



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월07일
(11) 등록번호 10-1390536
(24) 등록일자 2014년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61D 19/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0033861
(22) 출원일자 2013년03월28일
심사청구일자 2013년03월28일
(56) 선행기술조사문헌
논문1 - THESIS, CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY*
논문2 - KOREAN J. EMB. TRANS.*
KR1020050056846 A
KR1020100125907 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(73) 특허권자
전라북도 임실군(임실군 농업기술센터장)
전라북도 임실군 임실읍 수정로 30
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김민규
대전광역시 중구 수침로 122, 101동 703호(태평동, 푸른피아파트)
박연배
대전광역시 중구 산서로 615(정생동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 6 항

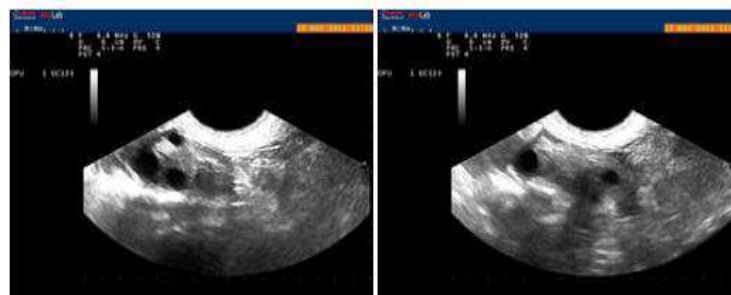
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 수정란 이식기술을 이용한 고능력 한우의 대량생산방법

(57) 요약

본 발명은 유전능력이 우수한 고능력 공란우를 선발하여 생체 내 난자를 채취하여 우수한 수정란을 생명공학 기법과 수정란 이식 기술 등에 의해 대량 번식시킴으로써 농가에서 한우의 우량 유전자원을 확보, 보존 및 유지 시키고, 나아가 고급육 생산 체계를 갖추어 침체된 한우 사육농가의 소득 증대와 수입육에 대한 차별화된 한우의 경쟁력을 확보하기 위한 모델과 기술을 제공한다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

한길우

대전광역시 유성구 문화원로47번길 16-1, 303호(궁동)

이준현

대전광역시 유성구 어은로 57, 103동 606호(어은동, 한빛아파트)

이경본

세종특별자치시 진의면 평전말길 15-4

장욱

전라북도 임실군 관촌면 상월로 533-9

이기곤

전라북도 임실군 오수면 금암3길 19

정일윤

전라북도 임실군 임실읍 봉황로 232

이성구

전라북도 임실군 임실읍 이도리 이도타운 C동 306호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-1936

부처명 임실군 농업기술센터

연구사업명 임실 우량한우 육성사업 연구용역

연구과제명 생명공학 기법을 이용한 임실군 우량한우 육성사업

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.14 ~ 2011.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

우량 공란우 또는 종모우를 선별하기 위해 하기 표에 기재된 5개의 SNP 중 어느 하나 이상의 SNP 존재 여부를 확인하는 단계;

초음파 진단기를 이용하여 OPU(Ovum Pick Up)로 선정된 우량 공란우로부터 난자를 채취하는 단계;

채취된 난자를 종모우 유래의 정자와 체외 수정시키는 단계;

상기 체외 수정된 수정란을 플라즈미노겐 활성화자(plasminogen activator)가 첨가된 배양액으로 배양하여 배반포를 형성시키는 단계; 및

발정 동기화시킨 수란우에 상기 배반포를 도입시키는 단계를 포함하는 우량 한우 생산방법.

번호	SNP	SNP 명칭
1	서열번호 1의 염기서열에서 171번째의 염기인 G가 C로 치환된 SNP	CAPN1-316
2	서열번호 2의 염기서열에서 62번째의 염기인 T가 C로 치환된 SNP	CAPN1-4751
3	서열번호 3의 염기서열에서 68번째의 염기인 T가 G로 치환된 SNP	CAPN3
4	서열번호 4의 염기서열에서 49번째의 염기인 A가 G로 치환된 SNP	CAST
5	서열번호 4의 염기서열에서 86번째의 염기인 T가 C로 치환된 SNP	CAST
6	서열번호 5의 염기서열에서 198번째의 염기인 A가 G로 치환된 SNP	FASN

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 SNP 존재 여부를 확인하는 것은 PCR-RFLP 방법, 또는 PCR product Sequencing을 통해 확인하는 것을 특징으로 하는 우량 한우 생산방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 채취된 난자는 CO₂ 3 내지 7 %(v/v)가 공급되는 배양기를 이용하여 12 내지 32시간 성숙시키는 것을 특징으로 하는 우량 한우 생산방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 플라즈미노겐 활성화자(plasminogen activator) FGF10인 것을 특징으로 하는 우량 한우 생산방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 난자를 채취하는 단계는 상기 우량 공란우로부터 자연상태에서 1주일에 1회 내지 3회 난자를 채취하는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 우량한우 생산방법

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항 내지 제3항, 제5항 또는 제6항 중 어느 한 항의 방법으로 생산된 우량 한우.

