	8.8 ^a
Total	1,761(100)	3,522	31,038	8.8 ^a

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

등급의 경우 3,949개의 난포란 중에서 2,279개가 수정되어 57.7%, 1등급의 경우 10,369개의 난포란 중에서 5,787개가 수정되어 55.8%, 2등급의 경우 10,770개의 난포란 중에서 6,333개가 수정되어 58.8%, 3등급의 경우 3,311개의 난포란 중에서 2,044개가 수정되어 61.7%로 나타났으며, 비록 3등급 유래 난포란의 체외 수정율이 가장 높았지만, 각 그룹간의 유의차는 인정되지 않았다($p<0.05$). 체외 수정란의 8세포로의 배 발달율은 1⁺⁺등급의 경우 74.8%, 1⁺등급의 경우 76.6%, 1등급의 경우 77.6%, 2등급의 경우 78.4%, 3등급의 경우 78.1%로서 그룹 간 비슷한 경향이였다. 한편, 체외수정란의 배반포로의 배 발달율은 1⁺⁺등급의 경우 18.2%, 1⁺등급의 경우 21.3%, 1등급의 경우 29.4%, 2등급의 경우 30.9%, 3등급의 경우 31.5%로서, 1⁺⁺, 1⁺등급 그룹이 다른 그룹보다 유의하게 낮았다($p<0.05$).

3. 육질등급별 체외 생산된 배반포의 세포자연사

Table 2. Fertilization rates of oocyte and developmental rates of *in vitro* fertilized oocyte from slaughtered donor Hanwoo according to meat quality

Meat quality	No. of total recovered oocyte ¹⁾	No. (%) of fertilized oocyte	No. (%) of developed embryos to	
			8 cell	Blastocyst
1 ⁺⁺	2,639	1,482(56.2)	1,109(74.8)	270(18.2) ^a
1 ⁺	3,949	2,279(57.7)	1,746(76.6)	485(21.3) ^a
1	10,369	5,787(55.8)	4,454(77.6)	1,703(29.4) ^b
2	10,770	6,333(58.8)	4,963(78.4)	1,954(30.9) ^b
3	3,311	2,044(61.7)	1,597(78.1)	643(31.5) ^b
Total	27,727	15,881(57.7)	12,280(77.1)	4,412(28.2) ^b

¹⁾ None-selected all oocyte.

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

Table 3에서 제시된 바와 같이, 육질등급별 체외 생산된 배반포의 평균 전체 세포 수는 1⁺⁺등급은 1,152개, 1⁺등급은 1,144개, 1등급은 1,205개, 2등급은 1,162개, 3등급은 1,155개로서, 각 그룹 간의 유의차는 없었다. 한편, 육질등급별 체외 생산된 배반포의 세포 사멸수는 1⁺⁺등급은 81개(7.0%), 1⁺등급은 79개(6.9%), 1등급은 51개(4.3%), 2등급은 48개(4.1%), 3등급은 50개(4.3%)로서, 육질등급이 비교적 낮은 그룹(1등급, 2등급, 3등급)이 높은 그룹보다 사멸 세포 수는 적었지만, 유의차는 없었다.

4. 육질등급별 체외 생산된 배반포의 이식결과

육질등급별 체외 생산된 배반포의 이식 후 태아로의 발생율은 Table 4와 같다. 1⁺⁺등급의 경우 43두 중 23두(53.5%), 1⁺등급의 경우 73두 중 38두(52.1%), 1등급의 경우 100두 중 58두(58.0%)가 임신하여 1등급에서 유의적으로 높은 임신율을 나타내었다($p<0.05$). 2등급의 경우 12두 중 10두(83.3%), 3등급의 경우 1두 중 1두(100.0%)가 각각 임신하여 하여, 육질등

Table 3. Rates of apoptotic cell in blastocyst from slaughtered donor Hanwoo according to meat quality

Meat quality	No. of examined blastocyst ¹⁾	No. of total cell	No. (%) of apoptotic cell
1 ⁺⁺	10	1,152	81(7.0)
1 ⁺	10	1,144	79(6.9)
1	10	1,205	51(4.3)
2	10	1,162	48(4.1)
3	10	1,155	50(4.3)

¹⁾ 8-day blastocyst after *in vitro* culture.

