8174024-03

과제명
소 정자 특이결합 단백질을 이용한 선택적 성 조절용 제품 및 정액생산 최종보고서

2019

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( )발간등록번호(O)

기술사업화 연구개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003 203-01

소 정자 특이 결합 단백질을 이용한 선택적 성 조절용 제품 및 정액 생산

최종보고서

2020.07.17.

주관연구기관 / 주)누리사이언스
협동연구기관 / 상지영서대학교

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "소 정자 특이 결합 단백질을 이용한 선택적 성 조절용 제품 및 정액 생산"(개발기간 : 2017. 05. ~ 2019. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 17.

주관연구기관명 : 주) 누리사이언스 (대표자) 김동구 (인)

협동연구기관명 : 상지영서대학교 산학협력단 (대표자) 김주섭 (인)

주관연구책임자 : 김동구

협동연구책임자 : 엄상준

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>8174024-03</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>1</td><td>단 계 구 분</td><td>(해당단계)/
(총 단 계)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">기술 사업화 지원 사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">소 정자 특이 결합 단백질을 이용한 선택적
성 조절용 제품 및 정액생산</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">소 정자 특이 결합 단백질을 이용한 선택적
성 조절용 제품 및 정액생산</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">김 동구</td><td>해당단계
참여연구원
수</td><td>총: 8 명
내부: 8 명
외부: 0 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부: 300,000천원
민간: 10,000천원
계:400,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원
수</td><td>총: 15 명
내부: 15 명
외부: 0 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:800,000천원
민간:267,000천원
계:1,067,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">주) 누리사이언스 부설 연구소</td><td colspan="2">참여기업명</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	공 개

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)	보고서 면수

요약문

<table>
<tr><td>연구의
목적 및
내 용</td><td colspan="5">소 성조절 기술은 소 축산물 생산성 향상을 위해 매우 중요함. 현재의 기계적인 정자분리기술의 낮은 수태율과 활용의 한계를 극복할수있는 새로운 기술 개발이 필요함. 전 세계 최초로 개발된 단백질 정자 분리 제제를 이용해 목적하는 성을 지닌 소의 생산을 위한 기반 기술을 확립하고 시험관 및 생체 검증을 통한 실용화 제품을 개발하고자 함.</td></tr>
<tr><td>연구개발
성 과</td><td colspan="5">1. 성감별용 제제 생산 및 정자 결합 특성
소 성 감별용 단백질 제제의 무혈청 배지를 이용한 대량 생산, 정제 분리 체계를 구축하여 안정적인 제품생산 시스템 확립. 수태율에의 영향을 고려하여 단백질 제제의 정자 운동성 및 활력도에 미치는 영향을 분석한 결과 정자에의 안정성이 검증되었음. 본 제제를 이용해 목적 성의 소(숫소, 암소) 생산을 위한 90%이상의 고효율로 X정자 및 Y 정자를 분리 방법이 확립되었음.
2. 소 성감별용 단백질의 효능 검증
소 성감별용 단백질 제제인 홀맘을 이용해 소 동결정액 방법에 따른 체외수정 방법 개발을 통해 검증한 결과 암컷 배반포 수정란이 85.4%이상 생산되었음이 확인되었고 홀맘이 처리된 정자에서 Y-정자를 분리하여 체외수정란 생산방법 개발 및 수컷 배반포 76.5% 생산되었음. 또한 동결정액의 홀맘처리 후 한우를 대상으로 하는 인공수정을 실시한 결과, 72.0%의 비율로 암컷이 생산되었으며 동결정액의 홀맘처리 후 체외수정 유래 배반포를 대리모에 이식하여 72.7% 암컷이 생산된 결과를 확보하였음. 또한 목적 성의 소 생산 횻율의 극대화를 위하여 원정액에 홀맘을 처리 후 성 감별용 동결정액 생산 및 보관 방법 을 개발하였음. 홀맘 처리 성감별용 동결보존 정액을 이용하여 체외수정을 실시하여 수정란을 대상으로 하는 유전자 검증 결과, 95.8%의 높은 비율로 암컷 배반포 수정란의 생산이 확인되었음. 본 방법에 의해서 응집된 Y 정자만을 회수하여 체외수정 후 74.2% 수컷 배반포 생산 결과를 확보하였음. EM grid 동결용기를 이용한 소 배반포의 초자화 동결방법을 개발함.</td></tr>
<tr><td>연구개발
성과의
활용계획
(기대효과)</td><td colspan="5">본 연구과제를 통하여 동결정액 인공수정, 체외수정란 생산 및 원정액 적용 제품 개발이 완료되었음. 국내 젖소 및 한우를 비롯해 전 세계 3억 마리의 젖소와 10억 마리의 비육우를 대상으로 개발된 제품을 시판하고자 함. 본 과제를 통하여 브라질, 베트남, 중국, 미국등 다양한 나라에서의 판매 계약을 추진하여 글로벌 판매를 통해 막대한 수출효과를 기대함</td></tr>
<tr><td>국문핵심어
(5개 이내)</td><td>홀맘</td><td>성 조절 키트</td><td>성감별정액</td><td>체외수정</td><td>항체 단백질</td></tr>
<tr><td>영문핵심어
(5개 이내)</td><td>WholeMom</td><td>Sexing Kit</td><td>Sexed sperm</td><td>IVF</td><td>Antibody protein</td></tr>
</table>

〈 목 차 〉

표지
요약문
목차
1. 연구개발과제의 개요 ---------- 1

2. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 4

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도---------- 46

4. 연구결과의 활용 계획 ---------- 51

붙임. 참고문헌 ---------- 53

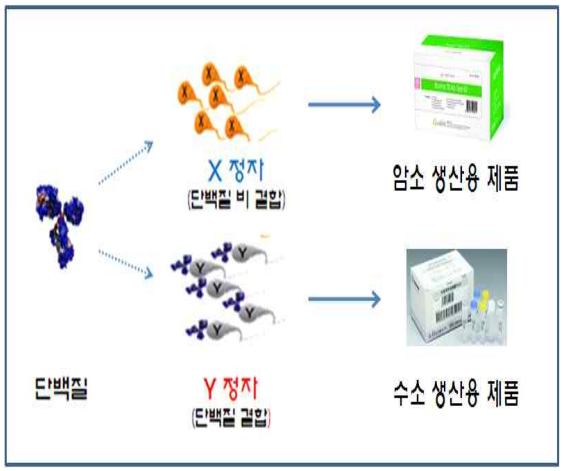
1. 연구개발과제의 개요

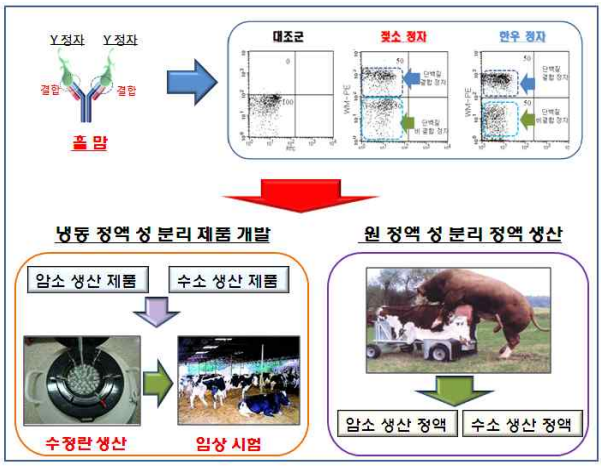
1-1. 연구개발 목적

1. 연구 개발의 목표

본 연구과제는 전 세계 최초로 개발된 소 성조절용 단백질 제제를 이용해 소 정자에서의 결합 특성, 정자 운동성과 활력도에 미치는 영향 분석, 목적 성의 소 생산을 위한 X정자 및 Y정자 분리 방법 확립 및 이를 통해 실제 수정란 생산 및 인공수정을 통한 생체 시험을 통해 개발된 단백질의 성 조절 효능을 검증하고자 함. 또한 이를 통해 개발된 제품의 글로벌 제품 판매를 위한 산업화용 제품개발을 추진하고자 함.

[소 성 조절용 단백질 제제를 활용한 성 조절용 제품 개발 개요]





2. 제품 개발 내용

소 Y 정자 특이적 결합 특성을 지니고 있는 항체 단백질 제제인 홀맘을 이용해 본 연구과제 수행을 통하여 다음과 같은 제품개발을 통한 산업화용 제품개발을 추진 함.

가. 성 조절 바이오 제제 생산 기반 기술 확립

○ 성 조절용 단백질 생산 세포주의 무 혈청 배양 기술 개발

○ 무 혈청 세포 주 대량 배양 및 단백질 정제 기술 확립

나. 성 조절된 수정란 생산을 위한 성 조절 키트 제품 개발

○체외 수정란 생산에 적용 가능한 냉동정액 성 분리 조건 확립

○ 수정란 이식을 통한 임상 효능 평가 및 수태율과 효능 검증

다. 성 감별 정액 생산을 위한 제품 개발

○ 고효율 성 감별 정자 생산을 위한 바이오 제제 활용 성 분리 최적 기술 확립

○ 바이오 제제 적용 성 분리 정자의 운동성 및 정자 생존성 검증

○ 성 감별 냉동정액의 임상 효능 평가를 통한 수태율과 성비 조절 효능 검증

1-2. 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

○ 수정란의 성별은 정자의 성 염색체가 X,Y 염색체 중 어느 것인가에 따라 결정됨.

○ 정자의 성별을 감정하여 분리하는 기술은 일반적으로 DNA 함유량에 따른 Percoll gradient 원심분리법과 Flow cytometry를 이용한 분리방법, 그리고 Fluorescence in situ hybridization(FISH)을 통한 X와 Y염색체를 형광 dye를 이용하여 염색한 뒤 flow cytometry를 이용하여 분리하고 있지만, 분리되는 과정에서 발생하는 자극에 의해 생식능력이 급격히 떨어져 large scale의 산업화는 어려운 실정임.

○ DNA 함유량에 따른 Percoll gradient 원심분리법은 생식능력의 저하는 적지만, 높은 정확도로 정자의 성별을 감별할 수 없으며, Flow cytometry 분리방법과 Fluorescence in situ hybridization(FISH)를 통한 염색 분리법은 높은 정확도로 정자의 성별을 감별할 수 있지만, 정자에 형광염료를 강제적으로 결합시키는 과정을 거치기 때문에 정자에 많은 자극이 발생할 뿐만 아니라 정자에 손상을 주기도 함.

○ 현재 정자의 단백질을 이용한 성별 감별법은 1999년 Blecher 연구팀에 의해 소의 Sex specific proteins (SSPs)을 이용하여 분리를 시도하였나, 소의 암컷과 수컷의 donor tissue를 이용하여 제작한 비 특이적 항체를 사용하였으며, 각 항체간의 유의적 차이를 나타내지 못했음. 더욱이 SDS-PAGE를 통한 단백질의 분석이 명확하게 되지 않아 특이적인 성별 감정 단백질을 발견하지 못함.

○ 정자의 표면의 특이적인 단백질을 이용한 정자의 성별 분리 기법은 높은 효율의 분리가 가능하며, 정자에 자극이 거의 없어 IVF와 같은 인위적인 수정과정 및 인공수정을 통해서 높은 수태율을 보일 것으로 예상됨.

○ 따라서 정자의 성별분리를 위한 정자 표면 특이적인 단백질을 이용한 정자의 성별 분리 기법은 '맞춤형 개체 생산'의 실용화 및 상업화를 위해 필수적임.

2. 경제적·산업적 중요성

○ 최근 축산 농가는 육우, 낙농, 번식 등 세분화된 농장의 형태로 변화하고 있으며, 각 농장의 전문성에 따라 선호하는 성별의 개체가 다름. 선호하지 않는 개체의 생산으로 인해 농장에서는 불필요한 수요가 발생함.

○ 가축의 인위적인 성비 조절은 농장 경영에 있어서 효율적인 계획 관리 및 특수목적 (구제역과 같은 전염병의 발생으로 인한 모체의 부족)을 위해 이용될 수 있으며, 낙농가에서는 암컷 개체, 육우 및 한우농장에서는 수컷을 필요로 함.

○ 각 축산 농가에서는 우수한 형질을 가진 개체를 이용한 품종개량을 통해 각 농장의 전문성에 맞는 개체를 생산하고자 함. 우수한 형질을 가진 개체를 이용한 품종개량은 암수의 선별이 불가능하여 자연적인 선택에 의하여 개량하게 되므로 많은 시간과 비용이 소모됨.

○ 암수 정자를 분리하는 기술은 flow cytometry를 이용한 방법과 DNA의 함량에 따른 Percoll gradient 원심분리와 같은 방법을 통해 지속적으로 연구되었으나, 산업화가 가능한 large scale의 연구는 진행되지 않음. 산업화가 가능한 large scale의 연구는 축산 농가의 경제적·산업적인 도약을 위해 반드시 필요한 실정임.

○ ‘맞춤형 개체 생산’은 우수한 형질을 가지고 있는 개체를 이용한 품종 개량에 드는 시간과 비용을 절감할 수 있으며, 우수한 형질의 개체를 대량 생산하여 국내 축산농가의 경제적·산업적 이윤을 증대시킬 수 있음.

1-3. 연구개발 범위

1. 홀맘 단백질 활용 연구개발 내용

○ 성 조절용 단백질 생산 세포주의 무 혈청 배양 기술 개발
○ 무 혈청 세포 주 대량 배양 및 단백질 정제 기술 확립
○ 홀맘 단백질을 이용한 암소/숫소 선택적 생산용 정액 성 분리제품 개발
○ 원 정액을 이용한 암소/숫소 생산용 성감별 정액 대량 생산 기술 개발
○ 성 선택 가능한 체외 수정란 생산을 위한 제품 개발

2. 홀맘 단백질 제품화 효능 검증

○ 성 조절 수정란 생산 키트 제품(암컷 또는 수컷용)을 이용해 각 제품별 총 500-1000개의 수정란을 대상으로 암컷 또는 수컷 수정란 생산 성비를 검증.
○ 성비 조절 수정란 생산 키트를 적용하여 생산된 암컷 또는 수컷 수정란을 한우/젖소에 수정란 이식을 총 200-300개 이식하여 분만되는 소의 성비를 검증함.
○ 암컷 성 감별 냉동 정액을 이용해 200-300개의 냉동정액으로 인공수정을 실시하고 수태율 검증, 성비 효율 검증을 실시함.
○ 수컷 성 감별 냉동 정액을 이용해 200-300개의 냉동정액으로 인공수정을 실시하고 수태율 검증, 성비 효율 검증을 실시함.

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 추진 전략

1. 성 특이 단백질 관련 기술을 기반으로 소 정자의 성분리 기술 및 제품 개발을 추진

○ (주) 누리사이언스는 성 특이 단백질의 대량 생산 및 정제를 통하여 본 연구과제의 제품 개발을 위한 최적의 조건을 확립함.

○ 생산된 단백질 제제를 활용해 한우 및 젖소 정액을 활용해 최종 개발 제품의 효율 및 최적의 성능을 지닌 제품을 개발

○ 상지영서대학은 개발된 핵심 기술이 산업화에 적용될 수 있도록 실제 농가에서의 인공수정/수정란 이식을 실시하고, 체외수정란을 생산하여 현장 실용화 부분을 담당

2. 기술정보수집

○ 국내외 학회 참석 및 학술지를 통한 연구개발기술 수집

○ 국내외 협력기관과의 상호교류를 통한 연구개발기술 수집

○ 국내외 기술정보 사이트를 통한 연구개발기술 수집

3. 연구과제 협력 공조 및 추진 방법

○ 과제 참여 연구진은 동물 분자생물학, 세포생물학, 단백질공학, 생명공학, 면역학 등의 전문가로 구성되어 정자 생리학 및 동물 번식에 대해 충분한 경험을 가지고 있으며, 새로운 분야의 연구에 대해서는 수시로 연구기획 회의를 할 것임.

○ 또한 월 1회 이상의 과제 추진회의를 통해 문제점을 해결하고, 과제 진행 방향을 검토하여 조기에 목표한 성과를 도출할 것임.

○ 산업현장에서의 임상 시험은 지역 축협 및 횡성지역의 다수 농가와 협약을 맺어 신뢰성 있는 결과를 도출

4. 정액 공급 협력 방안

○ 횡성 축협과의 협력을 통하여 한우 원정액 채취를 비롯해 축협내의 한우 정액 냉동보관 프로토콜에 따라 성 감별용 냉동정액제조 및 공급을 위한 원활한 협력 체계를 구축하여 본 과제를 수행하였음.

[연구수행 내용 및 전문 협력 기관]

항 목	주요 연구 수행 내용	연구 수행 기관 및 전문 협력 기관과 내용
바이오 제제 생산	성 감별 바이오 단백질 대량 생산 기반 구축	- (주) 누리사이언스
	성 감별 바이오 제제의 정제 기술 확보	
임상 시험용 제품화	암소 생산용 성 감별 제품화 개발 및 효능 검증	- 상지영서대학교 - 한우 및 젖소 농가를 대상으로 임상 시험
	수소 생산용 성 감별 제품화 개발 및 효능 검증	
체외 수정란 생산 제품화	체외 성 감별 수정란 생산을 위한 키트 개발	- (주) 누리사이언스, 상지영서대학교 - 체외 수정란 성 조절 키트 효능 검증
선택적 성 감별 정액 생산	원 정액을 이용한 선택적 성 감별 정액 분리 방법 개발	- 상지영서대학교 : 원정액 공급 및 선택 성감별 정액 냉동 보관
	원 정액을 이용한 선택적 성 감별 정액 분리를 통한 효능 검증	- 상지영서대학교 : 선택적 정액 생산 기반 기술 : 선택적 성 조절 수정란 생산 : 제품의 효능 및 임상 시험

2-2. 연구개발 추진 체계

1. 누리사이언스

○본 연구과제의 핵심 단백질 제제인 홀맘 단백질의 대량 생산 및 정제를 통하여 본 연구개발을 위한 최적의 단백질 제제 생산 시스템을 구축함.

○ 생산된 단백질 제제를 이용한 냉동 정액 및 원 정액을 이용해 다음과 같은 다양한 제품 개발 연구를 추진 할 예정임.

① 소 성 감별용 바이오 단백질 제제를 생산하고 있는 세포 주를 대량 생산을 위하여 무혈청 배지에서의 배양 세포 주를 확립하고 실제 단백질 생산 효능을 검증하여 안정된 세포 주를 확립함.