명세서

기술분야

[0001] 생명공학 기법과 수정란 이식 기술에 의해 고능력 한우를 대량 번식시켜 경제성을 확보하고, 한우의 우량 유전 자원을 확보, 보존 및 유지시키고, 나아가 고급육 생산 체계를 갖추기 위한 고능력 한우의 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 한우의 가격은 주로 육질등급에 의하며, 육질에 관한 특성은 60% 이상 유전에 의하는 것으로 알려져 있으므로 우량 한우의 유전자를 확보하고 우량 한우를 생산하는 것은 축산농가의 경제성 확보를 최선의 지름길이며, 또한 우수한 형질을 보전 후대에 전달하기 위해서도 필수적이다.

[0003] 그러나 현재 국내의 경우 체계적인 수정란 이식 프로그램의 부재로 말미암아, 수정란 이식 효율이 외국에 비해 현저히 낮고, 우량 한우 생산 체계가 수소 위주로 되어있어 계량의 속도가 더딜 뿐만 아니라 효과 또한 미비한 상태이다. 즉 고능력 한우의 생산은 주로 종모우 즉 숫소의 능력만 후대 검증된 결과로 하여 유전능력 평가가 이루어지고 공란우는 외관이나 선대의 능력을 더하여 평가하는데 그치게 되므로 자손이 실제로 우수한 형질을 갖지 못하게 되는 경우가 있으며, 또한 국내의 한우는 우량형질과 혈통이 고정된 암소의 수가 적을 뿐만 아니라 그 이용 또한 매우 낮은 실정이다. 또한 도축우로부터 난자를 채취하는 방법은 난자의 질이 저하되어 수정율이 낮아 수정란의 등급이 저하되고, 수태율이 떨어지는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1064313호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 창출된 것으로 우수한 형질을 갖는 한우를 선별 하여 축산농가에 공급하고 우수한 유전자를 보전하기 위해서 DNA 마커 등 유전기술을 이용하여 우량 공란우 또는 종모우를 선별하기 위해 특정 SNP의 존재 여부를 확인하는 단계, 초음파 진단기를 이용하여 OPU (Ovum Pick Up) 선정된 우량 공란우로부터 난자를 채취하는 단계, 채취된 난자를 종모우 유래의 정자와 체외 수정시키는 단계, 체외 수정된 수정란을 배양하여 배반포를 형성시키는 단계, 및 발정 동기화시킨 수란우에 상기 배반포를 도입시키는 단계를 포함하는 우량 한우 생산방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 우량 공란우 또는 종모우를 선별하기 위해 하기 표에 기재된 5개의 SNP 중 어느 하나 이상의 SNP 존재 여부를 확인하는 단계; 초음파 진단기를 이용하여 OPU(Ovum Pick Up)로 선정된 우량 공란우로부터 난자를 채취하는 단계; 채취된 난자를 종모우 유래의 정자와 체외 수정시키는 단계; 체외 수정된 수정란을 배양하여 배반포를 형성시키는 단계; 및 발정 동기화시킨 수란우에 상기 배반포를 도입시키는 단계를 포함하는 우량 한우 생산방법을 제공한다.

번호	SNP	SNP 명칭
1	서열번호 1의 염기서열에서 171번째의 염기인 G가 C로 치환된 SNP	CAPN1-316
2	서열번호 2의 염기서열에서 62번째의 염기인 T가 C로 치환된 SNP	CAPN1-4751
3	서열번호 3의 염기서열에서 68번째의 염기인 T가 G로 치환된 SNP	CAPN3
4	서열번호 4의 염기서열에서 49번째의 염기인 A가 G로 치환된 SNP	CAST
5	서열번호 4의 염기서열에서 86번째의 염기인 T가 C로 치환된 SNP	CAST
6	서열번호 5의 염기서열에서 198번째의 염기인 A가 G로 치환된 SNP	FASN

[0007]

[0008]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 SNP 존재 여부를 확인하는 것은 PCR(Polymerase Chain Reaction)-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 방법 또는 PCR product Sequencing 방법을 통해 확인할 수 있다.

[0009]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 채취된 난자는 CO₂ 3 내지 7 %(v/v)가 공급되는 배양기를 이용하여 12 내지 32시간 성숙시킬 수 있다.

[0010]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 수정란을 배양하는 단계는 플라즈미노겐 활성화자(plasminogen activator)가 첨가된 배양액으로 배양할 수 있다.

[0011]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 플라즈미노겐 활성화자(plasminogen activator) FGF10일 수 있다.

[0012]

본 발명의 일실시예에 있어서, 발정동기화는 배반포 도입 이전 8일 내지 10일부터 호르몬을 수란우에 처리하여 유도하는 것일 수 있다.

[0013]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 호르몬은 PGF2alpha(PG: prostaglandin F2), GnRH(Gonadotropin Releasing Hormone), PMSG 및 에스트로겐 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0014]

또한, 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 생산된 우량 한우를 제공한다.

발명의 효과

[0015]

본 발명은 첫 번째 기술적 측면에서 난포발달유도 처리 없이 난자의 채란 기술 개발 및 확립하기 위한 것으로서 체내에서 생산된 우수 난자를 활용한 수정란 생산기술의 확립하여 임신군의 고능력 한우 수정란 이식을 통한 품종개량 및 대량생산할 수 있다.

[0016]

또한 고능력 한우의 수정란 생산비용의 절감하기 위한 것으로서 높은 육질관련 유전형질을 보유한 개체를 선택하여 우량 후대축 양산하고, 최상의 체외수정방법 확립으로 최상의 수정란 생산하여 수태율 극대화 한다.

[0017]

또한 수란우의 상태 측정으로 최상의 수태율 획득하여 새로운 육질우수 한우 축종군 형성하고 암소개량 효과 증대할 수 있다.