Table 4. Pregnancy rates after embryo transfer from slaughtered donor Hanwoo according to meat quality

Meat quality	No. of recipient	No. (%) of pregnancy
1 ⁺⁺	43	23(53.5) ^a
1 ⁺	73	38(52.1) ^a
1	100	58(58.0) ^b
2	12	10(83.3)
3	1	1(100.0)
Total	229	130(56.8) ^b

^{ab} Different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

급이 낮은 유래의 난포란에서 체외 발생한 배반포일수록 태아로의 배발생율이 높은 경향을 나타내었으나, 유의차는 나타나지 않았다($p < 0.05$).

고 찰

한우 개량 효율의 극대화를 위해 체외 난포란의 개체별 배양 체계와 수정란 이식 기술을 이용하여 기존의 인공수정과 체내수정란 이식 기법의 단점을 보완할 수 있는 체계가 필요하다. 이러한 체계의 확립은 한우의 도축 후 기록되어지는 개체의 육량 및 육질 등의 경제성을 고려하여 유전적으로 우수한 형질을 가진 한우 개체의 체외 수정란을 농가에 보급할 수 있기 때문에, 한우 개량의 방향성 결정에 매우 유용하게 이용될 것이다. 본 연구는 현 시점에서 한우의 경제적 개량 방향인 육질 개량 측면에서 도축 후 육질 등급별로 구분된 한우 개체별 난포란 유래 난자의 체외 발생능력을 검토하였다.

박 등(2000)은 생체에서 회수한 난포란 수는 1개의 난소 당 평균 4~5개인 것으로 보고하였고, Mermillod 등(1992)은 도축된 1마리의 암소 난소에서 회수 가능한 난포란 수는 평균 14.1개로 보고하였으나, 본 연구(Table 1)에서는 한우 개체 당 평균 17.6개의 난포란을 회수하였다. 이것은 아마도 연구자에 따라 가지 난포란의 표준이 다르다는 것을 의미할 수 있지만, 도축장에서 사라져가는 육질 등급이 우수한 암소 유전자의 재 활용 측면에서 매우 긍정적이라고 생각한다. 한편, 일반적으로 인간의 경우, 체지방의 증가는 비만이라고 표현하지만, 동물의 경우 체지방의 증가가 비만이라고 표현할 수 있는 정확한 기준이 없다고 하더라도 비만과 관련된 체란 수 또는 수정란의 생산에 관한 많은 연구 보고들이 있다. 예를 들면 체란 수는 쥐의 경우, 고지방 섭취에 의한 비만은 수정란의 체란수가 증가(Minge 등, 2008)할 수도 있지만, 감소한다는 보고(Jungheim 등, 2010)도 있으며, 젖소의 경우 지방산 함유 사료 섭취는 체

란수가 감소한다(Thangavelu 등, 2007). 또한 인간의 경우도 비만 시 난자의 체란수가 적었으나(Zullo 등, 1996; Lashen 등, 1999; Fedorscak 등, 2004), 그렇지 않다는 보고(Lewis 등, 1990; Wittemer 등, 2000; Styne-Gross 등, 2005)도 있다. 그리고 수정란의 생산에 있어서도 고열량 사료를 섭취한 쥐의 경우, 수정란의 수가 증가한다는 보고(Wakefield 등, 2008)와 큰 차이가 없다(Igosheva 등, 2010)는 보고도 있으며, 소의 경우 지방산 함유 사료 섭취는 난자나 배의 발생에 아무런 영향을 미치지 않는다고도 한다(Ponter 등, 2006). 본 연구(Table 1)에서는 호르몬 처리를 하지 않은 36~48개월령 한우의 도축 후 평가 되어진 육질등급 기준으로 1⁺⁺, 1⁺등급(비만) 유래 난포란에서 체란 수는 증가하였다. 이와 같은 여러 연구 결과의 차이는 비만 유도 방법, 사료의 종류, 실험동물의 종과 나이, 비만의 평가 방법, 생식주기의 조절 등과 같은 연구 가설의 차이 때문일 것이라고 사료된다.