② 체외 수정용 성감별 키트 제품 개발을 위하여 체외 수정 전에 정액을 간단하게 전처리 할 수 있어 난자와 체외수정을 통하여 목적하는 성을 지닌 수정란을 생산할 수 있는 키트를 개발함.

③ 원 정액을 활용한 성 감별 냉동정액 생산을 위하여 단백질 제제를 활용해 원정액을 활용해 최적의 성감별 정자 생산 조건을 확립하여 생존성과 운동성이 높은 성감별 냉동정액을 생산함.

2. 상지 영서대학교

○ 제 1 세부과제에서 개발된 제품군에 대해서 확립된 체외수정란 생산을 통하여 체외에서 각 제품의 효능을 평가하고 가장 이상적인 제품의 선발과 메뉴얼을 개발하고자 함.

○ 또한 개발된 목적별 선택별 성을 조절하여 생산할 수 있는 제품을 활용해 실제 한우 및 젖소 사육 농가를 대상으로 하는 임상 시험을 실시하여 실제 제품의 효능을 평가할 예정임.

[연구 협력 추진 체계]

3. 기관별 연구 수행 역할

가. 누리사이언스

○ 단백질 대량 생산

가축 성 조절용 단백질 생산 세포주의 안정적인 대량 확보를 시행하고 또한 무 혈청 배지에서 목적 단백질을 대량 생산할 수 있는 세포주를 확보하여 해외 수출용 단백질 생산용으로 활용함.

○ 냉동 정자 성 분리(암컷. 수컷) 기술 확립

냉동 정액을 이용해 성 조절용 단백질을 이용해 원심분리 및 Percoll을 이용한 비중 분리 기법으로 X 정자 또는 Y 정자를 분리 할 수 있는 기술을 확립하고 각 기술에 따른 정자의 생존성 및 운동성을 점검하여 가장 간단하면서 고 효율의 성 분리 정자를 분리해 낼 수 있는 기술을 개발함.

○ 수정란 생산을 위한 성 조절 키트 개발

상기의 방법에 의해서 구축된 기술을 토대로 실제 수정란 생산 업체 및 기관에서 사용

할 수 있는 키트 제품을 개발함. 실제 제품의 사용 방법 및 사용 효능을 면밀하게 점검함.

○ 원 정액의 성 분리를 위한 최적 조건 검토

냉동 정액과 달리 원 정액을 사용한 정액 분리를 위한 조건 설정을 위해서는 정자의 운동성 제어 및 시간등 다양한 조건을 검토한 후에 실시되어야 하며 또한 단백질 농도에 따른 정액의 성 분리 효능을 검증하여 최적의 성 분리 조건을 확립함.

○ 암컷 생산용 냉동 정액 생산 조건 확립

상기의 방법에 의해서 확립된 기반 조건을 토대로 암컷 냉동 정액을 해동 해 응집된 정액의 응집 유지 유무 및 정자의 운동성과 생존성 등을 면밀하게 점검하고자 함.

○ 수컷 생산용 냉동 정액 생산 조건 확립

단백질의 농도 조절에 따른 Y 정자의 운동성에 미치는 영향을 분석하여 제품의 생산 여부를 결정하고자 함.

나. 상지 영서대학교

○ 수정란 및 원 정액 확보 체계 구축

본 과제의 수정란 대량 생산을 통한 수정란 성 조절 제품의 효능 평가를 위해서는 난소를 통한 난자의 대량 확보가 매우 중요함. 또한 원정액을 이용한 성 감별 냉동 정액 생산을 위해서는 원정액을 확보 가능한 횡성 축협과의 협약을 시행함.

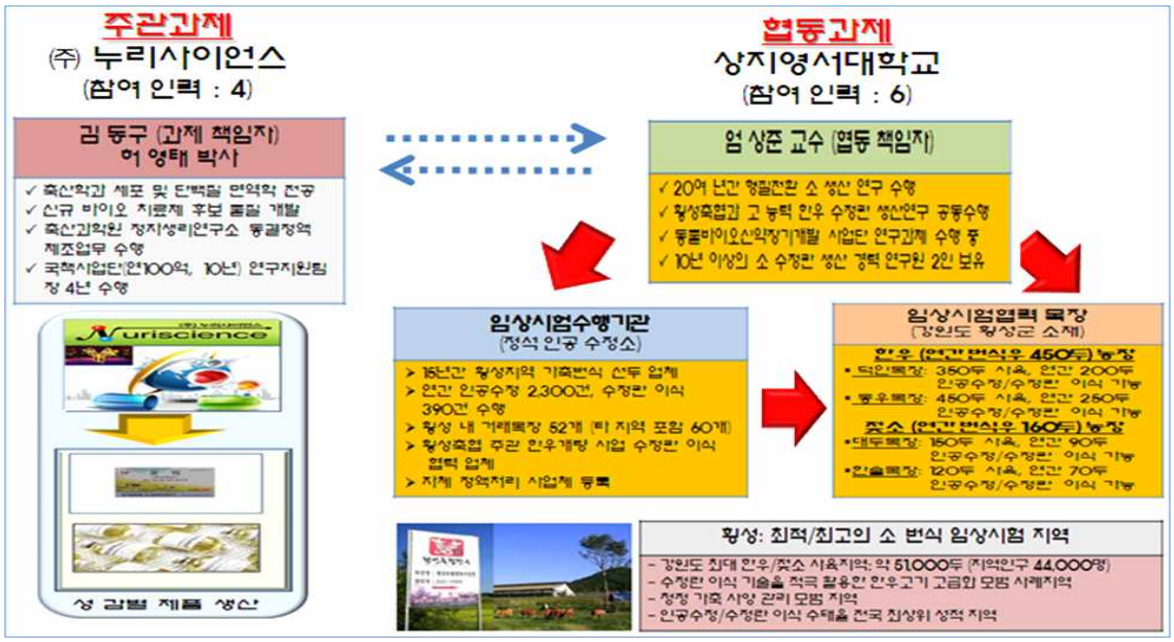
○ 수정란 성비 검증 방법 확립

생산된 수정란 성비 조절 키트를 활용해 확보된 난자와의 체외수정을 실시하고, 확보된 수정란의 성비 조절 및 키트의 효능 여부를 수정란의 유전자 검증을 통하여 확인함. 또한 가장 최적의 성비 조절용 키트를 활용해 제작된 수정란을 실제 한우 및 젖소 농장에의 이식을 실시하고, 각 개체마다의 정성적인 결과 도출을 위한 관리 대장을 작성하여 임상 효능 결과를 확보함.

○ 성 감별 냉동 정액 생산 및 임상 효능 평가

확보된 횡성 축협의 한우 정액을 대상으로 성 감별된 냉동정액을 이용해 한우 사육 농장에 공급하여 인공수정을 통하여 임상 시험을 실시하고 철저한 임상시험 대장을 작성하여 향후 분만되는 모든 송아지의 성비 및 발육과정을 추적 조사함.

[연구 기관별 연구 협력 체계]



2-3. 연구개발 추진 일정

1차년도													
일련번호	연구내용	월별 추진 일정											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	단백질 생산 세포주 배양												
2	무 혈청 배지 생산 세포주 확립												
3	원심분리 활용 정자 분리 기술 확립												
4	X 정자 분리 및 정자 순도 측정												
5	Y 정자 분리 및 정자 특성 분석												
6	인공수정용 제품의 체외 효능 평가												
7	제품의 임상 효능 평가												
2차년도													
1	키트 제품의 정자 활력 및 생존성 검증												
2	암소 생산용 키트 제작 및 수정란 효능 평가												
3	수소 생산용 체외 수정란 생산 키트 제작												
4	체외수정란 키트의 효능 평가												
5	수정란 이식을 통한 제품의 효능평가												
3차년도													
1	원 정액 정자 응집 반응 최적 조건 확립												
2	암소 생산용 냉동 정액 생산 및 정자 운동성 평가												
3	수소 생산용 냉동정액 생산 및 평가												
4	체외 수정란 생산을 통한 냉동 정자 효능 평가												
5	임상 시험을 통한 성감별 정액 효능 평가												

2-4. 연구개발 내용 및 방법

가. 소 성감별 단백질 홀맘의 소 정자 결합 특성 분석

(1) 유세포 분석기를 이용한 정자 세포 분석

현재 국내에서 구입 구입 가능한 젖소(홀스타인) 및 한우 냉동 정액을 이용해 홀맘 단백질의 정자 결합 특성을 분석하기 위하여 37도에서 약 10초간 해동을 실사하고 홀맘 단백질을 첨가하여 실온(20-25도)에서 약 30분간 반응 시킨 후, 두 번의 PBS(-)로 세척을 실시항고 second antibody로 anti-Rat-PE 항체를 첨가하여 반응 시킴. 반응 후 정자에의 결합 여부를 Flow cytometry를 사용해 분석을 실시함. 또한 시판되고 있는 Hochest 33342에 의해서 분리된 젖소 성 감별 정액을 구입해 성감별 정액에서의 홀맘 단백질의 결합 특성을 유세포분석기를 이용해 분석하였음.

(2) Hoechst33342 dye를 이용한 홀맘 단백질의 결합 특성 분석

ST genetics사에서 생산하는 성감별 냉동정액은 Hoechst 3342 형광염색물질을 반응시킨 후에 유세포분리기를 이용해 형광 강도의 차이를 이용해 X정자 또는 Y정자를 분리하여 시판하고 있음. 이 정자 분리방법은 현재 전 세계적으로 인정되고 있는 방법으로서 본 홀맘 단백질의 Y정자 특이적인 결합 여부를 판별하기 위하여 한우 및 젖소 정자를 상기위 방법과 동일하게 형광염색을 37도에서 약 30분간 실시한 후, 홀맘 단백질의 면역염색을 실시함. 그후 second antibody로 anti-Rat-PE로 염색을 실시한 후 UV가 장착된 Flow cytometry기기를 이용해 X정자 또는 Y정자 부분만을 gating해 홀맘 단백질의 결합 특이성을 분석 실시함.

(3) PCR 유전자 검증을 이용한 홀맘 단백질의 특이적 정자 결합 특성 분석

Flow cytometer 기기를 이용해 한우 정자와 결합된 홀맘 단백질양성 정자와 음성 정자를 분리하여 정자 염색체를 분리 한 후, BSP primer, 5′-TTTACCTTAGAACAAACCGAGGCAC-3′, 5′-TACGGAAAGGAAAGATGACCTGACC-3′(538bp)와 BY primer 5′-CTCAGCAAAGCACACCAGAC-3′, 5‘-GAACTTTCAAGCAGCTGAGGC-3’(300bp)를 사용해 95C 20sec, 52C 45sec, 72C 50sec, 45 cycles로 PCR검증을 실시하였음. 2%의 agarose gel로 PCR band의 사이즈를 측정하였음.

(4) 현미경을 이용한 홀맘 면역염색을 이용한 정자 결합 특성 분석

한우 정자를 이용해 홀맘 단백질의 1차 면역염색을 실시하고 2번 PBS(-)로 washing을 실시한 후, second antibody로 anti-Rat-PE 항체로 염색을 실시함. 형광 현미경을 이용해 면역염색된 정자를 관찰하여 홀맘 단백질의 정자 결합부위 특성을 분석하였음.

(5) FISH방법에 의한 홀맘 단백질의 결합 특성 분석

홀맘 단백질이 Y 정자 특이적인 결합 특성여부를 판별하기 위하여 해동 소 정자에 홀맘 단백질을 처리 한 후, 응집반응을 유도하고 응집된 정자에 Y 염색체 특이적인 probe를 이용해 FISH분석을 실시하였음.

나. 소 성조절용 단백질 생산 세포주의 무혈청 배지 개발 및 확립

소 성감별 제품 생산을 위하여 소혈청 첨가 배지를 이용한 세포배양 및 단백질 생산기법은 소 혈청 단백질속의 다양한 물질이 혼합될 가능성이 존재함. 따라서 소 성조절용 단백질은 생산 세포주에서 분리 및 정제하여 제품화를 하고 있으나 혈청이 함유된 배지를 사용하면 단백질만을 정제 및 분리하는데 어려움이 따름. 따라서 무혈청에서 단백질 생산 세포주를 장기간 또는 대량으로 배양 할 수 있는 배지를 사용하면 정제 분리가 간편하며 이에 따른 경제적으로 막대한 효과와 더불어 혈청 함유에 따른 부작용을 막을 수 있음. 따라서 시판되고 있는 무혈청 세포배양액을 선별하여 각 배지를 이용해 단백질 생산 세포주를 활용해 세포배양을 실시하였음.

[무혈청 배지 리스트 및 주요 성분 특성]

배 지	제 품 명	특 성	주 요 성 분
A	PFHM-II Protein-Free Hybridoma Medium (Gibco)	protein-free	Confidential
B	Hybridoma-SFM (Gibco)	serum-free	Ammonium Compounds Barium compounds Tin compounds, inorganic Silver compounds, inorganic Cadmium compounds SELENOUS ACID
C	CD Hybridoma Medium (Gibco)	Chemically define	Ammonium meta-Vanadate Barium compounds Cadmium compound Silver compounds, inorganic Tin compounds, inorganic Sodium selenite
D	CHO CD Medium (Ajinomoto)	chemically define	Confidential

다. 홀맘 단백질에 의한 정자 응집 및 분리 방법

(1) 정자 응집 유도 반응 검증

홀맘 단백질을 이용해 암컷 생산용 제품 개발을 위하여 홀맘 항체 단백질에 의해서 유도되는 Y 정자 응집 반응 유무를 검증하기 위하여 냉동 정액을 해동 한 후, 일정한 농도의 홀맘 단백질과 반응을 37도에서 반응 시간별에 따른 응집을 유도한 후, 홀맘에 의해서 유도되는 정자 응집반응을 관찰하였음.

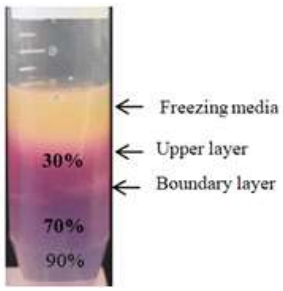
(2) 정자 응집에 따른 침전 및 비 침전 방법에 따른 정자 분리 방법

냉동정액을 해동시킨 후, 홀맘단백질과 30분간 반응 후 반응 정액을 채취하여 E.tube에 넣은 후 침전된 응집 정액과 비 침전된 상층의 정자를 분리 채취하여 각각 층에 존재는 정자의 성을 유세포분석기로 분석하였음.

(3) 필터를 이용한 정자 분리 방법

홀맘 단백질과 소 냉동 정액과 반응 시킨 정자를 이용해 효과적인 Y 정자와 X 정자를 분리할 수 있는 방법으로서 40um필터를 이용해 홀맘 처리된 모든 정자를 50ml tube에 장착하고 filter로 여과하여 응집된 Y 정자와 응집되지 않는 X 정자를 각각 분리 한 후 유세포분석기를 이용해 통과한 정자와 filter에 걸린 정자를 각각 분리 하여 분석을 실시하였음.

(4) Percoll을 이용한 타겟 정자 분리 방법



성 감별된 수정란 생산을 위한 성조절 키트 제작을 위하여 percoll을 활용해 응집된 Y정자와 응집 되지 않는 X정자를 효율적으로 분리 할수 있는 방법을 검토하였음. percoll의 농도를 90%, 70%, 50%, 30%, 10%로 변화하면서 2층 또는 3층의 각각 다른 농도의 percoll을 중층 시킨 후, 해동된 냉동정액을 이용해 응집된 Y정자 및 응집되지 않는 X정자의 분리 효율을 검토하였음.

라. 성 조절 단백질의 정자 생존성 및 활력도 영향 분석

(1) 홀맘에 의한 정자 viability에 미치는 영향 분석

홀맘을 이용해 인공수정 직전에 해동된 냉동정액과 섞어주고 약 20-30분동안 정자의 응집을 유도하기 위하여 반응을 유도함. 이 시간동안에 정자가 홀맘 결합에 따라 정자의 viability에 미치는 영향을 sperm viability kit를 이용해 분석하였음.

(2) 한우 원정액에의 홀맘 단백질 처리에 따른 정자 생존성 영향 분석

횡성 축협에서 사육되고있는 수소에서 채취한 원정액을 이용해 원심분리(15000rpm,10min)간 처리하여 정장 부분을 제거한 후, 정자 희석제를 제거된 채취한 원정액과 동일한 양을 첨가함. 처리 후 정자숫자를 카운팅한 후 최종 적인 정자 동결보존용 희석제를 첨가한 후, 홀맘 단백질을 첨가함. 홀맘 단백질을 첨가한 후 4°C 냉자고에서 4시간, 12시간 반응 후 동결정액 스트로우에 동결 처리한 홀맘 단백질 처리 성감별 정액을 제조함. 제조된 성 감별 동결정액을 이용해 37°C에서 약 19초간 해동 한 후, 홀맘 처리에 따른 정자의 생존성에 미치는 영향 분석을 위하여 SYBR-14와 PI로 면역염색을 실시하여 Flow cytometry 분석을 실시하였음.

마. 홀맘 처리 정자를 이용한 수정란 생산 효능 검증

(1) 소 미성숙난자의 회수 및 체외성숙 유도

도축장에서 소의 난소를 회수한 후 상지영서대학교로 이송하였으며, 난소로부터 소 미성숙난자를 확보하기 위하여 2-5 mm 크기의 가시난포를 18 gauge 주사침이 부착된 10 ㎖ 주사기를 이용하여 흡인한 후, 이를 15 ㎖ 원심분리관에 분주하고 10분간 정치시켰다. 이후 원심분리관 하단의 침전물만을 회수하여 60Φ 페트리디쉬에 0.1% BSA가 포함된 TL-HEPES 배양액을 첨가 후 실체현미경 하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하여 본 연구에 공시하였음. 이때 난포란의 체외성숙을 위해서는 TCM-199 배양액에 10% FBS, 5 ㎍/㎖의 Folltropin, 1 ㎍/㎖ estradiol 17-β가 첨가하여 사용하였으며, 난포란은 4-well dish의 각 hall에 mineral oil로 덮여진 100 ㎕ 체외성숙 배양액 drop에 10개씩 침지하여 5% CO_2 체외 배양기에서 24시간동안 체외성숙을 유도하였음.