[0018]

두 번째로 경제적인 측면에서 저비용 과난포유도제 처리에 의한 우량 유전자 보유난자 채란 기술 확립하기 위해 수태율(50% 이상)의 증진에 따른 농가소득 향상시키고, 체내난자를 이용한 수정란 생산 및 이식기술의 실용화한다.

[0019]

또한 우수유전자를 갖고 있는 한우의 수정란 이식을 통한 품종개량 및 대량생산할 수 있으며, 고능력 한우의 개량 체계 확립으로 한우사육 농가의 경쟁력 강화 및 산업화가 가능하며, 고능력 한우의 균일화된 고급육 제품 생산으로 농가 직접적인 고소득 창출 농가단위의 우수 한우유전자원 확보 및 경쟁력 증대에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 CAPN1-316 유전자 171번 뉴클레오타이드의 SNP를 도시한 것이다.

도 2는 CAPN1-4751 유전자 62번 뉴클레오타이드의 SNP를 도시한 것이다.

도 3은 CAPN3 유전자의 68번 뉴클레오티드의 SNP를 도시한 것이다.

도 4는 CAST 유전자의 49번 뉴클레오티드의 SNP를 도시한 것이다.

도 5는 CAST 유전자의 86번 뉴클레오티드의 SNP를 도시한 것이다.

도 6은 FASN 유전자의 RFLP(restriction fragment length polymorphism)한 결과를 도시한 것이다.

도 7은 초음파기기 영상화면을 도시한 것이다.

도 8은 5두의 공란우로부터 개월별 OPU를 실시한 결과의 평균 값을 도시한 것이다.

도 9는 각각의 공란우에서 횡수별 난자회수율의 평균 값을 도시한 것이다.

도 10은 체외 수정된 모습을 도시한 것이다.

도 11은 배반포를 염색한 사진을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명에서는 한우의 효율적이고 지속적인 개량 및 농가소득 증대를 위해 수정란 이식 기술의 활용도 및 효율성을 높이고자 첨단 유전체 기술(DNA 마커)를 적용하였다.

[0022] 축산 선진국의 경우 육량·육질 관련 유전자를 발굴하기 위하여 지난 십 수 연간 막대한 예산을 투입하여 실용화 할 수 있는 DNA 마커들을 지속적으로 발굴해왔으며, 이들을 이용할 경우, 수정란이식 기술을 체계적으로 개선할 수 있다. 본 발명에서는 유전모수의 추정을 시도하였으나 관련 농가의 협조가 이루어지지 않아 DNA마커를 이용한 선진화된 방법을 이용하여 공란우를 선발 하였다. 이에 충남대학교 동물자원학과 유전학실험실과 공동 연구를 통하여 한우에서 유질 및 육량과 관련된 유전자 CAPN1-316, CAPN1-4751, CAPN3, CAST와 불포화지방산인 올레인산과 관련 있는 유전자 FASN를 발견 적용하였다.

[0023] 본 발명에서 우량 한우란 우수한 유전인자를 가지고 있어 수소의 체계적인 사양관리 하에서 고급육에 대한 기대형질이 우수하며, 암소의 경우는 농가 밀소로 공급됨으로 생산품질 균일화를 이룰 수 있도록 생산된 소를 말한다.

[0024] OPU란 (Ovum Pick-up) 난자직접채취기술로서 살아있는 암소의 난소에서 초음파 기구를 이용해 난자를 직접 채취하는 첨단기술이다. OPU방식이 기존의 수정란 생산 방법과 다른 점은 첫째로 난자 채취용 암소(공란우)에 호르몬을 사용하지 않아 암소의 건강과 번식기관의 안전성을 확보할 수 있다. 둘째로 4개월간 50개 이상의 수정란을 생산할 수 있어 기존 방식보다 더 많은 우량 송아지를 생산할 수 있다.

[0025] 발정동기화란 한우는 성숙이 되고 임신이 되지 않았을 경우에 평균 21일을 주기로 발정을 나타내므로 소사육 농가는 매일 발정을 관찰하여야 하며 발정주기를 놓치게 되면 번식우의 추가 사육비가 소요된다. 특히 과거에 비해 사료의 질이 좋아지고 사양관리 상태가 호전되고 있는 반면 운동량이 부족하고 체지방축적이 과다히 발생하는 원인이 되어 오히려 발정증세가 미약한 개체가 증가하여 우군의 발정관찰이 쉽지 않다. 따라서 발정동기화 방법은 난포의 발육과 성숙을 인위적으로 유도하거나 황체를 퇴행시켜 발정이 오게 하는 방법과 또 하나는 황체 존속을 연장시켜서 일정한 시간에 발정과 배란이 되게 하는 방법이 있다. 그동안 보급된 발정동기화용 호르몬제는 그 목적에 따라 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 난포의 발육과 성숙을 억제시키는 것으로는 프로게스테론 또는 그것과 생리작용이 유사한 프로게스테론 유사체가 있으며 황체를 퇴행시키는 것으로는 PGF2 제제 혹은 그 유도체가 사용되고 있다.

[0026] 본 발명은 우량한우를 선별하고 정자와 난자를 채취한 후 체외수정한 후에 다시 이식하는 우량한우의 유전자원을 개량하고 보존하는 방법을 제공하는 것에 그 특징이 있다.