한편, 섭식 조절을 통한 비만 쥐의 수정란은 체외 배양 시 발달 속도의 지연(Kredel 등, 2014; Wakefield 등, 2008), 생존률을 저하(Minge 등, 2008), 배반포 발생율도 감소(Igosheva 등, 2010; Minge 등, 2008; Wakefield 등, 2008); Luzzo 등, 2012) 등을 유발한다고 보고되어졌다. 이처럼 체지방 정도가 수정란의 발달능력에 있어서 부정적인 영향을 미친다는 유사한 연구 보고가 많다. 본 연구에서 육질등급별 한우 난포란에서의 체란 수의 변화 이외의 결과(Table 2)중에서 경제적 가치가 높은 육질 1⁺⁺, 1⁺등급 유래 체외 수정란의 배 발달율이 낮았으며, 이것은 모체의 지방 정도가 체외 수정란의 발달능력에 영향을 끼친다는 것을 간접적으로 증명할 수 있는 자료이다.

본 연구 결과(Table 3)에서 육질등급별 체외 생산된 배반포의 품질(배반포의 세포 수)은 근내 지방도에 따른 유의적 차이는 없었다. 이것은 섭식 조절을 통한 비만 쥐 유래의 상실패와 배반포의 세포 수에서는 차이가 없었다는 Minge 등(2008)의 결과와 유사한 결과이다. 그러나 Cerri 등(2009)은 착유우에게 지방 사료를 급식했을 때 배반포의 평균 세포 수가 증가하였다고 보고하였으며, 착유를 통한 고 에너지가 필요한 특정 상황에서는 체지방의 증가가 오히려 좋은 결과가 나타났다는 것은 실험군 모델 선정이 중요하다는 것을 의미한다. 또한 배반포의 품질 평가 중에서 apoptosis가 얼마나 발생하는가도 중요한 지표이다. Apoptosis는 생식세포를 포함하여 모든 세포 집단에서 지속적으로 발생하는 생리적 과정이며, 이러한 과정은 착상 전 배아세포에 있어서 비정상적인, 해로운, 불필요한 세포들을 제거하고, 세포의 수를 조절하는 매우 중요한 기능을 가지며, apoptosis 과정은 자가 파괴의 형태로, 특정 상황에서만 드물게 일어나는 일련의 과정이다(Fabian 등, 2005). 따라서 생식세포인 배반포에서 이러한 apoptosis가 증가한다는 것은 혈액 내에 글루코스나 인슐린 또는 지방 대사물질의 분비 변화