(2) 정자의 홀맘처리 및 소 성숙난자 체외수정과 배발달 유도

소 체외성숙란의 체외수정을 위하여 정자는 KPN 동결정액을 사용하였으며, 정자처리는 동결정액을 융해 후 5 ㎖의 BO 배양액이 담겨있는 15 ㎖ tube에 적재 후 원심분리기를 이용하여 세척을 하였으며, 체외성숙된 난자가 침지가 되어 있는 체외수정용 Fert-TALP 배양액에서 1×10^6/㎖ 농도의 처리된 정자를 18시간동안 공배양을 함으로써 체외수정시켰음. 이때 체외수정과정에서 정자의 제품화 성 분리 키트인 홀맘은 동결정액을 융해 후 5 ㎖의 BO 배양액이 담겨있는 15 ㎖ tube에 적재 후 원심분리기를 이용하여 세척하였고, 성숙난자가 있는 체외수정용 drop에 홀맘 처리된 정자를 주입하여 체외수정을 유도하였으며, 체외수정 후 수정란은 0.3% fatty acid free BSA가 첨가된 CR I aa의 배양액으로 3일 동안 배양시킨 후 분할이 이루어진 난자만을 선별하여 10% FBS가 첨가된 CR I aa 에서 5% CO_2 배양기에서 체외발달 유도하였음.

(3) 홀맘처리된 정자의 회수 및 소 성숙난자 체외수정과 배발달 유도

동결정액을 융해 후 20분간 홀맘 처리된 정자는 아래에 보는바와 같이 percoll을 30%, 70%, 90%로 층을 만든 후 정액을 상층에 적재하고 1,5000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였으며, 30%와 70% 사이 층에서 응집된 정자를 회수 하였음. 이렇게 회수된 정자는 5 ㎖의 BO 배양액이 담겨있는 15 ㎖ tube에 담근 후 원심분리기를 이용하여 세척한 다음 처리한 후 성숙난자가 있는 체외수정용 drop에 홀만처리된 정자를 주입하여 체외수정을 유도하였으며, 체외수정 후 수정란은 0.3% fatty acid free BSA가 첨가된 CR I aa의 배양액으로 3일 동안 배양시킨 후 분할이 이루어진 난자만을 선별하여 10% FBS가 첨가된 CR I aa 에서 5% CO_2 배양기에서 체외발달 유도하였음.

(4) 수정란의 성판별 검증

제품화 성 분리 키트인 홀맘 키트가 처리된 정자를 이용하여 생산된 체외수정란의 성판별은 PCR로 확인하였다. 성판별을 위하여 X 염색체 특이 primer, Y 염색체 특이 primer가 동시에 처리되는 multiplex PCR을 실시하였음. Primer에 대하여 간략히 설명하자면, Rattanasuk 등(2011)의 선행연구에서 작성한 Y염색체 검출용 Bovine Y-specific gene primers(BY)와 Bovine specific universal primer인 BSP들을 동일하게 사용하였음. 각각의 실험군에서 배반포난은 무작위로 선별되었으며, 현미경하에서 물리적으로 투명대를 제거하여 배반포난 1개씩 2㎕의 3차증류수와 함께 PCR tube에 넣었다. 배반포난이 들어있는 PCR tube는 액체질소와 36℃의 water bath에 3회씩 번갈아가며 침지시켜 세포막 및 세포질의 물리적 파괴를 유도하였다. 이후, 각각의 배반포란이 들어있는 PCR tube에 23㎕의 Primer, Taq, buffer mixture를 투입하여 PCR을 수행하였음. Multiple

PCR에서 사용된 polymerase로는 high phusion taq (New england biolab.)을 사용하였으며, 98C° 40초, 52C° 40초, 72C° 40초로 총 40 cycle을 반응시켰다. 수행된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동을 하여 Bovine specific universal gene (538bp), Y 염색체(300bp) 특이 primer에 의하여 생산된 band를 확인하여 판별하였다. Multiple PCR의 control로는 암소, 수소의 혈액에서 유래된 genomic DNA를 사용하였음.

<소 수정란 성판별을 위해 사용된 primers>

Name of primer	Primer sequence	Specificity	Size of amplicon	References
BSP	5’-TTT ACC TTA GAA CAA ACC GAG GCA C-3’ 5’-TAC GGA AAG GAA AGA TGA CCT GAC C-3’	Bovine specific product	538 bp	Iwata et al., 2002. Reed et al., 1989.
BY	5’-CTC AGC AAA GCA CAC CAG AC-3’ 5’-GAA CTT TCA AGC AGC TGA GGC-3’	Bovine Y specific product	300 bp	Reed et al., 1989. Iwata et al., 2008.

(5) 소 난자 동결보존

성 조절 배반포의 이식 후 생산효율 확립을 위하여 우선 신선 배반포를 이용하여 동결융해 조건을 straw와 EM grid 동결용기를 이용하여 초자화 유리화 동결융해 조건을 조사하였음.

(가) Straw법 : 배반포의 유리화 동결은 수정란을 EFS (40% ethylene glycol, 18% ficoll, 0.3M sucrose) 혹은 EG(25% ethylene glycol, 25% glycerol, 0.5M sucrose)에 노출시킨 후 0.25 ㎖의 straw에 넣어 heat sealing 후 액체질소에 직접 침지하여 동결을 완료하였다. 일정시간 보관된 배반포는 3 step (1 M sucrose에 1분, 0.5 M sucrose에 3분, PBS에 10분 침지) 방법으로 융해 후 생존율을 조사하였음.

(나) EM grid법 : EM grid 방법에 의한 배반포 초자화동결을 위해서 배반포는 EM grid에 loading 후 7.5% EG + 7.5% DMSO에 1차 2분 30초간과 2차 20초간 침지한 후 LN_2에 보관하였다. 이후 융해는 LN_2에서 EM grid를 꺼낸 후 3 step으로 융해 후 생존율을 조사하였음.

바. 제품화를 통한 인공수정 및 수정란 이식을 통한 효능 평가

(1) 제품화 성 분리 키트를 활용해 냉동정액의 인공수정

제품화 성 분리 키트를 활용해 냉동정액의 인공수정을 통하여 산자생산을 위하여, 강원도 횡성 소재의 목장을 대상으로 동결정액 staw을 융해 후 성 분리 키트인 홀맘을 20분간 반응을 시킨 후 다시 straw 도입한 staw는 cassou gun에 장착하여 질내 세균의 자궁내 오염을 막기 위하여 특별히 제조된 vinyl cap을 씌워 자궁경 입구에서 vinyl cap을

뒤로 당겨 제거한 후, 자궁경을 통하여 황체가 존재하는 자궁각에 정액을 주입하였음.

(2) 성 분리 키트를 활용해 생산된 소 배반포의 수정란 이식

제품화된 성 분리 키트인 홀맘을 활용해 생산된 소 배반포를 대리모에 수정란 이식을 하여 산자생산을 시도하였으며, 강원도 횡성 소재의 대두목장에서 실시하였음. 생산된 배반포는 0.25 ㎖ straw (I.M.V., France)에 보존용 배양액과 함께 수정란을 흡인하여 cassou gun (I.M.V., France)에 장착하여 질내 세균의 자궁내 오염을 막기 위하여 특별히 제조된 vinyl cap을 씌워 자궁경 입구에서 vinyl cap을 뒤로 당겨 제거한 후, 자궁경을 통하여 황체가 존재하는 자궁각에 수정란을 주입함. 이때 발정발현 시간 및 수정란의 주입부위를 자궁각의 기저부와 선단을 구분하여 개체별로 기록하였다. 임신진단은 직장검사법에 의한 태막낭 및 양막낭 촉진과 초음파 진단을 이용하여 수태 여부를 판정하였음.

(3) 홀맘 제품의 임상 시험

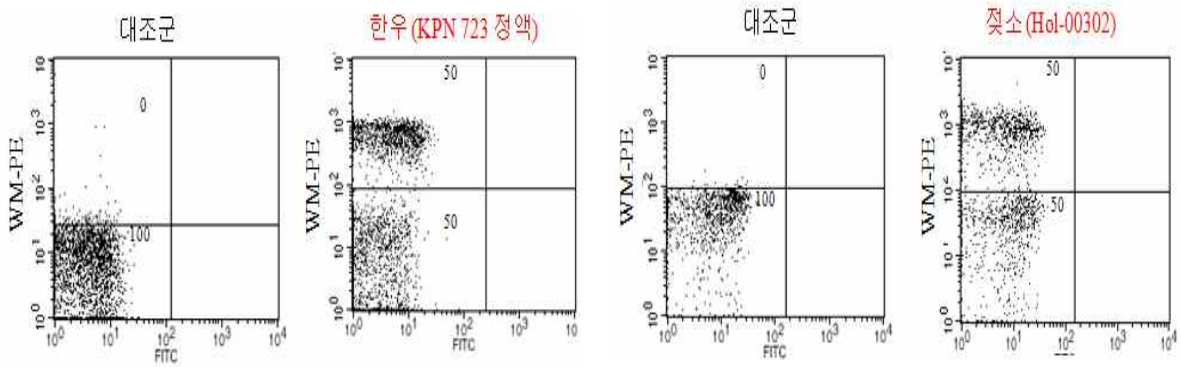
미국 CRI(Genex)사에 홀맘 단백질을 송부해 홀맘 단백질을 이용해 동결정액과 원정액을 대상으로 홀맘 처리된 정액을 이용해 IVF 방법에 의해 홀맘 단백질에 의한 정자 성분리 효능을 검증하였음. 또한 브라질에도 동경정액용 홀맘 제품을 제공하여 소를 대상으로 하는 임상시험을 실시하여 홀맘에 의한 성 조절 효능을 검증하였음.

2-5. 연구개발 결과

가. 홀맘 단백질의 정자 결합 특성 및 유전자 검증

(1) 홀맘 단백질의 소 정자 결합 특성

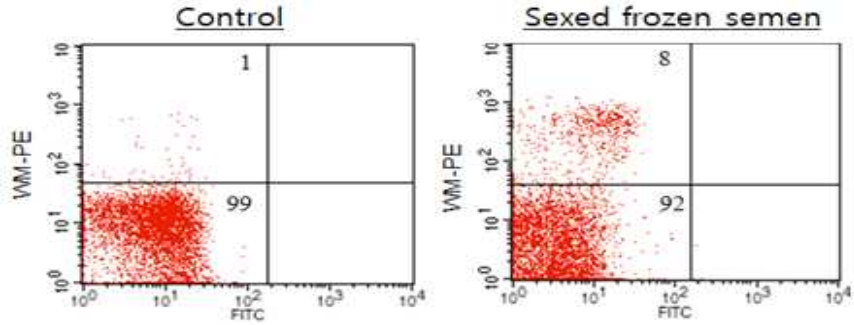
한우 냉동 정액 및 젖소 냉동 정액을 구입한 후, 홀맘 단백질과의 결합을 실시하여 유세포 분석기를 이용해 홀맘 단백질의 정자 분리 효능을 검증한 결과 젖소 정액과 한우정액에서 50:50의 비율로 정자 분리 효과가 검증되었음. 이는 홀맘 단백질이 정자를 특이적으로 분리하여 홀맘 단백질 결합 정자와 홀맘 단백질 비 결합 정자를 50:50의 비율로 분리 가능하다는 사실이 증명되었음.



[한우 및 젖소 냉동정액을 이용한 홀맘 단백질의 특이적 결합 특성 분석]

(2) 성 감별 냉동정액을 이용한 홀맘 단백질의 결합 특성

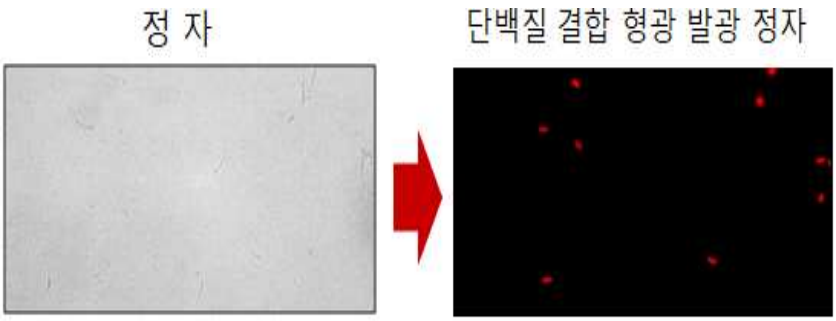
현재 전 세계 적으로 유세포분리기기를 이용해 젖소의 X 정자만을 분리해 냉동 보관 시킨 후에 젖소 농장을 대상으로 고가에 판매하고 있음. 이러한 방법에 의해서 분리된 X 정자의 분리 효율을 일반적으로 90%이상을 X 정자가 분리되어 보관되어 있음. 이러한 성 감별된 정자를 이용해 당사에서 개발된 홀맘 단백질을 이용해 분석을 실시한 결과 대조군에 비해서 홀맘에 결합하는 Y정자가 약 8%정도 존재하고 홀맘단백질과 결합하지 않는 정자인 X정자가 약 92%존재하고 있다는 사실이 판명되었음. 이러한 결과는 본 단백질이 Y정자 특이적으로 결합하고 있다는 사실이 판명되어 본 단백질의, 소 성 조절용 제품에의 활용이 문제가 없다는 것이 증명되었음.



[시판 성 감별 냉동정액을 이용해 홀맘 단백질을 이용해 X정자 분리 순도 결정]

(3) 홀맘 단백질의 정자 결합 부위 특성 분석

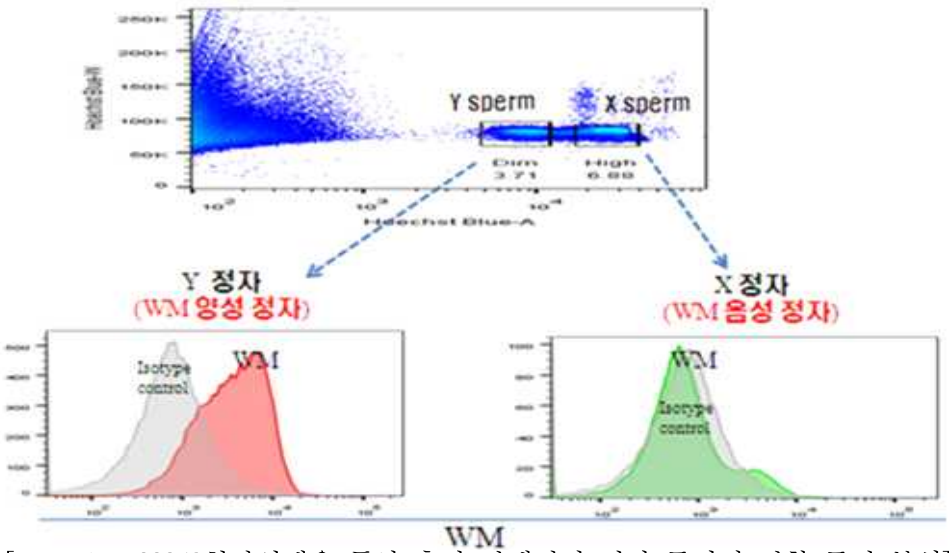
한우 냉동 정자를 이용해 홀맘 단백질과 결합을 시킨 후 형광현미경 관찰을 통하여 홀맘 단백질의 정자 결합 부위를 조사한 결과 소 정자와 결합하는 홀맘 단백질은 정자 두부 세포막과 특이적으로 결합하고 있다는 사실이 판명되었음.



[소 정자에의 홀맘 단백질 결합 특성]

(4) Hoechst형광물질을 이용한 홀맘 단백질의 결합 특성 분석

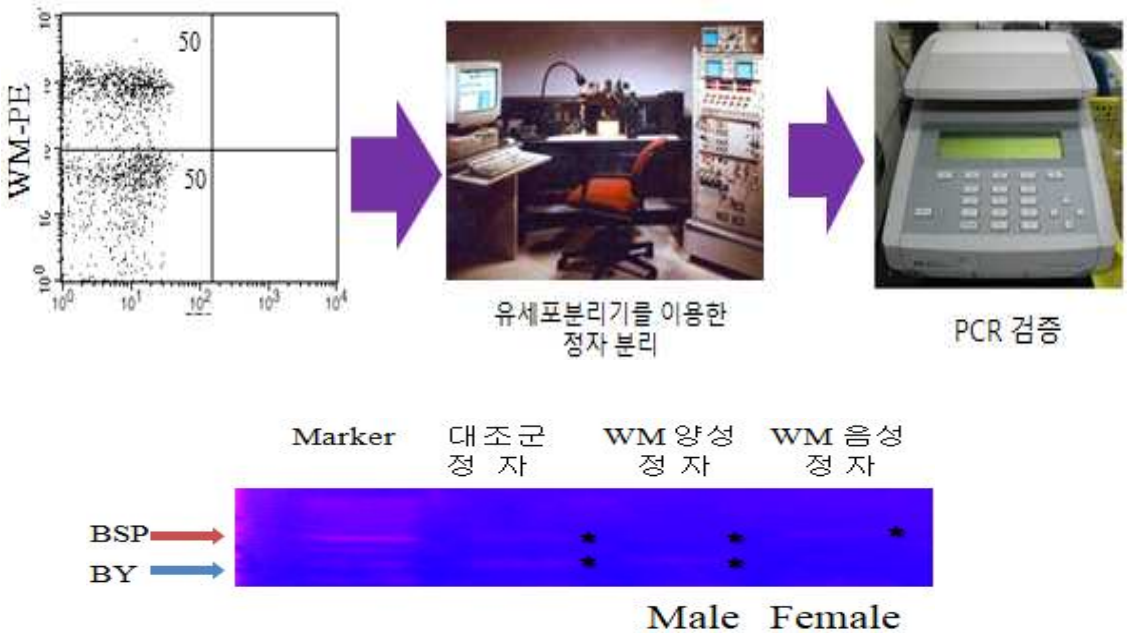
Hochst33342형광 물질로 한우 냉동정자에의 염색을 실시한 다음 홀맘 단백질로 면역염색을 실시하여 UV laser 유세포분석기를 이용해 X 정자 또는 Y정자에 gating을 실시하여 특정 정자에의 결합 여부를 판별한 결과, X 정자에는 결합하지 않고 Y정자에만 홀맘 단백질이 결합하고 있다는 사실이 판명되었음. 이러한 결과는 홀맘 단백질의 특이적인 결합 특성을 지니고 있다는 사실이 판명되었으며 Y정자의 세포막 단백질에 특이적으로 결합하고 있다는 사실이 판명되어 소의 정자 성감별용 제제로서의 활용가능성이 있다는 사실이 판명되었음.