[0027] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0028] <실험예>

- [0029] 사업을 희망하는 한우 농가 중 세 농가를 선별 이후 약 32마리의 후보 공란우를 선별, 채혈을 통한 유전적 능력 검증을 하였다. 유전적 능력 검사는 한우의 육질과 육맛을 결정하는 SNP마커를 사용하여 분석한 결과를 바탕으로 최종적으로 5마리의 공란우를 선발한 후 구매절차에 따라 공란우 5마리를 구매, 이후 청양 충남대학교 동물자원연구센터로 이송하여 철저한 사양관리를 통해 공란우를 사육하여 채란되고 있다.
- [0030] OPU관련 초음파기기를 2010년 12월 02일 구입하여 청양 충남대학교 동물자원 연구센터에서 주2회의 채란을 실시하여 수정란을 생산하고 있으며, 수정란의 생산효율은 다배란처리에 의한 체내수정란 생산(년20-40개) 효율보다 월등히 높은 채란율을 나타내었다(년 120-150개).
- [0031] 사용된 정자는 농협한우개량사업소에서 생산되는 육질형 정자를 구입하여 사용하였으며, 그 중 수정란 생산효율이 높은 정자를 선별하여 사용하였다. 정자의 사용은 근친을 방지하기위하여 1개월단위로 개체를 교환하여 사용하였다.
- [0032] 생산된 수정란은 수정란 이송시간을 단축하고, 외기 노출시간을 줄이기 위하여 휴대용 항온 인큐베이터에 넣어 신속히 운반하여 농가까지 도달하는 시간을 3시간 이내로 지정하여 실시하였으며, 수정란의 이식은 경험이 풍부한 수정사 및 수의사가 직접 실시하였으며, 수정란 이식 10일전부터 발정동기화처리 및 자궁 내 환경분석을 통하여 실시하였다.
- [0033] 수정란의 이식은 난소의 상태 및 발정현상을 임상적으로 판단하여 실시하였으며, 비정상적 발현이 있는 수란우는 수정란 이식에서 배제하였으며, 임신진단은 농가의 청원에 의하여 일괄적으로 수행하기로 하였고 농번기를 피해 겨울철에 실시하여 보고하였다.
- [0034] <실시예 1>
- [0035] 우량 공란우 선정
- [0036] <1-1> 후보 공란우 선정 및 채혈
- [0037] 임실군 내 한우사육 농가 중 세 농가를 선정하고, 건강상태, 임신여부, 나이, 산자, 영양상태 등을 고려하여 후보 공란우를 선정하였다. 또한 유전적 능력 확인을 위해 우량한우로 제공된 총32두의 혈액을 채취하여 유전자 검사를 실시하여 육질관련 유전자가 발현되는 5두의 공란우를 선발하였다.
- [0038] <1-2> 후보 공란우 유전적 마커 확인
- [0039] 본 발명에서는 한우의 효율적이고 지속적인 개량 및 농가소득 증대를 위해 수정란 이식 기술의 활용도 및 효율성을 높이고자 첨단 유전체 기술(DNA 마커)를 적용하였다.
- [0040] 도 1 내지 도 5는 CAPN1-316, CAPN1-4751, CAPN3, CAST 유전자를 탐색하기 위한 마커를 사용한 결과를 나타내었다.
- [0041] 도 6은 불포화지방산인 올레인산과 관련 있는 유전자 FASN를 확인하기 위해 RFLP 테스트 결과를 나타내었다.

표 1

[0042] 육질에 관련된 형질의 선별 마커

No	Sample ID	CAPN1-316			CAPN1-4751			CAPN3			CAST			FASN			목장 주명
		SNP g.5679 C>G			SNP g.6545 C>T			SNP g.46415 G>T			SNP g.134897 T>C			SNP g.17924 G>A			
		CC	CG	GG	CC	CT	TT	GG	GT	TT	TT	TC	CC	GG	GA	AA	
12	8869	X			X			X			X			X			김xx
17	7414	X			X				X		X			X			이00
18	7111	X			X			X			X			X			신yy
27	3098	X				X		X			X			X			김xx
30	8260	X				X		X			X			X			김xx
%		66.70%	20%	13.30%	43.30%	46.70%	10.00%	73.30%	23.30%	3.40%							

- [0043] 1. SNP g.5709 C>G of CAPN1-316 gene containing G allele was associated with increased shear force and C was less associated with shear force The SNP was different with our SNP (g.5679 C>G).
- [0044] 2. SNP g.6545 C>T of CAPN1-4751 gene was associated more tender in CC&CT genotype compare to TT genotype.
- [0045] 3. SNP of CAST gene having CC&TC genotype was more tougher than TT genotype.
- [0046] 4. SNP of CAPN3 gene having GG genotype had increased meat tenderness than other genotype.
- [0047] 5. CAST 5) SNP position is same with SNP patent (Barendse et al., 2002).
- [0048] 칼페인(calpain: CAPN)은 동물세포의 중성시스테인단백질 가수분해효소이며, postmortem tenderization 시 첫 번째 효소 역할을 하여 Warner Bratzler Shear Force scores를 줄여 고기의 연도에 영향을 주는 유전자로 알려져 있으며, 도축 후 도체의 단백질을 분해하여 육질이 부드러워 질 수 있도록 하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0049] 칼페스타틴(calpastatin: CAST)는 분자량 72,000~75,000의 칼페인을 특이적으로 저해하는 단백질로서 칼슘 존재에서만 칼페인과 복합체를 형성하며 칼페인의 활성중심과 직접 결합하는 것이 아니고 활성중심영역을 덮어서 저해한다. 분자에는 약 152잔기의 4개의 반복영역이 있어, 각각 1분자의 칼페인을 저해할 수 있다.최소 저해단위는 아미노산이 약30잔기이다. 대부분은 세포질에 일부는 막에 결합하여 존재하며 육질의 연도에 영향을 미치고 있는 것으로 알려져 있다.
- [0050] 한우의 육량과 육질을 유전적으로 향상시키기 위한 연구의 결과로 FASN유전자가 알려졌으며, 39번 exon에서 발견된 SNP 가운데 GG형을 가진 개체들은 AG형이나 AA형을 가진 개체들 보다 고기내 불포화지방산의 함량이 높은 것으로 나타났다. 이는 불포화지방산을 높이는 유전자로서 GG형을 많이 가질수록 등지방 두께가 얇고 등심단면적이 큰 것으로 활용하였다.