와 같은 비만 모체에 장애를 안정화하려는 일련의 과정이라 할 수 있다. 체외수정란에 있어 높은 글루코스나 높은 인슐린의 분비 또는 렙틴 등과 같은 비만 관련물질의 apoptosis 유발과의 연관성은 이전 연구에서 다양하게 보고되고 있다(Moley 등, 1998; Chi 등, 2000; Boelhaue 등, 2005). 최근 Kubandova 등(2014)은 쥐에게 사료급여 조절을 통한 체지방의 변화를 유도한 뒤 혈장 내 렙틴, 인슐린, 글루코스, 콜레스테롤과 중성지방의 농도를 측정할 결과, 체지방이 높은 그룹에서 인슐린과 글루코스의 농도가 유의적으로 증가함을 보고하였고, 또한 모체의 비만과 배반포에서의 apoptosis에 관한 연관성을 보고하였다. 젖소 난포액의 경우, 지방산과 중성지방의 농도는 낮지만, 혈장과 유의적인 상관관계를 가지고 있다는 보고가 있다(Leroy 등, 2004). 이처럼 혈장과 난포액과의 밀접한 연관성은 다른 수많은 연구(Leroy 등, 2005, Aardema 등, 2011)에서 보고되어지고 있다. 이러한 연구들을 종합하면 한우 모체의 근내 지방 정도에 따라 혈액내의 각종 지방대사 관련 물질의 변화가 있을 것이며, 결국 난포액 내의 조성에도 영향을 미치며, 이것이 차후 체외수정란의 발달에 영향을 주는 하나의 원인일 수 있다. 한편, 렙틴, 아디포넥틴, 레지스틴 등은 지방에서 분비되는 대표적인 대사 호르몬이며, 이들은 에너지 대사에 있어 매우 중요한 조절인자로서 번식에 있어서 영양 공급의 조절과 관련되어 있다(Tersigni 등, 2011). 체지방의 증가는 지방세포에서 혈당 조절 대사 물질인 아디포넥틴과 레지스틴, 인슐린 등의 분비에 영향을 미쳐, 간헐적으로 혈액 내 글루코스 농도가 높아져서 미토콘드리아 작용을 과하게 하여 활성산소(Reactive oxygen species)가 증가하며, 이 활성산소는 DNA 손상, 미토콘드리아 대사 교란, 리소좀 파괴 등 문제를 일으킴으로써 apoptosis의 원인이 된다(Jiazhong 등, 2010). 따라서 이러한 요소들이 육질 1⁺⁺, 1⁺등급 한우 모체 유래의 배반포에 apoptosis 빈도를 높이는 주요 요인일 가능성(Cerri 등, 2009)이 있으며, 향후의 연구에서는 도체 근내 지방도에 따른 난포액 내의 다양한 대사 호르몬 등의 분석을 통해 명확한 원인을 밝힐 수 있을 것이라고 사료된다. 번식에 있어서 비만의 부정적인 측면의 수많은 연구 결과에도 불구하고, 그 상호관계에 대한 명확한 기전은 아직 불분명하다. 렙틴, 아디포넥틴, 레지스틴의 분비 변화, 혈장 내 불포화 지방산과 각종 사이토카인의 농도 변화, 스테로이드 대사 변화, 시상하부-뇌하수체-난소 간의 소통장애 등 다양한 측면으로의 연구가 논의되어지고 있지만, 그 상호 작용간의 매우 높은 복잡성은 비만과 번식과 상호관련 기전에 명확한 해석이 없기 때문에 이 부분에 대한 심도 깊은 지속적인 연구의 필요성을 요구한다.

체외에서 생산된 배반포를 수란우의 자궁에 이식한 경우, 수태율이 Utsumi 등(1993)은 38.3%, Itagaki 등(1993)은 43.0%, Shea(1999)은 58.0%, 김 등(2000)은 22.6%였다는 보고들에 비

해 본 실험의 결과(56.8%)가 약간 높았다. 이것은 아마도 수정란 이식자의 숙련된 기술과 경험, 그리고 수란우의 선정과정의 차이라고 생각한다. 다만 본 연구에서 육질등급이 높은 1⁺⁺, 1⁺ 등급 유래 배반포의 임신율이 1등급 유래의 것보다 낮았다는 것은 앞에서 설명했듯이 모체의 지방과 난자의 발생능력과의 연관 가능성을 생각할 수 있으며, 앞으로 육질 2등급 또는 3등급 유래 체외 수정란의 이식결과에 따라 더욱 명확해질 것이라고 사료되며, 더욱이 가축개량측면에 있어서 모체 육질 등급별 산자의 육질 등급을 조사함으로써 그 유전적 개량 효율의 명확한 측정이 가능할 것이다. 그렇지만 도축장에서 무작위로 채취한 난소유래 난자를 이용한 수정란 이식은 번식 효율 측면에서는 매우 유용할지 몰라도 전체적인 가축 개량의 의미에서는 마이너스적인 요소로 작용할 가능성이 있기 때문에 차후 수정란 이식 기술을 보다 개선해야 할 것이라고 생각한다.