[Hoechst 33342형광염색을 통한 홀맘 단백질의 정자 특이적 결합 특성 분석]

(5) 유전자 검증을 통한 홀맘 단백질의 결합 특성 분석

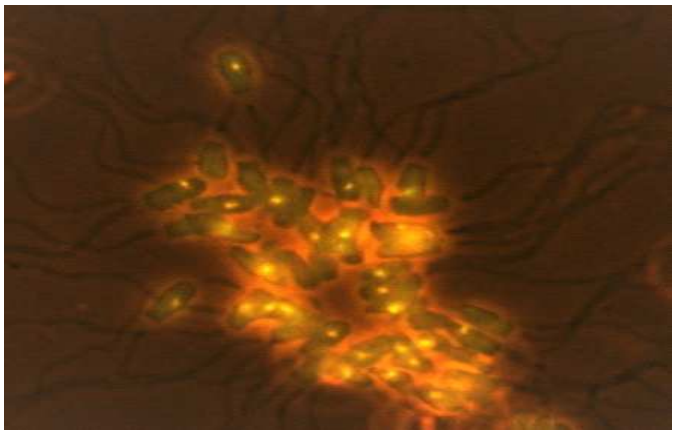
한우 냉동정액에 홀맘 단백질을 결합시키고 UV laser 장착 flow cytometer기기를 이용해 홀맘 양성 정자, 음성 정자를 각각 분리하고 DNA를 추출한 후 BSP,BY primer를 이용해 분리된 정자의 염색체를 조사한 결과, 홀맘 단백질 양성정자에서 Y염색체 특이적인 band가 검출되었고 홀맘 음성 정자에서는 Y염색에 특이 밴드가 음성으로 관찰되었음. 본 결과는 홀맘 단백질이 Y정자에만 특이적으로 결합하고 X정자에는 결합하지 않는 특이적 결합 특성을 지닌 항체 단백질이라는 사실이 판명되었음.



[홀맘 양성 및 음성 정자에서의 Y염색체 유전자 분석]

(6) FISH방법에 의한 홀맘 단백질의 정자 결합 특성

젖소 정자를 이용해 홀맘 처리 후 응집 유도한 정자에서 Y염색체 특이적인 probe로 염색체 분석을 실시하여 응집 정자의 X 정자 또는 Y정자 여부를 판별하였음. 그림과 같이 응집된 정자는 Y염색체를 지니고 있는 Y정자임이 밝혀졌음. 따라서 본 결과와 같이 홀맘 단백질은 Y정자와 특이적으로 결합하고 있다는 사실이 판명되었음.

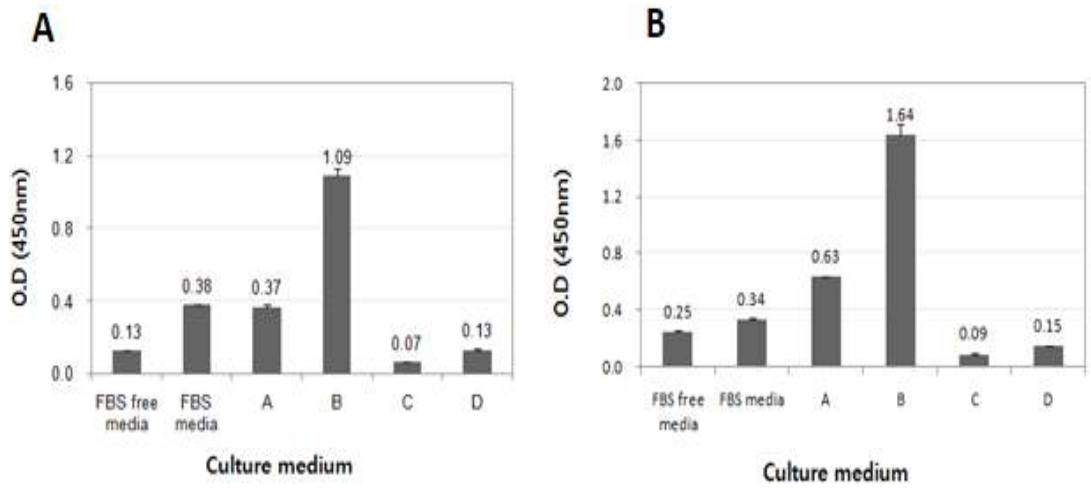


[FISH분석에 의한 응집 정자의 성 감별 특성 분석]

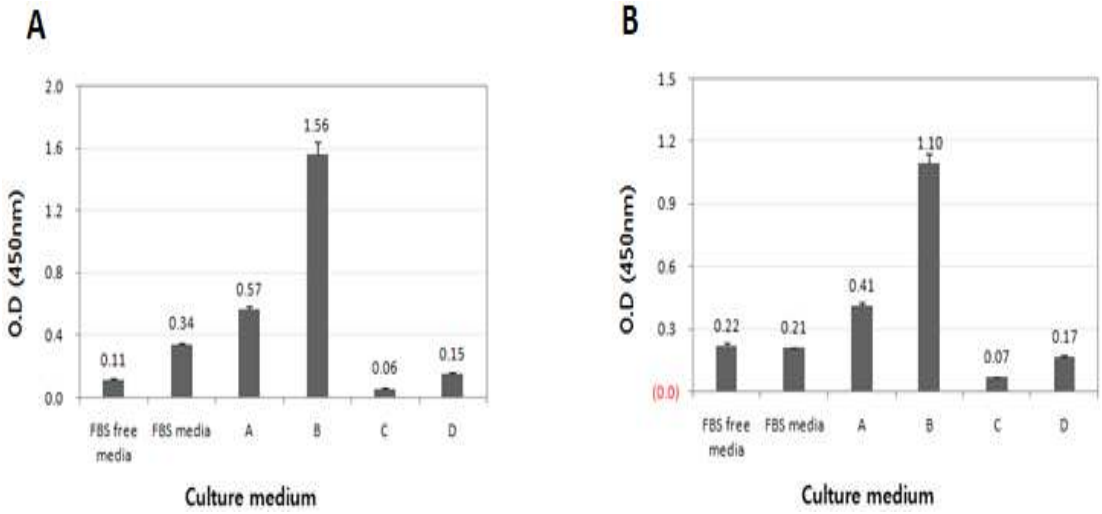
나. 무혈청 배양액을 이용한 단백질 대량 생산 시스템 구축

(1) 무혈청 배지를 이용한 홀맘 단백질 생산 시스템 구축

홀맘 성 조절용 단백질의 시험관 대량 생산 시스템 구축과 더불어 소 혈청 혼합에 따른 감염방지 등의 목적으로 4가지 무혈청 배지를 이용해 단백질 생산 세포주의 세포 배양 여부를 조사하였음. 상기의 4개 무혈청 배지를 사용해 단백질 생산 세포주를 활용해 세포배양을 실시한 결과, 대조군 배지인 혈청 함유 배지에 비해서 A 와 B의 배지가 높은 세포 배양 효능이 관찰되었음. 그러나 C와 D의 배지에서는 대조군에 비해서 낮은 세포 증식 효능이 나타나 실질적인 배지로서의 활용가능성이 낮은 것으로 판단됨.



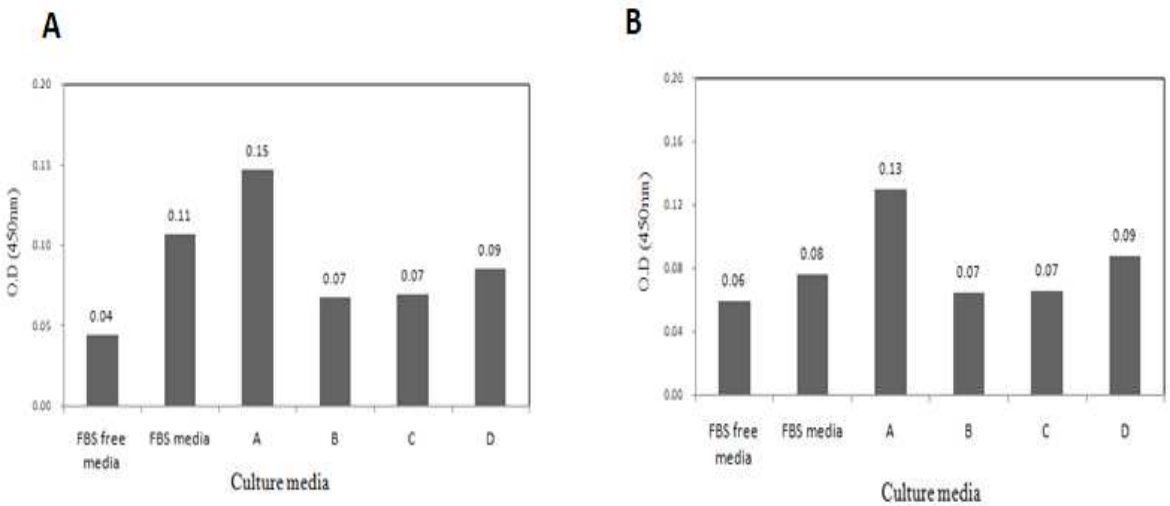
[단백질 생산 세포주를 활용해 무혈청 배지를 이용한 세포증식(Day3) 효능을 검증함. A. $5x10^3$, B. $10x10^3$ 의 세포주를 이용한 MTT 분석 결과]



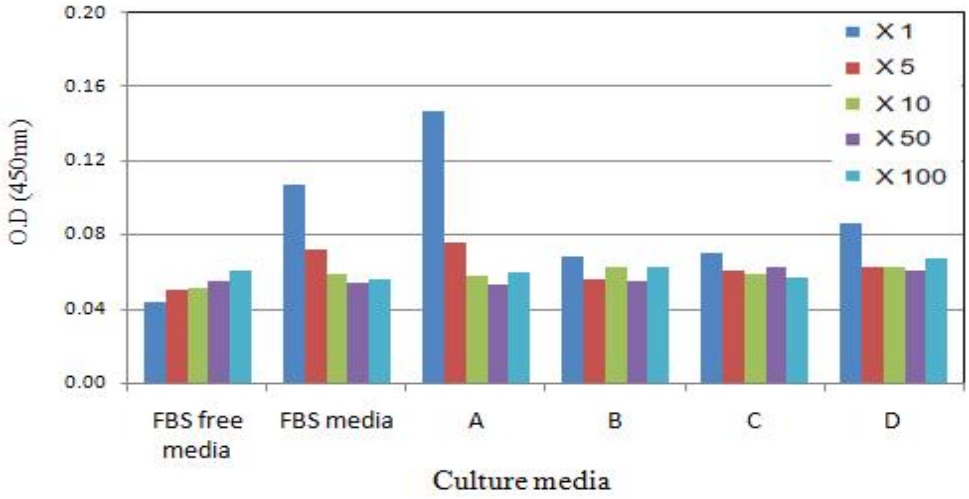
[단백질 생산 세포주를 활용해 무혈청 배지를 이용한 세포증식(Day 4) 효능을 검증함. A. $5x10^3$, B. $10x10^3$ 의 세포주를 이용한 MTT 분석 결과]

(2) 무혈청 배지별에 따른 단백질 생산 효능 검증

4가지 무혈청 배지를 이용해 세포증식을 검증하였고 각 배지에서 생산되는 단백질의 농도 변화를 ELISA 기법을 측정하였음. 이는 세포의 증식 효능과 더불어 가장 중요한 단배질의 생산 효능이 대량 생산을 위해서는 가장 이상적인 배지 선별을 이해서는 가장 중요한 요건임. 따라서 각 배지에서 배양된 세포가 생산되는 단백질의 양을 측정하기 위하여 배양액을 각각 채취하여 각 배지별에 따른 소 성조절용 단백질의 생산 효능을 검증하였음.



[무 혈청 배지별에 따른 단백질 생산 효능의 ELISA 검증 . A. 배양 후 2일째의 단백질 생산효능, B. 배양 후 3일째의 단백질 생산 효능]

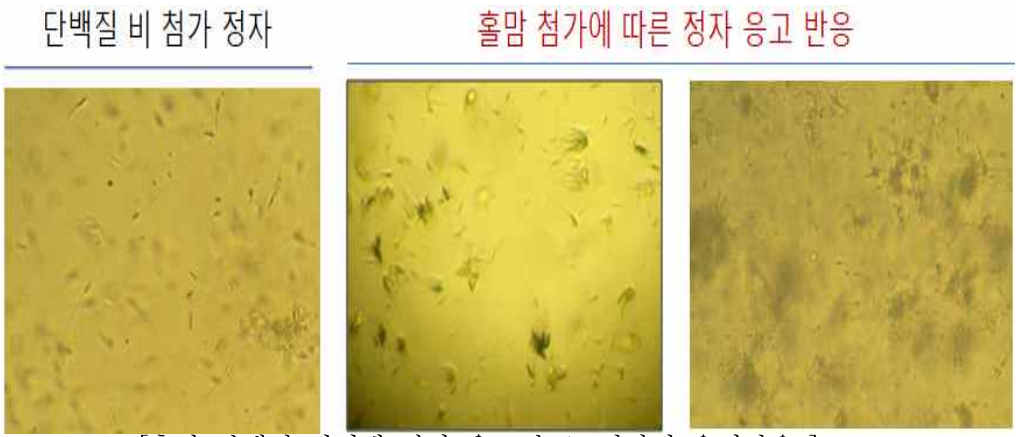


[배양 후 2일째의 각 배지에서 생산되는 단백질의 생산 농도 측정]

다. 정자 응집 유도를 통한 정자 효능 검증

(1) 홀맘 단백질의 정자 응집 유도 효능 검증

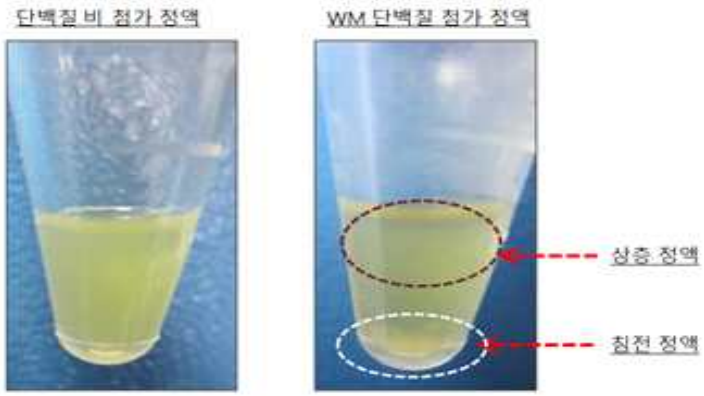
홀맘 단백질은 항체 단백질로서 한 개의 구조 단백질과 2개의 결합 부위를 지니고 있음. 따라서 한 개의 항체 단백질은 각각 특이적으로 2개의 Y정자만 결합하여 정자를 응집하는 반응을 유도함. 이러한 응집반응 기전을 활용해 암컷 소 생산을 위한 정자 성감별용 제품으로서의 활용 여부를 판별하고자 생산된 홀맘 항체 단백질과 해동한 소 정자를 반응 시킨 후, 정자의 응집 여부 유도반응을 조사하였음. 정자 응집 반응은 홀맘 단백질의 농도 및 반응 시간, 정자 밀도에 따라서 결정되며 고농도(1mg/ml)에서는 약 10분만에 응집 현상이 유도되며 10ug/ml의 낮은 농도에서는 응집유도가 일어나지 않는다는 사실이 밝혀졌음. 또한 4 x 10^7/ml에서 보다는 10 x 10^7/ml의 고 밀도의 정자에서 보다 높은 응집반응이 관찰되었음.



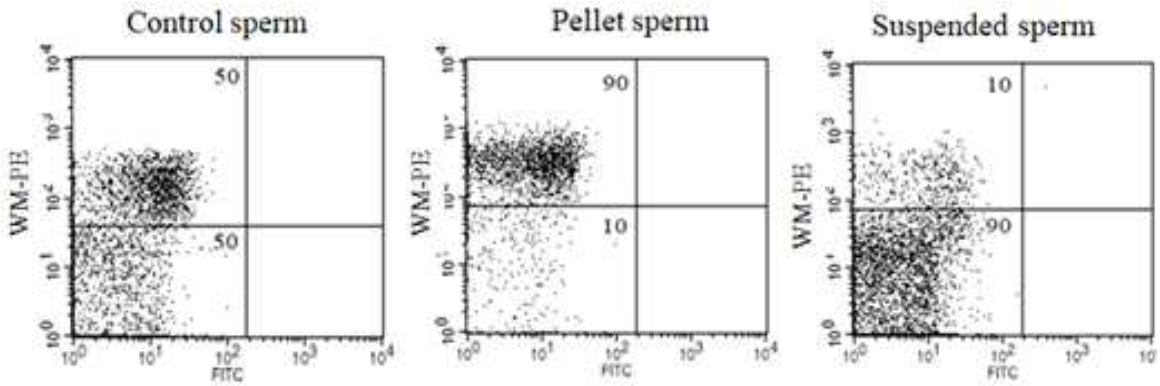
[홀맘 단백질 처리에 따라 유도된 소 정자의 응집반응]

(2) 침전 원리를 이용한 X정자 및 Y정자 분리 검증

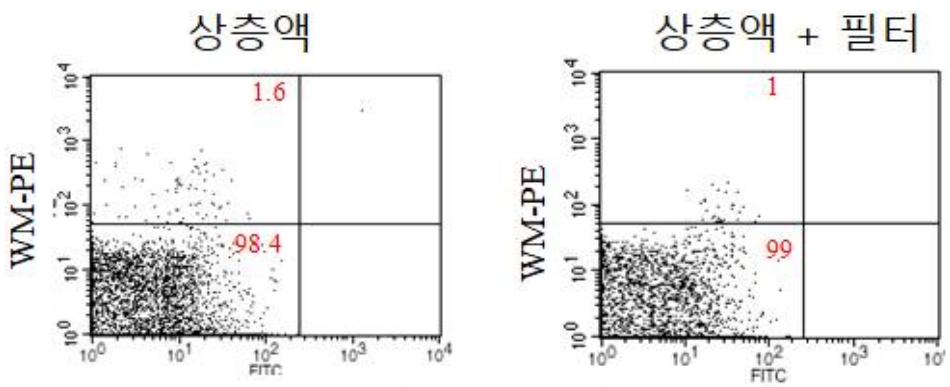
냉동보관된 정자를 해동시킨 후에 홀맘 단백질과 반응 후, 침전된 정자와 침전되지 않는 상층 부분의 정자를 각각 분리하여 홀맘 단백질 결합 Y 정자와 비 결합 X정자의 분리 효율을 유세포분석기를 이용해 분석을 실시하였음. 튜브에 반응시킨 정자를 넣고 약 30분간 정치해 두면 응집된 부분은 침전되고 응집되지 않는 부분을 상층에 존재함. 상층의 약 1/3에 존재하는 정자부분을 채취하고 하부에 침전된 부분을 채취한 후, 분석을 실시한 결과, 약 90%이상의 X 또는 Y 정자의 분리 효율이 관찰되었음.