표 2

[0051] SNP의 위치와 프라이머 세트

Primer Set for <i>Calpain</i> and <i>Calpastatin</i> , SNP location and genotyping (based on sequencing result)									
Gene Name/gene marker name	GenBank	Primer set	Location	PCR 산물 크기	SNP 위치	Genotyping (Sequencing)	Restriction enzyme (bp)	References	
	Acc. No.								
CAPN1/CAPN1-316	AF 252504	F: 5' -GAGCTGGCCCTCATAAGATA A- 3'	Exon 9	220 bp	g.5679 C>G	CC = 20 (66.7 %)	BceAI	Page et al., 2002 &	
		R: 5' -CCCATCCTCCATCTTGACC- 3'					GG : 124, 65 & 31 bp		
							CG = 6(20.0 %)		GC : 155, 124, 65&31
							GG = 4(13.3 %)		CC : 155 & 65 bp
CAPN1/CAPN1-4751	AF 248054	F: 5' -AAGGGACAGATGTGGACAGG - 3'	Intron 17	144 bp	g.6545 C>T	CC = 13 (43.3 %)	BsaJI	White et al., 2005	
Chromosome 29		R: 5' -GAGGGGTGTTCTCTGAGTGC - 3'				CT = 14 (46.7 %)	CC : 80, 62 & 62		
						TT = 3(10.0 %)	TT: 142		

CAPN3	NC_007308	F: 5 ' -ATTGCATGGCCTCCTGAC- 3'	Intron 12 (46347-46573)	226 bp	g.46415 G>T	GG = 22 (73.3 %)	No restriction enzyme	Baren dse et al., 2008
(Chromosome 10)		R: 5 ' -CTCCAGAACACCTCTGGACT G- 3'				GT = 7(23.3 %)		
						TT = 1(3.3 %)		
CAST	NC_007305	F: 5 ' -CCTCACGTGTTCTTCAGTGT - 3'	Exon 32 134414 ...>136458	150 bp	g.134869 A>G g.134897 T>C	TT = 12	No restriction enzyme	Baren dse et al., 2002 (Pate nt)
(Chromosome 7)		R:5 ' -ACGATTAGCAGCTCAAGAGG A- 3'				CC = 3		
FASN (Chromosome 19)	AC_000176	F : 5 ' -TCTTCACAGAGCTGACGGAC - 3'	Exon 39		g.134869 A>G	AA = 27	DdeI	
		F: 5 ' -GGAGGAAGAGCTGTTGCAGT - 3'				AG = 2	AA : 46, 104	
							AG : 46, 104, 150	
							GG : 150	

[0052] <1-3> 후보 공란우 질병 검사 및 구매

표 3

[0053] 농가별 가축 질병 검사 결과

번호	축주명	축종	채혈 장소	채혈일자	검사일자	검사 두수	브루셀라	결핵병	구제역	백혈병
계	3호					5				
1	이00	한우	농장	20101126	20101202	1	전두수 음성	전두수 음성	전두수 음성	전두수 음성
2	김xx	한우	농장	20101126	20101202	3	전두수 음성	전두수 음성	전두수 음성	전두수 음성
3	신yy	한우	농장	20101126	20101202	1	전두수 음성	전두수 음성	전두수 음성	전두수 음성

표 4

[0054] 개체별 가축 질병 검사 결과

혈청번 호	축주명	축종	성별	개체번호	브루셀라	결핵병	구제역	백혈병
1	이00	한우	암	047074143	음성	음성	음성	음성
2	김xx	한우	암	174288693	음성	음성	음성	음성
3	김xx	한우	암	188682609	음성	음성	음성	음성
4	김xx	한우	암	201730980	음성	음성	음성	음성
5	신yy	한우	암	044971113	음성	음성	음성	음성

[0055] 3농가에서 선발된 5두의 전염병검사를 전북 가축위생시험소에 의뢰하여 검사를 실시한 결과 1종 가축전염병인 브루셀라, 결핵, 구제역, 백혈병에 감염되지 않은 것으로 판정되어 공란우로 적합한 것으로 인정되었다.