본 연구의 결과를 요약하면 수정란 이식기술을 이용한 한우 개체별 난소 유래 난포란의 배반포의 체외생산 기법은 한우에서 유전자원의 보전 및 유전 형질의 개량 측면에서 충분히 활용이 가능하며, 농가의 경제적 차원에서 수정란 이식기술의 산업적 응용도 가능하다고 사료된다. 또한 본 연구결과에서 한우 도체 근내 지방 정도와 생식능력과의 연관성은 비만과 번식과의 관련 연구를 위한 하나의 효과적인 도구가 될 것이라 사료되며, 나아가서 이러한 연구 결과들은 비만과 난임과의 관련 연구를 위한 하나의 기초 자료가 될 수 있을 것이다.

결론

본 연구는 한우의 품질 개량에 있어서 수정란 이식기술을 이용하여 도축 후 개체별 한우 난소 유래 난포란으로부터 배반포의 체외 생산기법의 접목을 통해 실용적인 한우개량 체계를 정립하기 위해 수행되어졌으며, 한우의 육질개량 측면에서 도축 후 육질등급별로 구분된 한우 개체별 난포란 유래 난자의 체외 발생능력을 검토하였다. 도축 후 한우의 육질등급(1⁺⁺, 1⁺, 1, 2, 3)별 회수한 난포란 수는 난소 1개당 각각 평균 9.5개, 9.4개, 8.5개, 8.8개, 8.8개로서, 1⁺⁺등급과 1⁺등급 그룹에서 유의하게 높았다($p < 0.05$). 각각의 육질등급별 난소로부터 회수한 개체별 난포란을 체외성숙 후의 체외수정율은 각 그룹간(56.2%, 57.7%, 55.8%, 58.8%, 61.7%)에 유의차가 인정되지 않았다($p < 0.05$). 그러나 육질등급에 따른 체외수정란의 배반포의 발달율은 1⁺⁺등급과 1⁺등급(각각 18.2%와 21.3%) 그룹이 1등급, 2등급 및 3등급(각각 29.4%, 30.9% 및 31.5%) 그룹에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 육질등급별로 체외 생산된 배반포의 품질 평가를 위해 TUNNEL assay 결과, 세포자살사 유래 사멸세포수의 비율은 1⁺⁺등급과 1⁺등급(각각 7.0%와 6.9%) 그룹이 1등급, 2등급 및 3등급(각각 4.3%, 4.1% 및 4.3%) 그

룹에 비해 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다($p < 0.05$). 육질 등급별 체외 생산된 배반포의 이식 후 수란우의 수태율은 1⁺⁺ 등급, 1⁺ 등급 및 1 등급에서 각각 53.5%, 52.1% 및 58.0%로서, 1 등급 그룹이 다른 그룹에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$).

이상의 결과를 요약하면 수정란 이식기술을 이용한 한우 개체별 난소유래 난포란의 배양기술은 한우의 유전자원 보전과 유전 형질의 개량 측면에서 활용 가능한 방법이다. 그리고 한우 도체 육질등급과 생식능력과의 연관성은 비만과 번식과의 관련 연구를 위한 하나의 효과적인 도구가 될 것이라 사료되며, 나아가서 이러한 연구 결과들은 비만과 인간의 불임과의 연구에도 하나의 기초 자료가 될 수 있을 것이라고 사료된다.