[침전에 의한 정자 분리 방법]



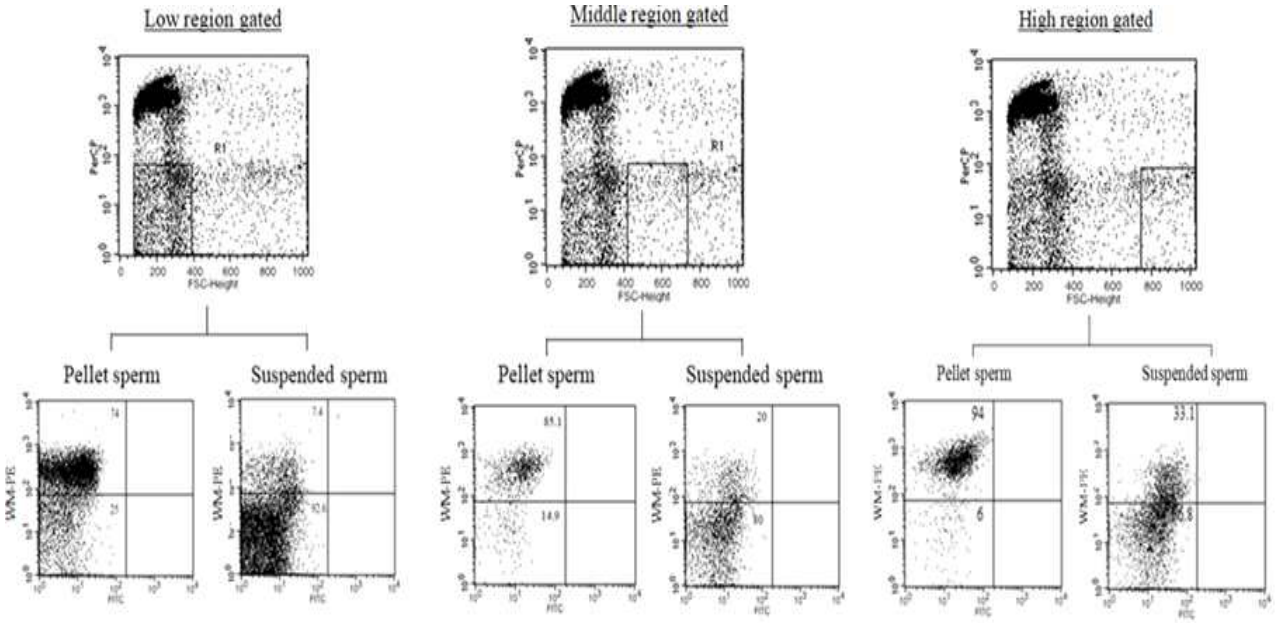
[홀맘 처리 정자 침전 방법에 의한 정자 분리 효율]



[침전과 필터 방법에 의한 정자 분리 효율]

(3) 침전방법에 이용한 정자 분리 특성 분석

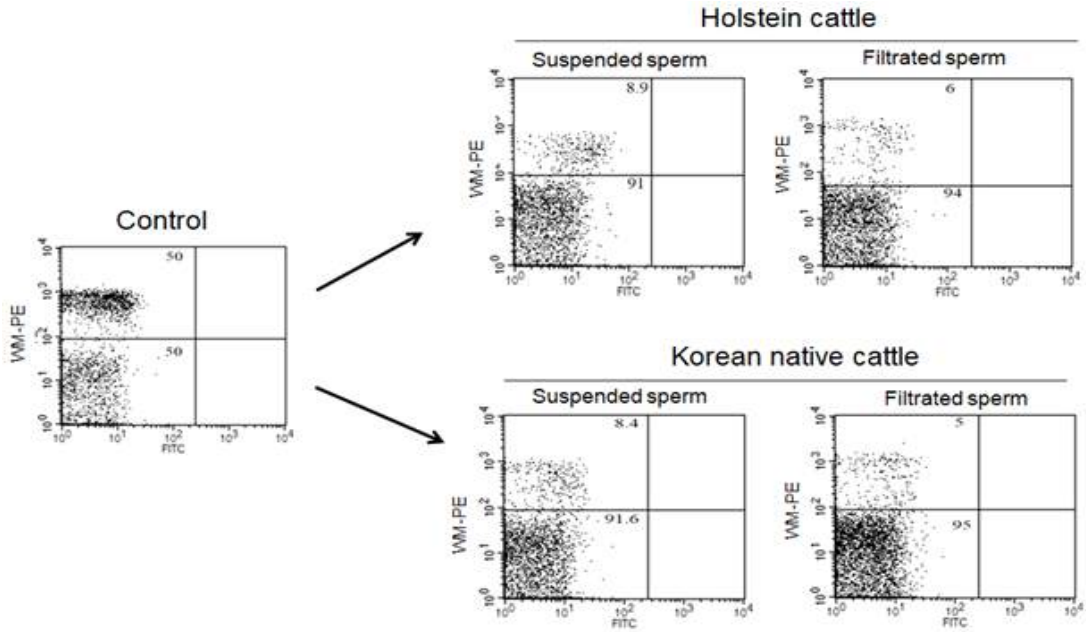
홀맘 단백질을 이용해 해동한 냉동정액과 반응 시킨 후에 침전된 정자와 침전되지 않는 정자부분을 각각 분리 한 후, 유세포 분석기를 이용해 응집 region에 따른 X 정자 및 Y 정자의 분리 효율을 비교 검토하였음. 결합되지 않는 single cell region에 존재하는 정자 샘플에서는 약 74%의 Y 정자 분리 효율이 침전된 부분에서 관찰되었고 응집된 middle이나 high region에 존재하고 있는 정자군에서는 각각 85.1%와 94%의 높은 비율로 침전된 정자부분에서 Y정자가 존재하고 있다는 사실이 판명되었음. 또한 반대로 상층에 존재하는 부분만을 채취해 각 region에서의 X정자 비율을 분석한 결과 low size region에 존재하는 부분에서 92.6%의 가장 높은 비율의 X 정자가 존재하고 있으며 middle 또는 high region부분에 존재하는 정자를 분석한 결과 X 정자의 비율이 낮아진다는 사실이 판명되었음.



[정자 region별에 따른 정자 분리 효율 비교 검증]

(4) 침전 및 filter를 이용한 정자 분리 효율 검증

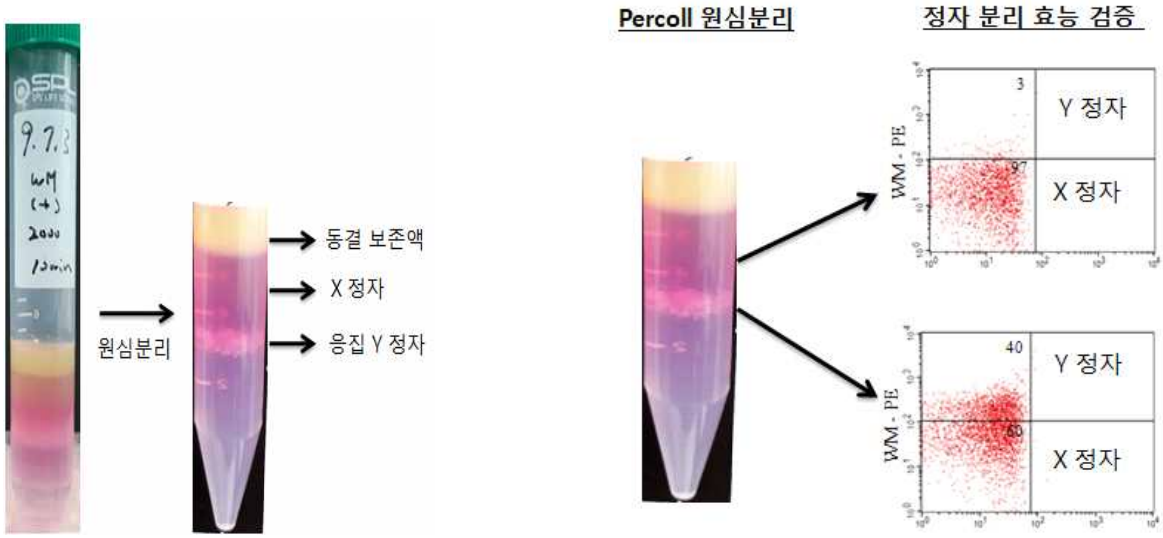
일반적인 침전 방법에 의한 정자 분리 효율과 더불어 필터를 이용해 응집이 유도된 Y정자와 비 응집된 X정자만을 분리하는 방법의 효율을 비교 검토하였음. 이전과 동일한 방법으로 홀맘과 반응을 유도한 냉동정액을 이용해 침전방법과 40um사이즈의 필터를 이용해 분리된 정자속에 존재하는 X 정자의 효율을 비교 검토 한 결과, 침전 방법에 비해서 filter방법에 의해서 보다 고효율로 X 정자가 분리되고 있다는 사실이 판명되었음.



[침전 방법과 filter방법에 의해서 분리된 정자의 분리 효율 비교 검토]

(5) Percoll을 이용한 정자 분리 기반 기술 확립

성 감별 수정란 생산용 키트 개발을 위하여 냉동정액과 성 조절 단백질을 결합해 반응한 정자를 이용해 X 정자 또는 Y 정자만을 분리할 수 있는 기반 기술이 필수적임. 따라서 본 연구 개발 내용에서 Percoll의 농도변화에 따라 응집된 정자와 응집되지 않는 정자의 분리 효능을 검토하였음. Percoll과 원심분리에 의해서 분리된 정자를 채취해 각각 유세포분석방법에 의해서 각 fraction에 존재하는 정자를 분석한 결과, 상층부분의 X정자가 존재하는 부위에서는 약 97%이상의 고효율로 분리되며 중간층의 fraction에서는 약 40:60의 비율로 X정자와 Y정자가 각각 존재하고 있다는 사실이 판명되었음.



[소 성감별 단백질 반응 동결정액을 이용한 원심분리 정자 분리]

[Percoll 농도변화에 따른 정자 분리 효능 비교 검증]

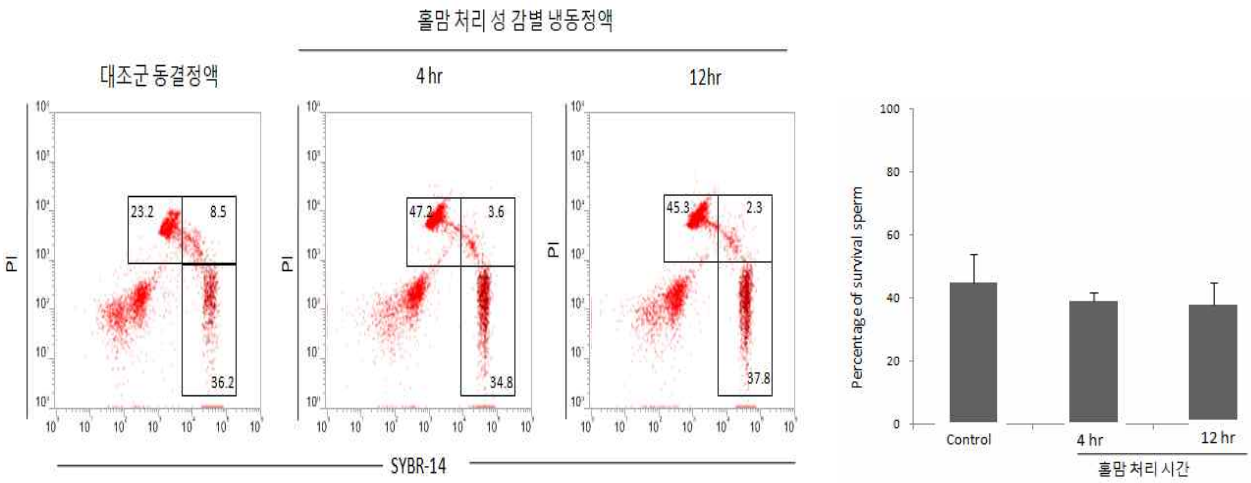
Percoll 농도		90%:70%:50%		90%:70%:30%		90%:70%:10%		90%:50%:30%		90%:50%:10%	
동결액 위치		분리됨		분리됨		분리 안됨		분리됨		분리 안됨	
분리 정자 상태		X 정자	Y 정자	X 정자	Y 정자	X 정자	Y 정자	X 정자	Y 정자	X 정자	Y 정자
상 층	중앙	—	—	+++	—	±	++	±	—	—	—
	경계면	±	+	—	+++	+	++	—	—	—	—
중간층	중앙	+	+	—	—	++	+++	+	+	—	—
	경계면	+	+	—	—	++	++	++	++	++	++
하 층	중앙	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(정자존재여부: -, +, ++, +++)

라. 홀맘 단백질에 의한 정자 운동성 및 생존성 영향 분석

(1) 소 원정액에서의 홀맘 단백질의 정자 생존성 영향 분석

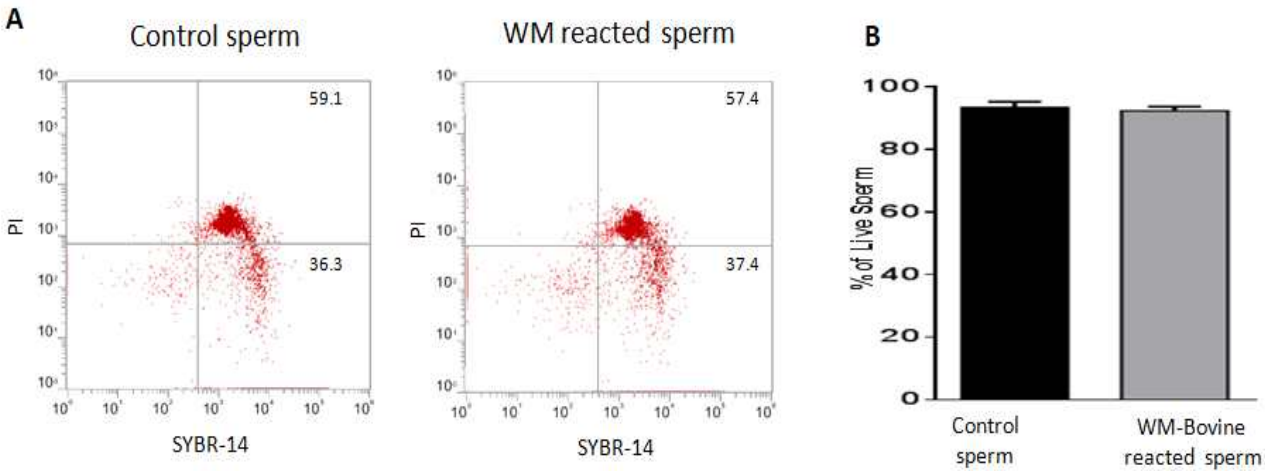
횡성 축협에서 사육중인 한우 정액에서 채취한 정자를 대상으로 홀맘 처리에 따라 응집이 유도된 성 감별용 동결정액을 사용하여 홀맘 단백질 처리에 따른 원정액 정자에 미치는 생존성 검증을 Flow cytometry를 분석을 실시하였음. 홀맘 단백질을 4 시간, 12시간 반응 시킨 성감별 동결정액을 SYBR-14와 PI를 이용해 분석한 결과 대조군 동결정액과 동일한 정자 생존성이 관찰되었으며 4시간 반응, 12시간 반응한 정자간에서도 정자 생존성에는 차이가 없다는 것이 밝혀졌음. 따라서 홀맘 단백질은 원정에의 적용을 통한 암컷 생산용 성조절용 동결정액을 제작을 통하여 직접적인 인공수정을 시행하여도 정자의 생존성 변화가 관찰되지 않아 충분히 활용 가능하다는 사실을 시사함.



[소 홀맘 처리 냉동정액에서의 정자 생존성 검증]

(2) 홀맘 단백질에 의한 정자 survival에 미치는 영향

냉동 정액을 이용해 홀맘 처리에 따른 정자의 활력 및 survival에 미치는 영향을 분석하기 위하여 냉보관된 정자를 해동시킨 후에 홀맘 단백질과 30분간 반응 후, 정자의 survival detection kit인 SYBR-14 및 PI를 이용해 면역염색을 실시하고 유세포분석기를 이용해 정자의 생존성을 비교 분석한 결과, 대조군의 일반 정자와 홀맘 단백질을 처리한 정자와는 정자 생존성에 차이가 관찰되지 않았음. 이러한 결과는 홀맘 단백질은 정자의 생존성과 무관하다는 결과를 얻어 수태율에는 영향을 미치지 않는다는 사실이 판명되었음.