[0056] <실시예 2>

[0057] 공란우 채취 및 수정

[0058] <2-1> 초음파진단장비

표 5

[0059] 초음파 진단장비의 용도 및 특징

A. 특징
(1) OPU(난포내 난자 채취)시스템으로 활용
(2) 소나 폐지의 임신진단 유,무를 조기에 판정하거나, 번식기질환 유,무를 진단하는데 사용
(3) 소나 폐지의 특정부위에 대한 초음파 촬영 화상자료를 토대로 육질 평가에 활용
(4) 이동이 간편하고 현장에서 사용하기 편리하게 제작됨
(5) 여러 동물의 내과, 심장진단이 가능한 color Doppler 초음파
C. 용도
(1) 소 난포 내 난자 채취를 통한 배반포 생산 및 우량한우 육성
(2) 수정란 이식 이후 임신 진단

[0060] 초음파 가이드 난자채취 장비를 구입함으로써 우량 공란우로부터 지속적 난자의 채취가 가능하였다.

[0061] <2-2> 난자 채취

[0062] 공란우를 한 마리씩 보정틀에 보정을 하고 Lidocaine 2%을 이용 국부 마취를 통해 공란우의 움직임을 최소화 한 후 보정된 공란우 장 속에 변을 제거한 이후 난소를 집어 올린 뒤 OPU 프로브를 질내 삽입하였다.

[0063] 초음파 진단장비의 영상을 통하여 난소의 follicle을 확인 이후 난자를 펌프를 사용 빼내어 바로 선별하는 과정을 거쳤다. 선별된 난자는 0.25 straw에 넣은 후 간이 난소 운반기를 사용 실험실로 이송하였다.

[0064] 도 7은 초음파기기 영상화면을 나타낸 것으로서 기기를 통해 가이드하면서 난자를 확인하고 채취하는 모습을 나타낸 것이다.

[0065] <2-3> 체외 수정

[0066] 실험실로 이송한 난자를 체외수정 절차에 따라 실험을 진행하였으며, CO₂ 5% 배양기를 이용 난자를 약 22시간 성숙시켰다. 동결된 고능력 우량 한우 정자를 이용, 해동을 한 뒤 성숙이 완료된 난자에 정자를 뿌려 체외수정을 하였다.

[0067] 체외수정 이후 CO₂ 5%, O₂ 5% 배양기를 이용 약 7일 동안 배양을 하였다. 배양이 끝난 수정란 중 질이 좋은 수정란을 선별 이식에 사용하였다.

[0068] 도 8은 체외 수정을 통해 수정시킨 수정란을 나타낸 것이다.

표 6

[0069] 체외에서 OPU유래 난자의 배반포 발달율

Treatment	Total no. oocytes	Embryo development		
		Cleavage (%)	Morula (%)	Blastocysts (%)
control	165	125 (75.8%) ^a	64 (38.8%)	31 (18.8%) ^b
OPU	162	99 (61.1%) ^b	55 (34.0%)	46 (28.4%) ^a

[0070] a-b Within a column, means without a common superscript differed, P < 0.05. control (slaughterhouse-derived ovaries)

[0071] 상기 표 6은 도축장에서 채취한 난소로부터 얻은 난자의 배반포 형성을 보다 OPU를 통해 얻은 난자가 배반포 형성율이 높아 이식시 수태율에 안정적 영향을 미칠 것으로 판단된다.

[0072] <실시예 3>

[0073] 수태율 향상 프로그램

[0074] <3-1> 발정동기화 프로그램

[0075] 수란우의 발정동기화 방법은 수년간의 경험에서 가장 수태율이 좋은 방법을 사용하였으며, 수란우의 발정주기에 따라 PGF2alpha, PMSG 등을 사용하여 발정을 유도하고, 수정란 이식전 난소의 상태를 정확히 확인한 후 시술을 실시하여 수태율을 극대화할 수 있도록 노력하였다. 그 결과 발정동기화율은 82%의 높은 성적을 나타내었다.

표 7

[0076] 수란우의 발정동기화 비율

총 처리 두수	발정동기화 두수(%)	비동기화 두수(%)
326	267(81.9)	59(18.1)

[0077] <3-2> 이식배지의 성분조성

[0078] 이식효율향상을 위하여 이식배지에 플라스미노젠 액티베이터 (plasminogen activator)인 FGF10을 첨가하여 이식 효율을 향상시켰다.

[0079]

[0080] <3-3> 수란우의 자궁환경 조사

[0081] 이식전 경험이 풍부한 수정사 및 수의사가 자궁의 질환여부를 확인하여 자궁내 염증, 자궁비후, 자궁의 기형 등을 판별하여 건강한 자궁을 지닌 수란우에만 수정란 이식을 수행하였다. 총 이식 두수 중 5두의 난소 이상관찰, 3두의 자궁염증이 관찰되어 치료 및 도태를 추천하였다.

[0082] <3-4> 우량 공란우 채란 효율향상 프로그램

[0083] 우량 육질 및 육맛의 소인의 유전자를 지닌 공란우를 선발하여 OPU를 실시하여 체외수정란을 생산한 결과 수정란 이식이 가능한 배반포의 형성율이 일반적인 도축장 유래의 우량 난자보다 높은 결과를 나타내었다.

표 8

[0084] OPU 방법에 의해 채취된 난자의 체외수정 후 배발달율

처리군	총 실험 난자수	배 발달율		
		분할율 (%)	상실배 (%)	배반포 (%)
대조군	165	125 (75.8%)	64 (38.8%)	31 (18.8%)
OPU	162	99 (61.1%)	55 (34.0%)	46 (28.4%)

[0085] 선발된 우량 공란우에서 OPU를 실시하여 난자 회수율을 기간별, 횟수별로 조사한 결과 평균 4-5개월간 OPU를 실시하였을 때 많은 난자를 확보할 수 있었으며, 이는 1주일에 2회 실시하였을 때 40회가 넘어가면 난자 회수율이 현격하게 저하되는 현상과 일치하였다.