REFERENCES

- Aardema H, Vos PL, Lolicato F, Roelen BA, Knijn HM, Vaandrager AB, Helms JB and Gadella BM. 2011. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biol. Reprod.* 85:62-69.
- Blondin P and Sirard MA. 1995. Oocytes and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41:54-62.
- Boelhauve M, Sinowatz F, Wolf E and Paula-Lopes FF. 2005. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *in vitro*-produced blastocysts. *Biol. Reprod.* 73:737-44.
- 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.
- Carolan C, Lonergan P, Khatir H and Mermillod P. 1996. *In vitro* production of bovine embryos using individual oocytes. *Mol. Repr. Dev.* 41:145-150.
- Cerri RL, Juchem SO, Chebel RC, Rutigliano HM, Bruno RG and Galvão KN. 2009. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in highproducing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1520-31.
- Chi MM, Schlein AL and Moley KH. 2000. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology.* 141:4784-4792.
- Fabian D, Koppel J and Maddox-Hyttel P. 2005. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology.* 64:221-231.
- Farley D, Tejero ME, Comuzzie AG, Cox L and Werner SL. 2009. Feto-placental adaptations to maternal obesity in the baboon. *Placenta.* 30:752-760.
- Fedorscak P, Dale PO, Storeng R, Ertzeid G, Bjercke S and Oldereid N. 2004. Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. *Hum. Reprod.* 19:2523-2528.
- Igosheva N, Abramov AY, Poston L, Eckert JJ, Fleming TP and Duchon MR. 2010. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS. One.* 5:e10074.
- Itagaki Y, Sato S and Shitanaka Y. 1993. Sexing of bovine embryo with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Sexing of bovine embryo and production of calves with predicted sex. *J. Reprod. Dev.* 39:65-72.
- Sun J, Xu Y, Deng H, Sun S, Dai Z and Sun Y. 2010. Intermittent high glucose exacerbates the aberrant production of adiponectin and resistin through mitochondrial superoxide overproduction in adipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology.* 44:179-185.
- Jungheim ES, Schoeller EL, Marquard KL, Loudon ED, Schaffer JE and Moley KH. 2010. Diet-induced obesity model: Abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. *Endocrinology.* 151:4039-4046.
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y, Koshiba Y, Shiraiwa K and Goto K. 1992. Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *Theriogenology.* 3:264.
- Kredel LI and Siegmund B. 2014. Adipose-tissue and intestinal inflammation-visceral obesity and creeping fat. *Front. Immunol.* 24:5:462.
- Kubandová J, Cikoš S, Burkuš J, Czikková S, Koppel J and Fabian D. 2014. Amount of maternal body fat significantly affected the quality of isolated mouse preimplantation embryos and slowed down their development. *Theriogenology.* 15:81:187-195.
- Lashen H, Ledger W, Bernal AL and Barlow D. 1999. Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and *in vitro* fertilization. *Hum. Reprod.* 14:712-715.
- Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE and de Kruif A. 2004. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 80:201-211.
- Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Dewulf J and de Kruif A. 2004. Metabolic

- changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*. 15; 62:1131-1143.
- Leroy JL, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A, Genicot G and Van Soom A. 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction*. 130:485-95.
- Lewis CG, Wames GM, Wang X and Matthews CD. 1990. Failure of body mass index or body weight to influence markedly the response to ovarian stimulation in normal cycling women. *Fertil. Steril*. 53:1097-1099.
- Luzzo KM, Wang Q, Purcell SH, Chi M, Jimenez PT and Grindler N. 2012. High fat diet induced developmental defects in the mouse: Oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects. *PLoS. One*. 7:e49217.
- Mermillod P, Wils C, Massip A and Dessy F. 1992. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. *J. Reprod. Fert*. 96:717-723.
- Minge CE, Bennett BD, Norman RJ and Robker R. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. *Endocrinology*. 149:2646-2656.
- Moley KH, Chi MM and Mueckler MM. 1998. Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos. *Am. J. Physiol*. 275:38-47.
- Ponter AA, Parsy AE, Saadé M, Mialot JP, Ficheux C and Duvaux-Ponter C. 2006. Effect of a supplement rich in linolenic acid added to the diet of post partum dairy cows on ovarian follicle growth, and milk and plasma fatty acid compositions. *Reprod. Nutr. Dev*. 46:19-29.
- 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*. 49:459-462.
- Shea BF. 1999. Determining the sex of bovine embryo using polymerase chain reaction results: A six-year retrospective study. *Theriogenology*. 51:841-854.
- Styne-Gross A, Elkind-Hirsch K and Scott RT. 2005. Obesity does not impact implantation rates or pregnancy outcome in women attempting conception through oocyte donation. *Fertil. Steril*. 83:1629-1634.
- Tersigni C, Di Nicuolo F, D'Ippolito S, Veglia M, Castellucci M and Di Simone N. 2011. Adipokines: New emerging roles in fertility and reproduction. *Obstet. Gynecol. Surv*. 66:47-63.
- Thangavelu G, Colazo MG, Ambrose DJ, Oba M, Okine EK and Dyck MK. 2007. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 68:949-957.
- Thibier M. 2001. Identified and unidentified challenges for reproductive biotechnologies regarding infectious diseases in animal and public health. *Theriogenology*. 56:1465-1481.
- Wakefield SL, Lane M, Schulz SJ, Hebart ML and Thompson JG. 2008. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanism involved in oocyte and early embryo development in the mouse. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 294:425-434.
- Wathes DC, Abayasekara DR and Aitken RJ. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol. Reprod*. 77:190-201.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Shultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev*. 30:330-338.
- Wittermer C, Oh J, Bailly M, Bettahar-Lebugle K and Nisand I. 2000. Does body mass index of fertile women have an impact on IVF procedure outcome. *J. Assist. Reprod. Genet*. 17:547-552.
- Wu B and Zan L. (2012). Enhance beef cattle improvement by embryo biotechnologies. *Reprod. Domest. Anim*. 47:865-871.
- Zullo F, Di Carlo C, Pellicano M, Catizone C, Mastrantonio P and Nappi C. 1996. Superovulation with urinary human follicle-stimulating hormone: Correlations with body mass index and body fat distribution. *Gynecol. Endocrinol*. 10:17-21.
- Utsumi K, Hayashi M and Takakura R. 1993. Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryo. *Mol. Reprod. Dev*. 34:25-32.
- 고광두, 정길생, 이기만. 1981. 한우의 수정란이식에 관한 연구 III. 수정란의 비외과적 채취와 이식. *한국축산학회지*. 23: 331-337.
- 김용준, 정구남, 이해이, 조성우, 김용수, 유일정. 2000. 한우 체외수정란 Biopsy 후 PCR 기법을 이용한 성판정과 성감별 수정란의 이식. *한국수정란이식학회지*. 15:219-230.
- 김영훈, 고진철, 오창언, 강승률, 강보석, 오성중, 김창능, 송중용, 김일화. 2006. CIDR를 이용한 제주한우 및 흑우의 체내 수정란 생산과 이식. *한국수정란이식학회지*. 21:191-198.
- 박성재, 양보석, 임기순, 성환후, 양병철, 장원경, 정일정, 정기화, 심보웅, 박충생. 2000. 한우에 있어서 초음파기기를 이

- 용한 생체내 개체별 난자 채취 빈도 및 수정란 생산 효율에 관한 연구. 한국수정란이식학회지. 15:1-8.
- 박용수, 김소섭, 박흠대, 박현정, 김재명. 2005. 한우 체외수정란이 이식된 수란우의 임신과 유산에 영향을 미치는 수정란 측 요인. 한국수정란이식학회지. 20:89-95.
- 박희성, 이지삼, 진종인, 박준규, 홍승표, 이명열, 정장용. 2001. 유전자 분석을 통하여 선발된 한우로부터 초음파 유래 체외수정란 이식에 의한 고품질 한우 생산기술의 실용화 II. DNA 검정우로부터 초음파 유래 체외수정란의 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지. 16:193-201.
- 조성근, 노국진, 이정국, 이효종, 최상용, 박충생. 1992. 체외배양 조건이 소 체외 수정란의 생산에 미치는 효과. 한국수정란이식학회지. 15:271-277.
- 황환섭, 장현용, 김성근, 김종택, 박춘근, 정희태, 김정익, 양부근. 2004. 한우 체외성숙 · 체외 수정란의 수정란 이식에 관한 연구. 한국수정란이식학회지. 19:1-10.

Received May 24, 2015, Revised June 3, 2015, Accepted August 27, 2015