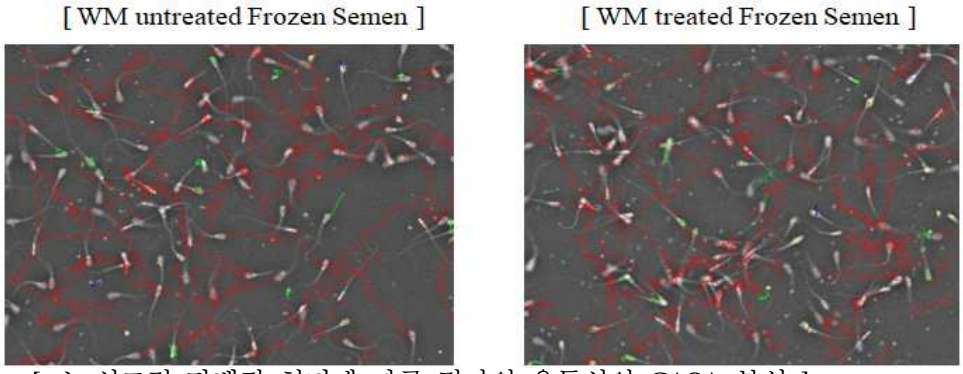
[홀맘 단백질에 의한 정자 생존성에 미치는 영향 분석, A) 유세포분석에 의한 정자 생존성 분석결과, B) 홀맘 비처리 군과 처리군에서의 SYBR-14 양성 정자의 비율]

(3) 성 조절 단백질의 정자에 미치는 영향 분석

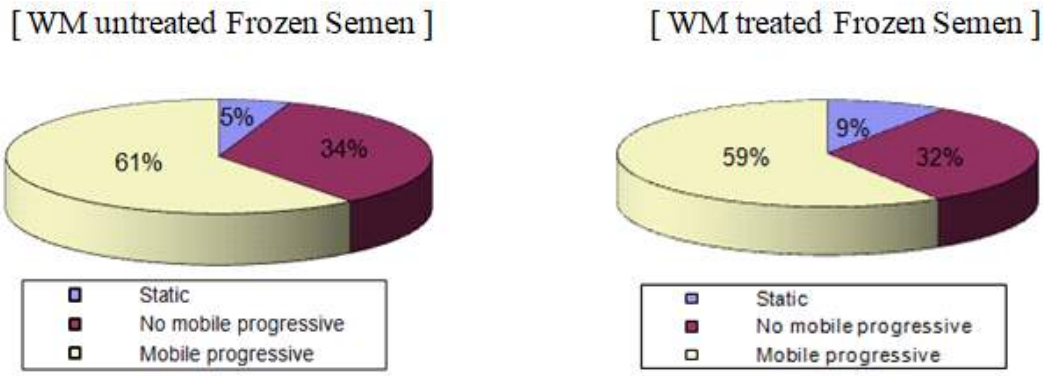
성 조절 단백질을 이용해 정자의 운동성에 미치는 효능을 CASA 분석기를 활용해 분석한 결과, 대조군의 정자와 동일한 정자 운동성 수치가 관찰되었음. 이러한 결과는 단배질의 처리에 의한 정자 운동성에는 전혀 변화를 유도하지 않기 때문에 인공수정 및 수정란 생산을 위한 키트 개발에 적용해도 무방하다는 사실이 판명되었음.

[소 성조절 단백질 처리에 따른 정자의 변화 양상분석]

Average Values of Speed parameters	Control Frozen Semen				WMan treated Frozen Semen			
Sperm parameter (10min)	Total	Slow	Medium	Rapid	Total	Slow	Medium	Rapid
Curvilinear Speed (μm/s)	121.9	17.1	39.6	130.6	116.5	13	39.6	126.4
Rectilinear Speed (μm/s)	51.6	7.9	13.4	55.5	49.9	5	13.3	54.6
Average Value (μm/s)	66.2	10.4	19.6	71	60.8	6.8	18.7	66.3
Linearity Index (%)	42.3	46.3	33.9	42.5	42.8	38.3	33.7	43.2
Straightness Index (%)	77.9	76.2	68.6	78.2	81.9	73.5	71.4	82.4
Oscillation Index (%)	54.2	60.8	49.4	54.4	52.2	52.2	47.2	52.4



[소 성조절 단백질 처리에 따른 정자의 운동성의 CASA 분석]



[소 성 조절 단백질 처리에 따른 정자의 운동성의 변화 차이]

마. 수정란 생산용 키트

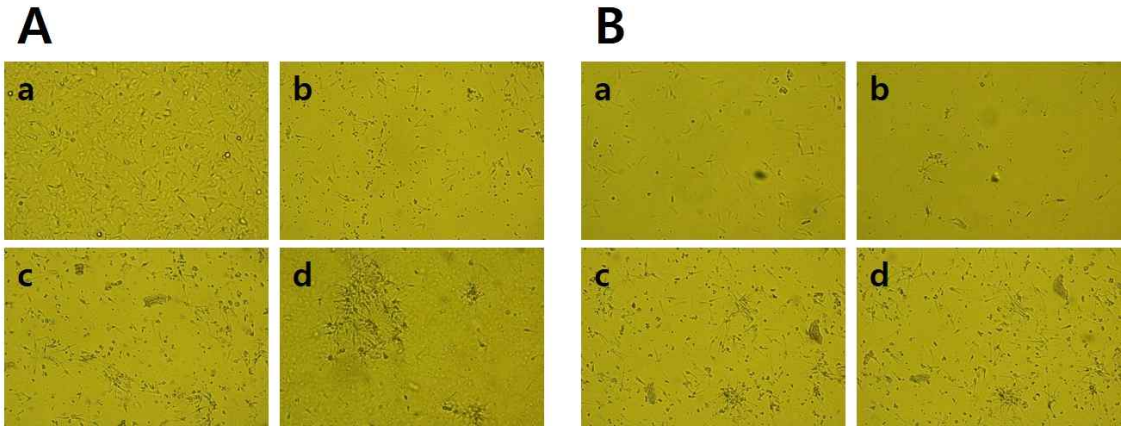
홀맘단백질을 이용해 암소 또는 수소의 수정란 생산을 위한 키트 제품 개발을 위하여 1차년도에 실시한 percoll을 이용한 정자 분리 방법과 2차년도 수행한 침전 및 필터를 이용한 목적 정자의 분리 방법 및 결과를 토대로 목적 성을 지닌 수정란 생산을 위한 키트를 제작하였음. 성 조절된 수정란 생산을 위하여 홀맘단백질에 의해서 응집된 Y정자와 응집되지 않는 X 정자를 분리하는 방법으로서는 크게 침전에 의한 방법과 필터에 의한 분리방법 및 Percoll에 의한 분리방법이 있음. 따라서 이를 위하여 홀맘에 포함된 vial과 Percoll을 90%, 70%, 30% 함유된 키트를 제작하였음.

[인공수정란 생산용 홀맘 성감별 키트 제작]

바. 성 분리 키트가 처리된 정액을 이용한 체외수정란 생산 방법 개발

(1) 홀맘 처리 후의 정자 응집현상

홀맘 처리가 정자에 어떤 외형적 영향을 미치는지 관찰하였음. 체외수정 전 동결정액을 융해 및 세척 하였으며, 홀맘과 정액을 공배양하였음. 홀맘 사용설명에 의하면, 제품은 Y정자 특이 단백질에만 반응하는 항체로써, Y정자들간의 응집반응을 유도하여 X 정자에만 독립적인 운동성이 부여되고, 이로 인하여 X정자만 수정이 가능케 하는 원리이다. 홀맘과 정자를 공배양한 후, 1분, 5분, 10분, 20분째에 관찰하였으며, 정자의 응집현상은 그림 1과 같다. 홀맘과 공배양된 정자는 처리후 1분에는 응집현상이 일어나지 않았으나 (그림Aa), 처리후 5분부터 응집이 시작되었음. (그림Ab). 그림 1-Ad에서 보는바와 같이 20분 이상 처리하였을 때 최고조의 응집현상이 나타났고, 처리 후 1시간 이후부터는 응집되었던 정자가 산개되었음. 또한, 정자와 공배양된 홀맘의 양에 따른 응집현상을 조사하였음. 그림Ba와 b에서 보는바와 같이 1×10^6/㎖ 농도의 정자가 포함된 Fert-TALP media 300㎕에 홀맘을 1㎕, 10㎕ 투여하였을때는 정자에서 현미경으로 관찰 가능한 외형적 응집 변화가 보이지 않았음. 그러나, 홀맘을 20㎕ 또는 100㎕ 투여하였을때 관찰 가능한 수준의 정자 응집현상을 보였음. (그림Bc, d).



[홀맘 처리조건에 따른 소 동결-융해 정액의 정자 응집현상. (A) 홀맘 처리후 시간대별 정자 응집 현상. 1 분 (a), 5 분 (b), 20 분 (c),1시간 (d). (B) 농도별 홀맘 처리 20분후 정자 응집 현상 1㎕ (a), 10㎕ (b), 20㎕ (c), 100㎕ (d)]

(가) 홀맘이 처리된 정자를 이용하여 소 성숙난자의 체외수정률과 배발달률을 조사한 결과는 표 1에서 보는 바와 같음. 홀맘이 처리되지 않은 정자를 이용하여 체외수정을 시킨 대조군의 경우 분할율이 74.5%, 체외수정란 수 대비 배반포 수 비율이 23.4% 및 분할란 수 대비 배반포 수 비율이 31.5%임. 동결정액을 융해 후 20분간 홀맘처리 → 정액 원심분리 → 정자회수 및 난자가 있는 체외수정 배지에 주입 → 체외수정 유도과정으로 체외수정란을 생산하였을 경우(A 방법) 분할율이 71.7%, 체외수정란 수 대비 배반포 수 비율이 21.9% 및 분할란 수 대비 배반포 수 비율이 30.6%로 대조군와 유사함. 그러나, 동결정액을 융해 → 정액 원심분리 후 20분간 홀맘처리 → 정자회수 및 난자가 있는 체외수정 배지에 주입 → 체외수정 유도과정으로 체외수정란을 생산하였을 경우 (B 방법) 분할율이 62.8%, 체외수정란 수 대비 배반포 수 비율이 17.2% 및 분할란 수 대비 배반포 수 비율이 27.5%였었고, 동결정액을 융해 → 정액 원심분리 → 정자회수 체외수정 배지에 주입

후 20분간 홀맘처리 → 난자 주입 체외수정 배지와 연결통로 만듬 → 체외수정 유도과정으로 체외수정란을 생산하였을 경우 (C 방법) 분할율이 20.8%, 체외수정란 수 대비 배반포 수 비율이 5.4% 및 분할란 수 대비 배반포 수 비율이 25.9%였으며, 동결정액을 융해 → 정액 원심분리 → 정자회수 체외수정 배지에 주입 후 20분간 홀맘처리 → 난자 주입 체외수정 배지에 주입 → 체외수정 유도과정으로 체외수정란을 생산하였을 경우 (D 방법) 분할율이 46.1%, 체외수정란 수 대비 배반포 수 비율이 11.2% 및 분할란 수 대비 배반포 수 비율이 24.6%임. 이상의 결과로 모든 홀맘을 정자를 처리하여 수정을 하였을 경우 대조군에 비교하여 B, C, D 방법이 분할율이 낮은 것으로 확인이 됨. 이러한 결과의 원인은 정자의 응집으로 인하여 체외수정에 참여하는 정자의 수가 대조군에 비교하여 감소되어 체외수정율이 낮게된 것으로 예측이 된다. 그러나, 홀맘을 처리한 정자를 이용하여 체외수정한 실험군의 경우, 체외수정율이 낮아 체외수정란 수 대비 배반포 수 비율은 대조군에 비교하여 낮았지만, 분할란 수 대비 배반포 수 비율은 커다란 차이를 보이지는 않음. 특히, 홀맘을 정자처리한 군 중 A 방법과 B 방법이 분할율이 높았는데, A 방법의 경우에 있어서는 동결정액을 융해 후 20분간 홀맘처리 → 정액 원심분리 → 정자회수하는 과정에서 항체간의 응집력보다 더 강한 물리력이 pipetting 과정중에 응집된 정자들에 전달이 되어 Y-정자의 응집이 많이 풀리게 되었고, 이로 인하여 대조군과 유사한 체외수정율을 보인 것으로 판단된다. 그러나, B 방법인 동결정액을 융해 후 20분간 홀맘처리 → 정액 원심분리 → 정자회수 및 난자가 있는 체외수정 배지에 주입 → 체외수정 유도하는 과정이 A 방법보다는 체외수정율이 낮기는 했으나, Y-정자 정자의 응집을 더 많이 유도할 수가 있기 때문에 체외수정 시 X-정자의 체외수정을 높일 수 있다고 판단되어 이후 연구는 B 방법을 이용하여 체외수정을 유도하였다. 또한 체외수정율을 높이기 위하여 정자의 농도를 높이며 그에 따른 체외수정율을 조사함.

[성 분리 키트(홀맘)의 정자처리 방법에 따른 소 성숙난자의 체외수정률과 배발달률 조사]

성 분리 키트의 정자처리 방법	체외수정란 수	분할란 수 (%)	배반포 수	배반포 수 /체외수정란 수 비율	배반포 수 /분할란 수 비율
대조군[1)]	259	193 (74.5%)	61	23.4%	31.5%
A 방법[2)]	298	214 (71.7%)	64	21.9%	30.6%
B 방법[3)]	249	156 (62.8%)	43	17.2%	27.5%
C 방법[4)]	258	54 (20.8%)	14	5.4%	25.9%
D 방법[5)]	296	143 (46.1%)	34	11.2%	24.6%

[1)]대조군 : 동결정액에 홀맘처리 없음 → 정액 원심분리 → 정자회수 및 난자가 있는 체외수정 배지에 주입 → 체외수정 유도

[2)]A 방법 : 동결정액을 융해 후 20분간 홀맘처리 → 정액 원심분리 → 정자회수 및 난자가 있는 체외수정 배지에 주입 → 체외수정 유도

[3)]B 방법 : 동결정액을 융해 → 정액 원심분리 후 20분간 홀맘처리 → 정자회수 및 난자가 있는 체외수정 배지에 주입 → 체외수정 유도

[4]C 방법: 동결정액을 융해 → 정액 원심분리 → 정자회수 체외수정 배지에 주입 후 20분간 홀맘처리 → 난자 주입 체외수정 배지와 연결통로 만듬 → 체외수정 유도

[5]D 방법 : 동결정액을 융해 → 정액 원심분리 → 정자회수 체외수정 배지에 주입 후 20분간 홀맘처리 → 난자 주입 체외수정 배지에 주입 → 체외수정 유도

(나) 성 분리 키트를 활용해 생산된 수정란의 배 발달 개선

홀맘을 처리한 정자를 이용하여 생산된 소 체외수정란 유래 배반포의 생산성 증대를 위하여 소 체외수정 후 생산된 분할란의 배발달을 배양조건에 따라 배반포로의 배발달을 조사하였음. 그 결과 체외수정 후 3일째 분할란을 0.3% fatty acid BSA 첨가한 배지에서 계속배양한 경우 배반포로의 발달이 13.1%였으며, 부화률은 11.33%였음. 하지만 체외수정 후 3일째 분할란을 0.3% fatty acid BSA 첨가한 배지에서 배양 이후 10% FBS 첨가한 배지에서 5일간 배양한 결과에 있어서는 배반포로의 발달이 23.5%였으며, 부화률은 61.4%로 체외수정 후 3일째 분할란을 0.3% fatty acid BSA 첨가한 배지에서 계속 배양한 경우보다 높았음. 따라서 모든 체외수정란의 배양은 체외수정 후 3일째 분할란을 0.3% fatty acid BSA 첨가한 배지에서 배양 이후 10% FBS 첨가한 배지에서 5일간 배양하는 방법을 사용하였음.

[소 수정란 체외수정란의 배발달 향상]

첨가물 처리	분할란 수	배반포 수 (%)	부화 수 (%)
BSA*	199	26 (13.1%)	3 (11.3%)
BSA → FBS**	201	46 (23.5%)	29 (61.4%)

*BSA : 체외수정 후 3일째 분할란을 0.3% fatty acid BSA 첨가한 배지에서 5일간 계속 배양

**BSA → FBS : 체외수정 후 3일째 분할란을 0.3% fatty acid BSA 첨가한 배지에서 배양 이후 10% FBS 첨가한 배지에서 5일간 배양

(2) 수정란 생산 기반 기술을 활용한 키트 제품의 효능 검증

(가) 홀맘 처리 정자에 의한 체외수정 후 배발달율 및 성비조사

① 홀맘이 처리된 정자를 이용하여 소 체외성숙란을 체외수정한 후 배양하였으며, 체외수정 후 분할률과 배발달률을 조사하였음. 그 결과 표에서 보는바와 같이 홀맘을 처리하지 않은 정자를 이용하여 체외수정한 대조군은 분할률이 75.0%로 홀맘만 처리된 정자를 이용하여 체외수정한 경우는 분할율 (66.9%)보다 유의차 있게 높았음. 그러나, 배반포로의 발달율(배반포난/분할난)은 대조군의 경우 36.5%이며, 홀맘 처리된 정자를 이용한 발달율 경우는 34.7%로써 통계적 유의차 없이 동일한 수준으로 체외발달하는 것을 확인하였음.

[홀맘 처리 정자를 이용한 소 체외수정란의 발달율]

Treatment	No. of IVF oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocysts	Ratio of blastocysts in cleaved embryos
Control	813	610 (75.0.%)[a]	224	36.5%[a]
Wholemom treated	1,737	1,156 (66.9%)[b]	404	34.7%[a]

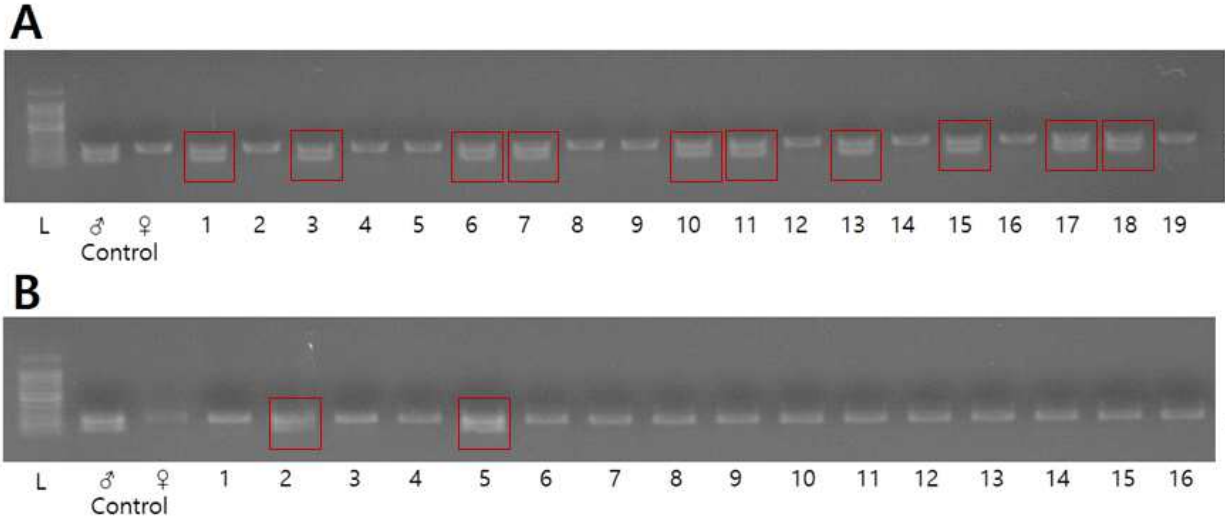
Values with different superscripts (a, b) within column differ significantly (P<0.05).