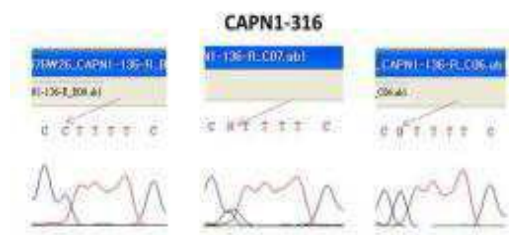
[0086] 도 8은 5두의 공란우로부터 개월별 OPU를 실시한 결과의 평균 값을 나타낸 것이며, 도9은 각각의 공란우에서 횟수별 난자회수율의 평균 값을 나타내었다.

[0087] <실시예 4>

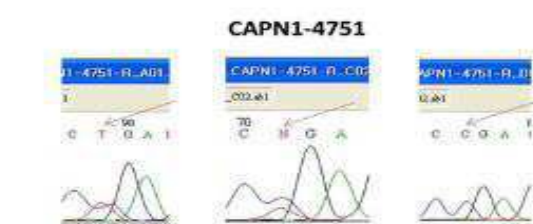
- [0088] 수정란의 검수
- [0089] <4-1> 수정란의 형태학적 검수
- [0090] 수정란의 형태학적 판단은 국제수정란이식학회(IETS)의 분류기준에 따라 1차 선별(자체)한 수정란을 무작위 선발하여, 국립축산과학원 유전자원시험장(남원소재)에서 검사한 결과 양호한 것으로 판정되었다.
- [0091] <4-2> 배반포의 세포수 검사
- [0092] 양질의 배반포를 선별하기 위하여 형성된 배반포의 세포수는 매우 중요한 의미를 가짐으로 무작위 배반포를 선발하여 세포수 검사를 수행하였다. 검사방법은 국제표준 방법에 의하여 수행하였으며, 검사결과 배반포의 세포수는 모두 100개 이상의 1등급 수정란으로 판별되었다. 도 10은 수정란의 사진이며 도 11은 배반포를 염색한 사진을 나타낸 것이다.
- [0093] <실시예 5>
- [0094] 수란우에 이식 및 분만
- [0095] 자궁관내 이식 시 환경 호르몬의 변화가 있으므로 국소 마취가 필요하며, 발정주기는 21일로써 발정동기화를 위한 호르몬제는 루틸라이즈와 PG를 사용하였다. PG(prostaglandin F2)의 경우 주사부위가 자궁근에 주사를 하였다.
- [0096] 루틸라이즈 또는 루텔라이스탄 천연프로스타글란딘 PGF2a를 함유하고 있는 제제이며, 특이적인 황체용해 작용과 자궁평활근을 강력하게 수축시키는 작용이 있어 유도분만은 물론, 분만 후에 적용하여 자궁 및 생식기 질환을 획기적으로 개선시켜 번식성적을 향상시켜주며, 수란우의 발정주기에 따라 PGF2alpha(PG: prostaglandin F2), GnRH(Gonadotropin Releasing Hormone), PMSG 및 에스트로겐 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0097] 분만시에 암수를 구별 하며, 수정란 이식으로 태어나는 소의 경우 수소의 비율이 조금 높다. 약 285일 이상 지나면 태어나 수란우가 위험하므로 유도 분만을 하는 것이 유리하다.
- [0098] 수란우는 미경산이 수태율은 약 5%정도 높지만 태아가 커서 분만이 어렵다. 사료의 경우 건조와 TMR사료를 3~4개월 급여하는 것이 좋으며 농후 사료는 줄이고 건조 비율을 높여주어 비육이 안 되도록 하는 것이 수태율 향상에 도움이 된다.
- [0099] 숫컷 정자가 강한 경향으로 인해 수정란이식으로 태어난 송아지의 경우 수소의 비율이 높지만, 정자 분리 기계를 사용하여 암컷 정자만을 이용하는 경우 암소의 비율을 높일 수 있다. 백신 주사의 경우 이식 2주 전에 완료하는 것이 이식에 영향을 미치지 않는다.
- [0100] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

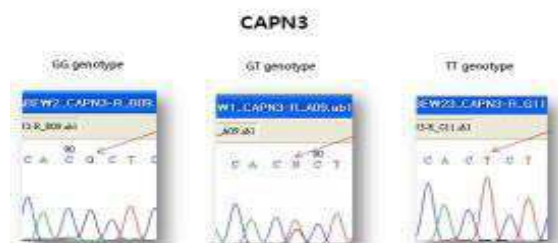
도면1



도면2



도면3



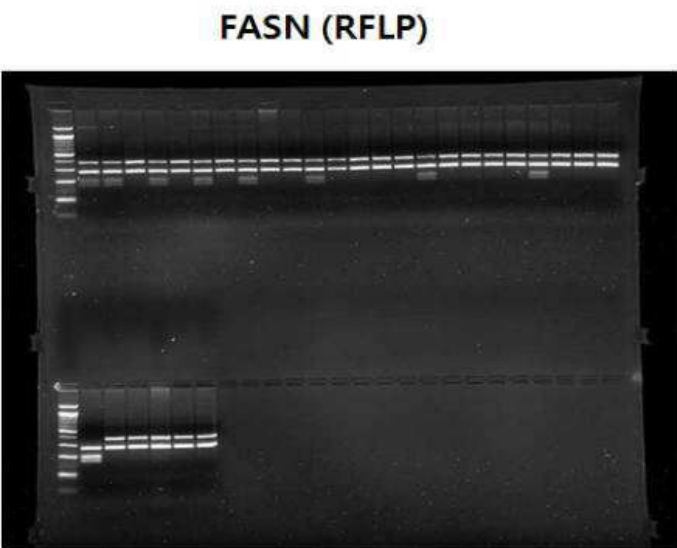
도면4



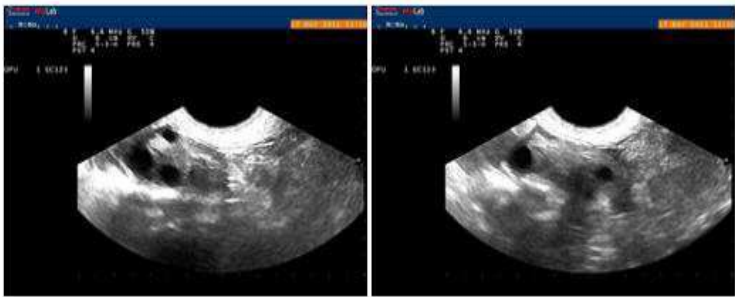
도면5



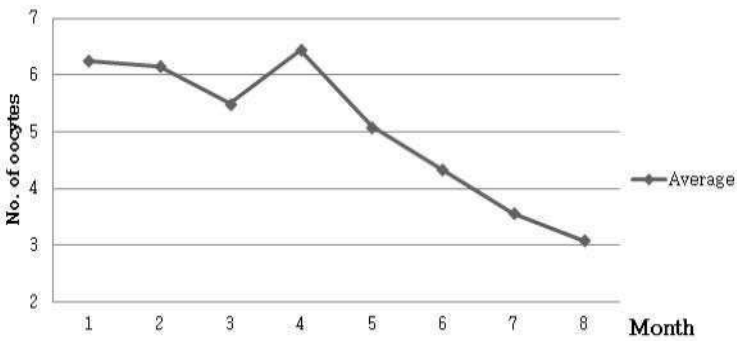
도면6



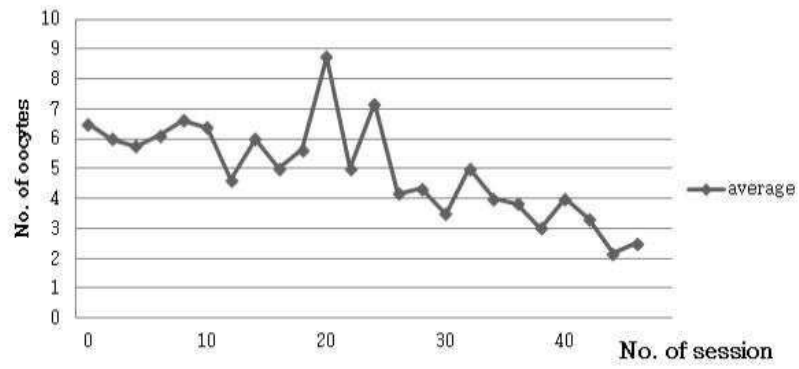
도면7



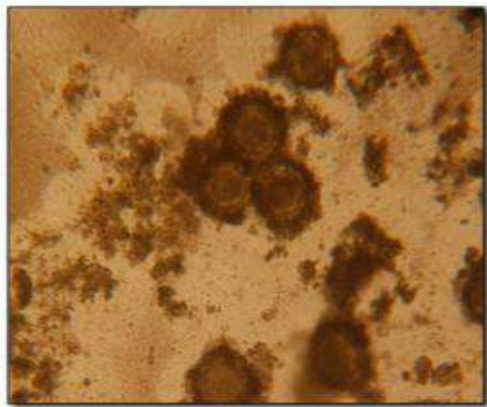
도면8



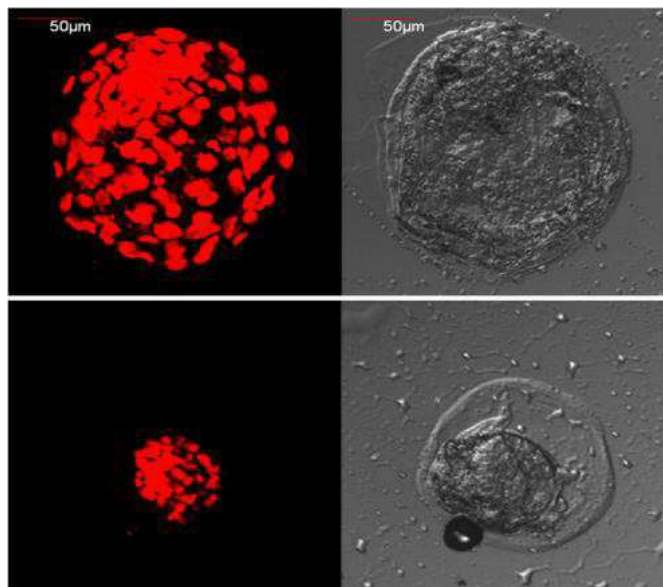
도면9



도면10



도면11



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)