② 홀맘 제품의 특징은 다음과 같음. 홀맘 처리가 Y 정자의 응집현상을 유도하여 X 정자의 운동성을 현저히 부여하고 이로 인하여 X 정자의 수정확률을 향상시켜, 결국 암컷의 성비가 유의차 있게 높도록 하는 것임. 이를 위하여 본 연구에서는 대조군에서 일반 배반포란 141개, 홀맘 처리정자 유래 배반포란 201개의 생물학적 성을 PCR로 확인하였음. Rattanasuk 등 (2011)이 선행연구에서 수행하였던 multiple PCR Primer를 동일하게 사용하였고, 암소/수소 혈액에서 추출한 genomic DNA를 성판별 control로 사용하였다. 표에서 보는바와 같이 암/수소 유래 genomic DNA에서 암컷은 bovine specific gene만 검출된 216bp의 PCR 산물만이 검출되었으며, 수컷의 경우 bovine specific gene과 bovine male specific product인 181bp의 산물이 동시에 검출되었음. 이러한 결과를 바탕으로 각각의 배반포란에서 검출된 PCR산물의 양상을 반영하여 성을 판별하였음. 이러한 검사 결과는 Table 3에 정리하였으며, control의 경우 총 141개의 배반포란에서 암컷 66개(47.2%), 수컷 75개(52.8%)의 성비를 확인하였음. 홀맘 처리정자 유래 배반포란 201개중에서는 암컷 173(85.4%), 수컷 28(14.6%)의 성비를 관찰하여, 홀맘 처리가 수정란의 성비를 유의차 있게 인위적으로 조절이 가능한 것을 관찰하였음.

[홀맘 처리 정자를 이용한 소 체외수정란의 성비]

Treatment	No. of IVF blastocysts	Sex of IVF blastocysts (%)	
Control	141	Male	75 (52.8)[a]
		Female	66 (47.2)[a]
Wholemom treated	201	Male	28 (14.6)[b]
		Female	173 (85.4)[c]

Values with different superscripts (a-c) within column differ significantly (P<0.05).



[Multiful PCR(소 수컷 특이 유전자; BY, 소 특이 유전자; BSP)을 이용한 체외배반포란의 성비 조사. (A) 대조군 배반포란. 수컷 (1, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 15, 17, 18) 암컷 (2, 4, 5, 8, 9, 12, 14, 16, 19). (B) 홀맘 처리 정자 유래 배반포란. 수컷 (2, 5), 암컷 (1, 3, 4, 6-16). L: 100bp ladder, ♂: 숫소 혈액 DNA , ♀: 암소 혈액 DNA]

(나) 홀맘과 percoll 처리 정자에 의한 체외수정 후 배발달율 및 성비 조사

① 홀맘이 처리된 정자에서 Y-정자를 분리하여 체외수정 후 성비를 조사하기 위하여 표 4에서 보는바와 같이 실시하였음. 체외수정 과정은 동결정액을 융해 → 정액 원심분리 후 20분간 홀맘처리 → percoll 처리 후 응집된 정자회수 → 세척 후 정자를 난자가 있는 체외수정 배지에 주입 → 체외수정 유도 순으로 처리를 하였으며, 그 결과 홀맘을 처리하지 않은 정자를 이용하여 체외수정한 대조군은 분할률이 75.7%로 홀맘을 처리된 정자를 percoll 처리 후 응집된 정자를 이용하여 체외수정한 경우 분할율이 67.5%로써 대조군에 비교하여 낮은 분할율을 보여, 정자의 홀맘처리가 체외수정율을 낮추는 것으로 관찰되었음. 그러나, 배반포로의 발달은 대조군은 37.5%로써 홀맘을 처리된 정자를 percoll 처리 후 응집된 정자를 이용하여 체외수정한 경우 분할율이 36.6%로써 대조군에 비교하여 차이가 없었음.

[홀맘과 percoll 처리 정자를 이용한 소 체외수정란의 발달율]

Treatment	No. of IVF oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocysts	Ratio of blastocysts in cleaved embryos
Control	551	417 (75.7.%)[a]	157	37.5%[a]
Wholemom & percoll treated	751	505 (67.5%)[b]	186	36.6%[a]

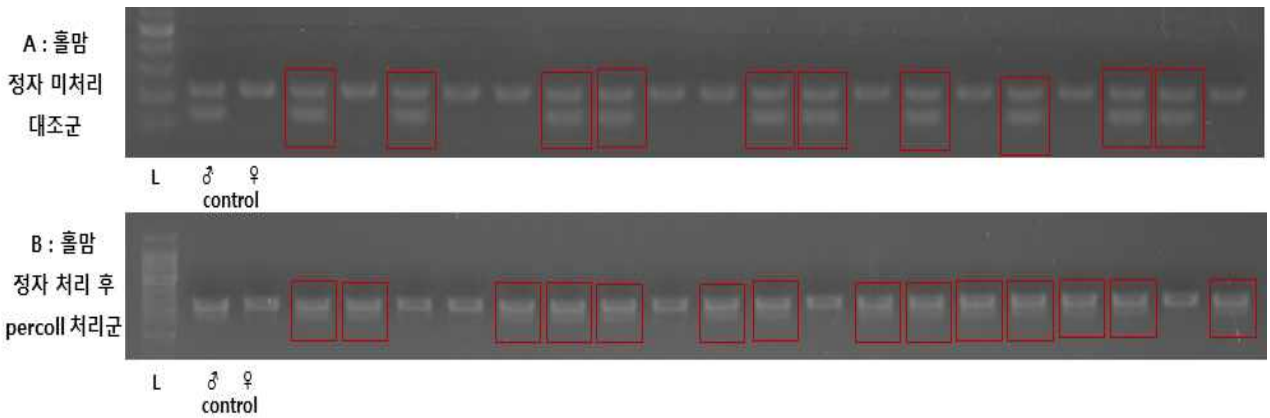
Values with different superscripts (a, b) within column differ significantly (P<0.05).

② 홀맘이 처리된 정자에 percoll을 처리하여 응집된 정자만을 회수하였고, 응집된 정자를 이용하여 체외수정 유래의 배반포를 PCR을 통한 암수의 성판별 조사를 하였을 경우, 표 5와 그림 3에 보는 바와 같음. 그 결과, 표에서 보는 바와 같이 홀맘을 정자처리를 하지 않은 경우의 생산된 소 체외수정란 유래 배반포를 PCR을 통한 암수의 성판별 조사를 한 결과 수컷과 암컷의 비율이 53.4% 대 46.6%인 반면, 홀맘을 처리된 정자를 percoll 처리 후 응집된 정자를 이용하여 생산된 소 체외수정란 유래 배반포를 PCR을 통한 암수의 성판별 조사를 한 결과에서는 수컷과 암컷의 비율이 76.5% 대 23.5%로 수컷의 비율이 높았음. 이와 같은 결과는 홀맘을 정자처리를 하여 응집을 유도한 후 체외수정을 하였을 경우, Y-정자는 응집이 되어 체외수정을 할 수가 없게 되고, 단독 정자 활동을 하는 X-정자들이 체외수정을 하게 된 결과로 사료되며, 이렇게 응짐된 정자를 회수하여 응진된 정자를 분리 후 체외수정을 유도한다면 Y-정자를 이용하여 체외수정을 한 것으로 사료됨.

[홀맘, percoll 처리 정자 유래의 소 체외수정란의 성비]

Treatment	No. of IVF blastocysts	Sex of IVF blastocysts (%)	
Control	157	Male	84 (53.4)[a]
		Female	73 (46.6)[a]
Wholemom & percoll treated	186	Male	143 (76.5)[b]
		Female	43 (23.5)[c]

Values with different superscripts (a-c) within column differ significantly (P<0.05).



[Multiful PCR(소 수컷 특이 유전자; BY, 소 특이 유전자; BSP)을 이용한 체외배반포란의 성비 조사. A : 대조군 체외 배반포란, B : 홀맘 처리로 응집된 정자를 percoll로 수집하여 생산한 소 체외 배반포란 (L : 100 bp leader, ♀ : 암컷 혈액 DNA, ♂ : 수컷 혈액 DNA, □ : 수컷)]

사. 인공수정 임상 시험을 통한 수정란 생산 키트 제품의 효능 검증

(1) 성 분리 키트를 활용해 동결정액을 이용한 현장에서의 인공수정

성 분리 키드(홀맘)가 처리된 해동 정액으로 현장에서 인공수정을 실시하였으며, 인공수정 후 임신여부 및 산자에 따른 성판별 조사를 실시하였음. 표에서 보는 바와 같이 19개 농가를 대상으로 100두의 한우에 홀맘이 20분간 처리된 정액으로 2017년 7월 중순부터 인공수정을 하였으며, 표에서 보는바와 같이 대조군에 홀맘이 처리된 해동 정액으로 현장에서 인공수정을 실시한 결과를 비교하였을 때 임신율 (82.7% vs 79.0%), 유산율 (8.3% vs 5.1%) 및 분만율(91.7% vs 94.9%)에 차이가 없었음. 하지만 암컷 산자의 생산에 있어서 대조군에 홀맘이 처리된 해동 정액으로 현장에서 인공수정을 실시한 결과를 비교하였을 때 56.1%와 72.0%로 홀맘이 처리된 해동 정액으로 현장에서 인공수정을 하였을 경우가 높았음.

[성 분리 키드(홀맘)를 활용한 인공수정 후 임신여부 및 산자에 따른 성판별 조사]

Treatment	No. of AI	No. (%) pregnancy	No. (%) abortion	No. (%) parturition	No. (%) of sex determine in offsprings	
Control	87	72 (82.7)	6 (8.3)	66 (91.7)	Male	29 (43.9)
					Female	37 (56.1)
Wholemom treated	100	79 (79.0)	4 (5.1)	75 (94.9)	Male	21 (28.0)
					Female	54 (72.0)

(2) 성 분리 키트를 활용해 동결정액을 이용하여 생산된 배반포의 현장에서의 수정란 이식

(가) 홀맘 처리정자를 활용해 생산된 소 배반포를 대리모에 수정란 이식을 하여 산자생산을 시도하였음. 본 연구진은 이전에 활용한 개선된 비 외과적 수정란 이식방법으로 체외수정란을 이식하였음. 그 결과를 보면 표에서 보는바와 같이 체외수정란 유래의 배반포를 1개 혹은 2개씩 대리모에 이식하였을 경우 임신율이 25.6%와 34.6%롤 대리모에 2개씩 이식하였을 경우가 유의적으로 높았음. ($p < 0.05$). 표에서 보는바와 같이 배반포 이식시 수란우의 자연발정과 발정유도에 따른 임신율 조사에 있어서는 PG투여에 의한 발정유도(35.1%)의 경우나 자연발정(33.6%)을 유도한 경우와 차이가 없었음. 한편, 표에서 보는바와 같이 대리모의 황체상태에 따른 배반포의 이식 후 임신율 조사에 있서서는 황체상태에 따라 황체가 정상이고 끝부분에 관(crown)이 있는 경우를 A군, 황체가 정상보다 작은 15mm이하이면서 crown이 있는 경우를 B군, 그리고 황체 크기는 정상이나 crown이 없는 것을 C군으로 분류하여 확장배반포를 이식하였다. 그 결과 표에서 보는바와 같이 A군은 34.7%, B군은 32.3%로서 임신율의 차이는 없었지만, C군의 경우 14.5%로써 A와 B군보다 유의하게 낮았음 ($p < 0.05$).

[대리모에 이식되는 배반포 수에 따른 임신율 조사]

No. of blstocysts transferred	No. of recipients	No.(%) of pregnancy
One	54	14 (25.9)[a]
Two	118	41 (34.7)[b]

[a,b]Within a row, values without a common superscript differed (P < 0.05).

[배반포 이식시 대리모의 자연발정과 발정유도에 따른 임신율 조사]

Estrus	No. of recipients	No.(%) of pregnancy
Natural estrus	172	57 (33.1)
Estrus induction*	78	27 (34.6)

*PG 투여에 의한 발정유기

[대리모의 황체상태에 따른 배반포의 이식 후 임신율 조사]

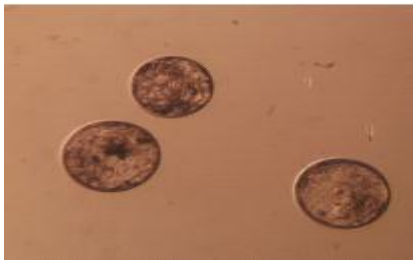
Condition of corpus luteum	No. of recipients	No.(%) of pregnancy
A	99	35 (35.4)[a]
B	86	27 (31.3)[a]
C	58	9 (15.5)[b]

[a,b]Within a row, values without a common superscript differed (P < 0.05).

(나) 따라서, 이러한 수정란 이식 조건을 바탕으로 홀맘 처리정자를 활용해 생산된 소 배반포를 이식 한다면, 표 10에서 보는바와 같이 금년까지 40두의 대리모에 이식이 완료되며, 이들로부터 내년에 태어날 산자의 성비를 조사할 예정이음. 이전의 일반 체외수정란을 대리모에 1개씩 이식하였을 경우는 임신율이 25.6%, 유산율이 7.1%, 분만율이 92.9%였으며, 이들 생산된 산자에서 수컷이 76.9%와 암컷이 23.1%로 체외수정란을 대리모에 이식하였을 경우 특이적으로 수컷의 산자생산이 많았음.

[소 일반 체외수정란과 홀맘 처리정자 유래 체외수정란의 이식 성적 비교]

Species of blstocysts	No. of recipients	No. (%) of pregnancy	No. (%) of abortion	No. (%) of parturition	No. (%) of	
					Male	Female
Normal IVF embryos*	54	14 (25.6)	1 (7.1)	13 (92.9)	10 (76.9)	3 (23.1)
Wholemom treated embryos**	40	11 (28.3)	-	11 (100)	3 (27.3)	8 (72.7)



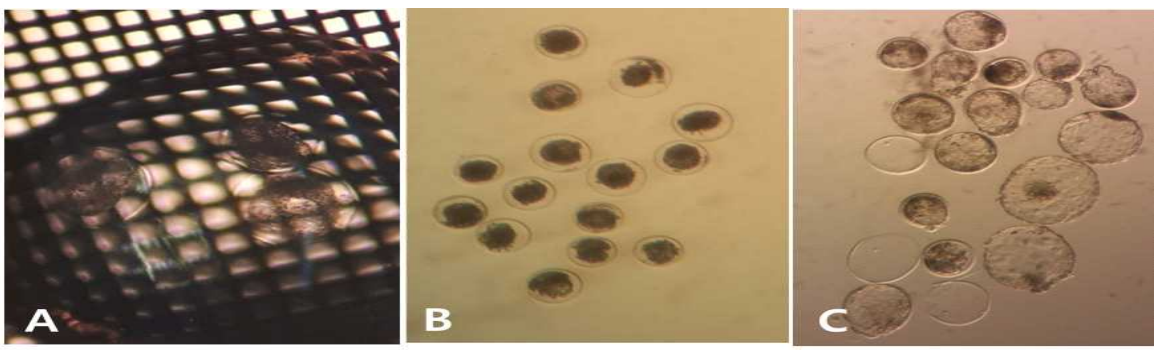
[홀맘 처리정자를 활용해 생산된 소 배반포]

(3) 생산된 성 분리 체외수정란의 동결보존

성 분리 키트(홀맘)를 활용해 생산된 소 수정란 유래 배반포의 동결보존 후 대리모 이식을 통한 성 분리 산자생산을 향상을 위하여 표 4에서 보는바와 같이 0.25ml straw와 EM grid 동결용기을 이용하여 초자화 동결융해 후 동결용기에 따른 생존율(재확장 배반포률)을 조사하였음. 그 결과 straw 동결용기를 이용하여 31개 배반포를 초자화 동결융해 후 재확장 배반포률이 34.6%로 상태가 보통이었지만, EM grid 동결용기를 이용하여 초자화 동결방법으로 동결융해 후 재확장 배반포률에 있어서 90.5%로 상태도 양호함 (그림 3). 따라서 이렇게 개발된 EM grid 동결용기을 이용하여 초자화 동결방법을 이용한다면 차후 홀맘을 활용해 생산된 소 수정란 유래 배반포를 동결보존 후 산자 생산이 가능하리라 사료됨.

[동결방법에 따른 소 이식용 배반포 동결융해 결과]

동결용기	동결 배반포 수	융해 후 재확장 배반포 수 (%)	융해 후 배반포 상태
0.25ml straw	31	11 (34.6%)	보통
EM grid	44	39 (90.5%)	양호



[소 배반포의 EM grid 초자화 동결방법으로 동결 후 융해한 배반포 (A : EM grid에 동결 전 배반포 loading, B : 융해직후, C : 융해 후 부화된 배반포)]

아. 원 정액을 이용한 홀맘 처리에 따른 성 조절 효능 검증

(1) 원 정액에 홀맘 처리 후 동결보존

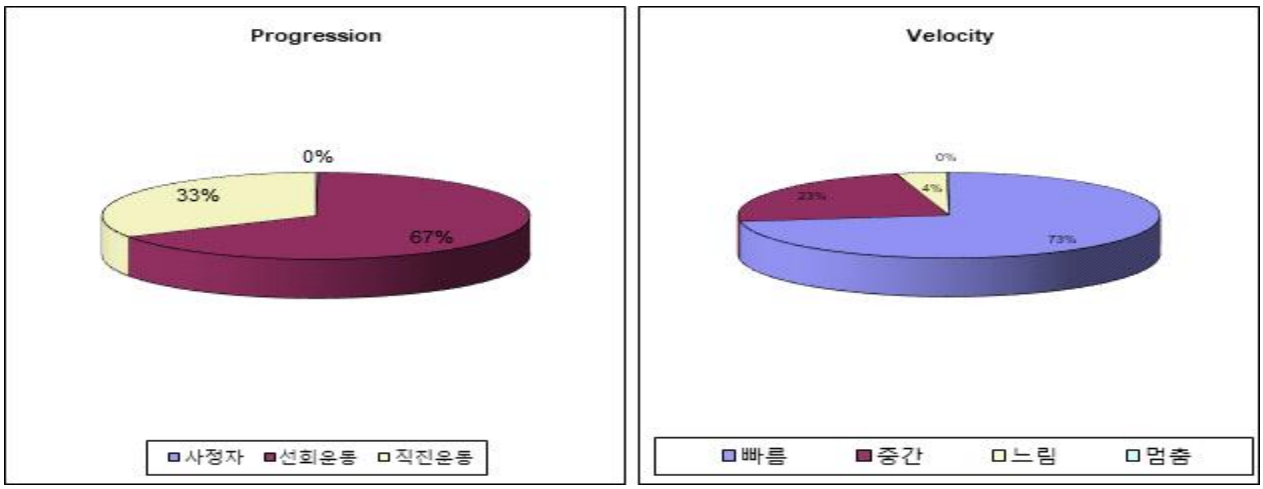
(가) 원정액에 홀맘을 처리 후 동결보존된 정액을 확보하기 위하여 횡성 축협 생축장의 종모우으로부터 정액을 채취하였음. 정액을 채취 후 원정액을 조사한 결과, 표 12에 보는바와 같이 총 4,518백만 정자 중 8백만이 사정자, 3,014백만마리가 선회운동 및 1,496백만마리가 직진운동하는 것으로 조사되었으며, 표 13에서 보는바와 같이 원정자의 활력은 빠름 3,281백만마리, 중간 1,058백만마리, 느림 173백만마리 및 멈춤 8백만마리로 조사되었음.

[원정액 농도 정보]

전진성	총 (단위 : 백만)	Percentage (%)	농 도	
			백만/ml	총 사출량 중
사정자	8	0.2%	6.4	31.9
선회운동	3,014	66.7%	2,400.0	12,000.1
직진운동	1,496	33.1%	1,191.3	5,956.3
총합	4,518	100.0%	3,597.6	17,988.2
			(≥ 20 mill/ml)	(≥ 40 mill/total)

[원정액 활력 정보]

속도	총합	Percentage (%)	농 도	
			백만/ml	총 사출량 중
빠름	3,281	72.6%	2,612.6	13,063.2
중간	1,056	23.4%	840.9	4,204.4
느림	173	3.8%	137.8	688.8
멈춤	8	0.2%	6.4	31.9



[원정액 농도 및 활력정보]

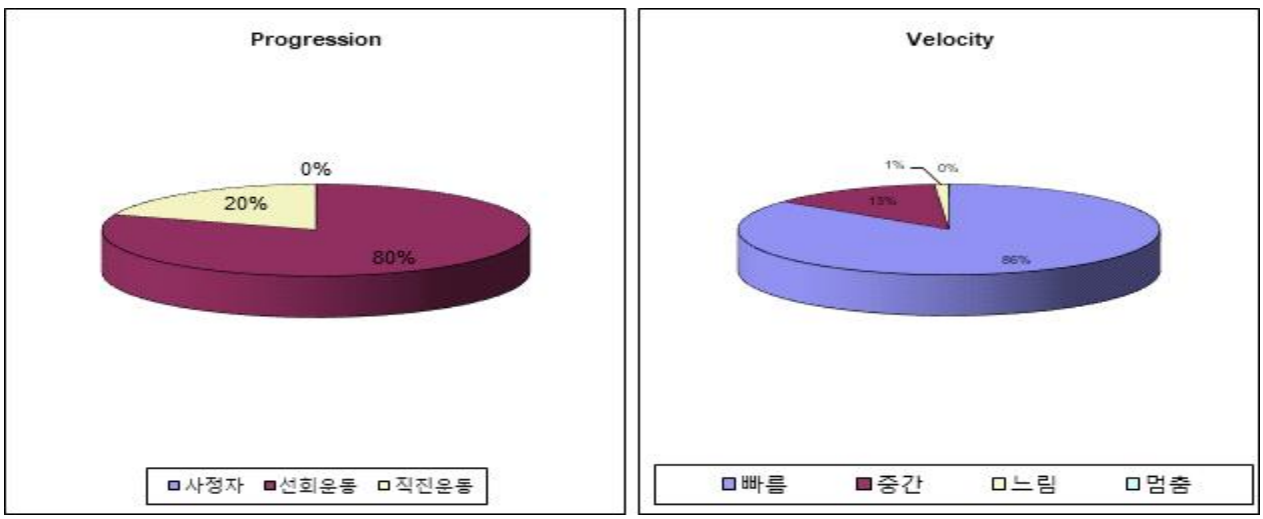
(나) 이 원정액에 홀맘을 20분간 처리한 후 조사한 결과에 있어서는 표 14에 보는바와 같이 총 3,041백만 정자 중 1백만이 사정자, 2,444백만마리가 선회운동 및 596백만마리가 직진운동하는 것으로 조사되었으며, 표 15에서 보는바와 같이 원정자의 활력은 빠름 2,603백만마리, 중간 404백만마리, 느림 33백만마리 및 멈춤 1백만마리로 조사됨. 이 결과는 원정액을 채취 후 조사한 결과 보다 마리수가 적게 조사되었는데. 그러한 이유는 그림 8에서 보는바와 같이 홀맘 처리 후 많은 정자들이 응집이 이루어졌기에 원정액을 조사한 결과 보다는 낮은 수의 정자들이 조사한 된 것으로 사료됨.

[원정액에 홀맘 처리 후 농도 정보]

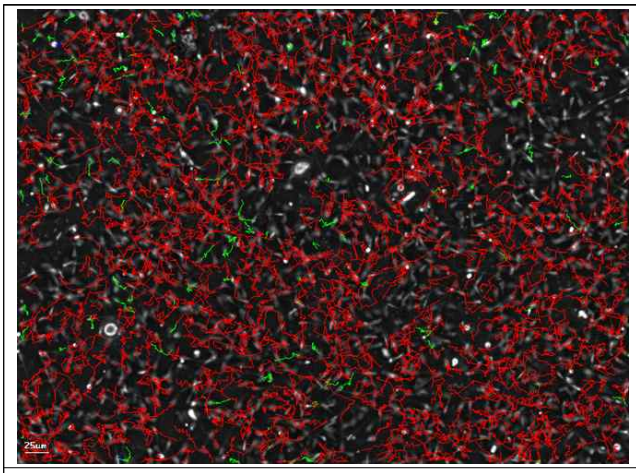
전진성	총 (단위 : 백만)	Percentage (%)	농 도	
			백만/ml	총 사출량 중
사정자	1	0.0%	1.4	7.2
선회운동	2,444	80.4%	3,500.7	17,503.7
직진운동	596	19.6%	853.7	4,268.5
총합	3,041	100.0%	4,355.9	21,779.4
			(≥ 20 mill/ml)	(≥ 40 mill/total)

[원정액에 홀맘 처리 후 활력 정보]

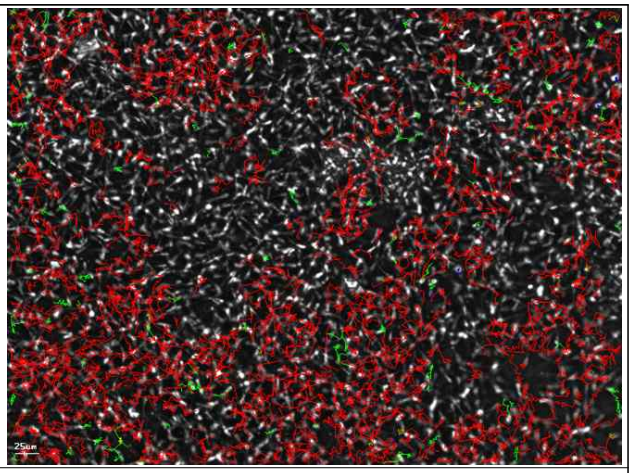
속도	총합	Percentage (%)	농 도	
			백만/ml	총 사출량 중
빠름	2,603	85.6%	3,728.5	18,642.4
중간	404	13.3%	578.7	2,893.4
느림	33	1.1%	47.3	236.3
멈춤	1	0.0%	1.4	7.2



[원정액에 홀맘 처리 후 농도 및 활력 정보]



A : 채취 후 원정액 활력성

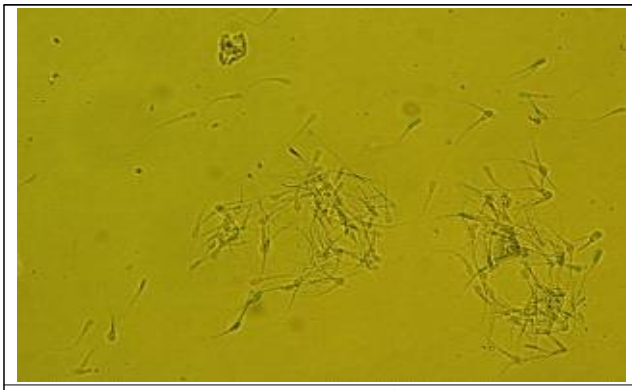


B : 홀맘처리 후 원정액 활력성

[원정액과 홀맘처리 후 정액을 활력성 비교 (빨간색 : 직진운동하면서 빠름, 녹색 : 직진운동하면서 느림, 파랑색 : 선회운동, 노란색 : 사정자)]

(2) 원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정자에 의한 체외수정 후 배발달율, 성판별 및 인공수정

(가) 원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정자에 의한 체외수정하여 배발달율과 성판별 조사 및 인공수정을 실시하였음. 그 결과 순수한 동결보존된 정액을 해동 후 홀맘 처리 후 정자의 응집현상과 원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정자를 해동하였을 경우 정자의 응집현상을 우선 비교하였을 때, 그림 9에서 보는바와 같이 원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정자의 응집현상이 순수한 동결보존된 정액을 해동 후 홀맘 처리 후 정자의 응집현상이 확연하게 많이 일어나 있는 것이 확인이 되었음. 그러한 이유는 순수한 동결보존된 정액은 정액을 채위 후 희석을 하였기에 원정액에 홀맘 처리를 하였을 경우는 보다는 정자의 밀도가 떨어져서 원정액에 홀맘 처리를 하였을 경우가 밀도가 높기에 홀맘을 처리하였을 경우 밀집된 상태에서 홀맘의 반응이 많은 Y-정자의 응집을 야기시킨 것으로 사료됨. 이러한 원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정자를 이용하여 체외수정을 하였을 경우, 표 16에서 보는바와 같이 홀맘 비처리군의 분할율 75.1%와 분할란의 배반포로의 발달율 35.8%에 비교하여 홀맘 처리군의 분할율 66.4%로 비처리군에 현저하게 낮았지만 분할란의 배반포로의 발달율은 35.8%로 비처리군과 차이가 없었음. 이러한 이유는 홀맘 처리군의 경우 응집된 정자들이 많아 수정율이 낮아진 것으로 보여지지만, 분할란의 배반포로의 발달율은 차이가 없는 것으로 보여 홀만 처리가 수정란의 발달율에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨. 이러한 원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액을 이용하여 체외수정 후 생산된 배반포의 성판별의 결과에 있어서는 표 17과 그림 10에서 보는바와 같이 암컷 배반포가 홀맘 비처리군 46.4%과 홀만 처리군 95.8%로써 원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액을 이용하여 체외수정 후 생산된 배반포에서 현저하게 높은 암컷 배반포의 생산을 하였음. 이러한 결과는 표 3에서 보는바와 같이 순수한 동결보존된 정액을 해동 후 홀맘 처리한 정자를 이용하여 체외수정 후 생산된 암컷 배반포로 85.4% 보다도 높은 결과를 얻었음. 이러한 결과는 원정액에 홀맘 처리를 하였을 경우가 밀도가 높기에 강한 홀맘의 Y-정자의 응집반응으로 인하여 것으로 사료됨. 이러한 원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액을 이용하여 인공수정을 실시하였으며 (표 18), 2020면 7월부터 분만할 예정이므로, 추후에 결과에 대하여 보고할 것임.



A : 순수한 동결본존된 정액을 해동 후 홀맘 처리 후 정자의 응집현상

B : 원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정자의 응집현상

[원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액을 해동 후 응집현상]

[원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액을 이용하여 생산된 소 체외수정란의 발달율]

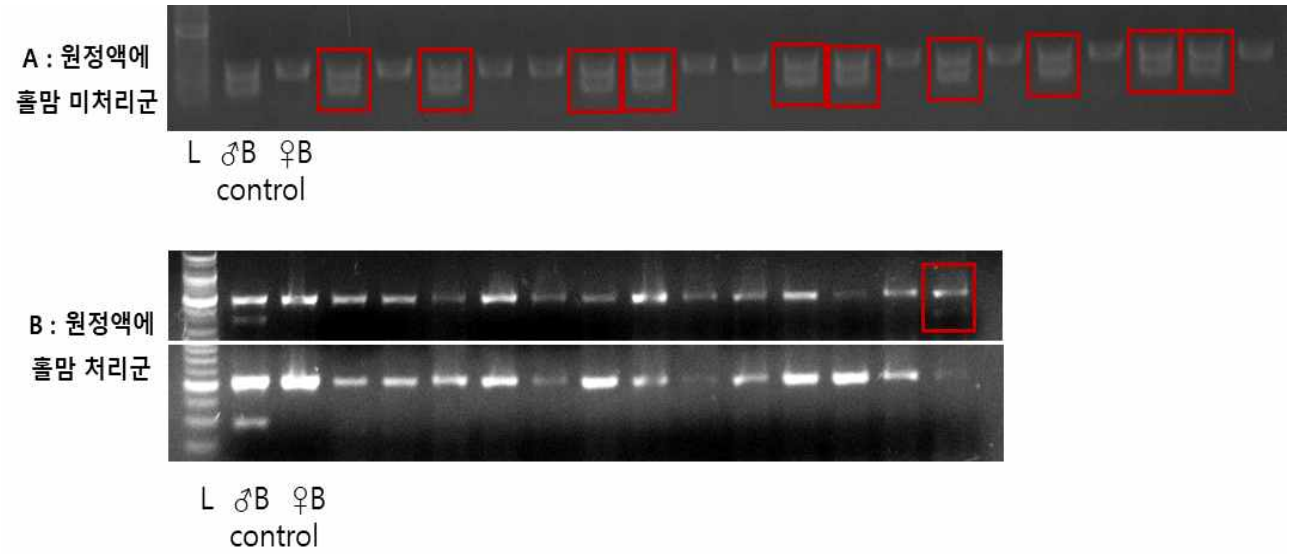
Treatment	No. of IVF oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocysts	Ratio of blastocysts in cleaved embryos
Control	573	429 (75.1.%)[a]	153	35.8%[a]
WM treated frozen semen	582	387 (66.4%)[b]	135	34.8%[a]

Values with different superscripts (a, b) within column differ significantly (P<0.05).

[원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액을 이용하여 체외수정 후 생산된 배반포의 성판별]

Treatment	No. of blastocysts	No. (%) of male blastocysts	No. (%) of female blastocysts
Control	104	56 (53.6)[a]	48 (46.4)[a]
WM treated frozen semen	97	4 (4.2)[b]	93 (95.8)[b]

Values with different superscripts (a, b) within column differ significantly (P<0.05).



[Multiful PCR(소 수컷 특이 유전자; BY, 소 특이 유전자; BSP)을 이용한 체외배반포란의 성비 조사. A : 원정액에 홀맘 미처리군 배반포, B : 원정액에 홀맘 미처리군 배반포 (L : 100 bp leader, ♀ : 암컷 혈액 DNA, ♂ : 수컷 혈액 DNA, □ : 수컷)]

[원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액을 이용하여 인공수정 후 임신여부 및 산자에 따른 성판별 조사]

Treatment*	No. of AI	No. (%) pregnancy	No. (%) abortion	No. (%) parturition	No. (%) of sex determine in offsprings	
Control	93	78 (83.9)	-	-	Male	-
					Female	-
Wholemom treated	200	149 (74.5)	-	-	Male	-
					Female	-

*2020년 7월부터 분만예정

(나) 숫컷 배반포의 생산을 위하여 원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정자에 응집된 정자들을 핏펫으로 골라 회수한 후 응집을 핏펫팅으로 싱글 정자를 만든 후 체외수정하여 배발달율과 성판별 조사하였음. 그 결과 표 19에서 보는바와 같이 순수한 동결보존된 정액을 해동 후 체외수정하였을 경우 분할율 76.7%와 분할란의 배반포로의 발달율 36.8%에 비교하여 원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정자에 응집된 정자들을 핏펫으로 골라 회수한 후 응집을 핏펫팅으로 싱글 정자를 만든 후 체외수정하였을 경우의 분할율 60.4%로 비처리군에 현저하게 낮았지만 분할란의 배반포로의 발달율은 33.8%로 비처리군과 차이가 없었음. 이러한 이유는 홀맘의 Y-정자의 응집반응으로 인하여 Y-정자의 활력이 낮아진 것으로 사료됨. 이러한 정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정자에 응집된 정자들을 핏펫으로 골라 회수한 후 응집을 핏펫팅으로 싱글 정자를 만든 후 체외수정하여 생산된 배반포의 성판별의 결과에 있어서는 표 20과 그림 11에서 보는바와 같이 수컷 배반포가 홀맘 비처리군 55.6%

과 홀만 처리군 74.2%로써 원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액을 이용하여 체외수정 후 생산된 배반포에서 현저하게 높은 암컷 배반포의 생산을 하였음. 하지만 수컷 배반포의 보다 높은 배반포의 생산이 되지 않은 이유는 홀맘의 Y-정자의 응집반응으로 인하여 Y-정자의 활력이 낮아지고, 응집된 정자를 회수시 응집이 안된 활력이 좋은 정자(X-정자)도 같이 회수가 되기 때문인 것으로 사료됨.

[원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액에서 응집된 정자만을 회수하여 체외수정 후 생산된 소 체외수정란의 발달율]

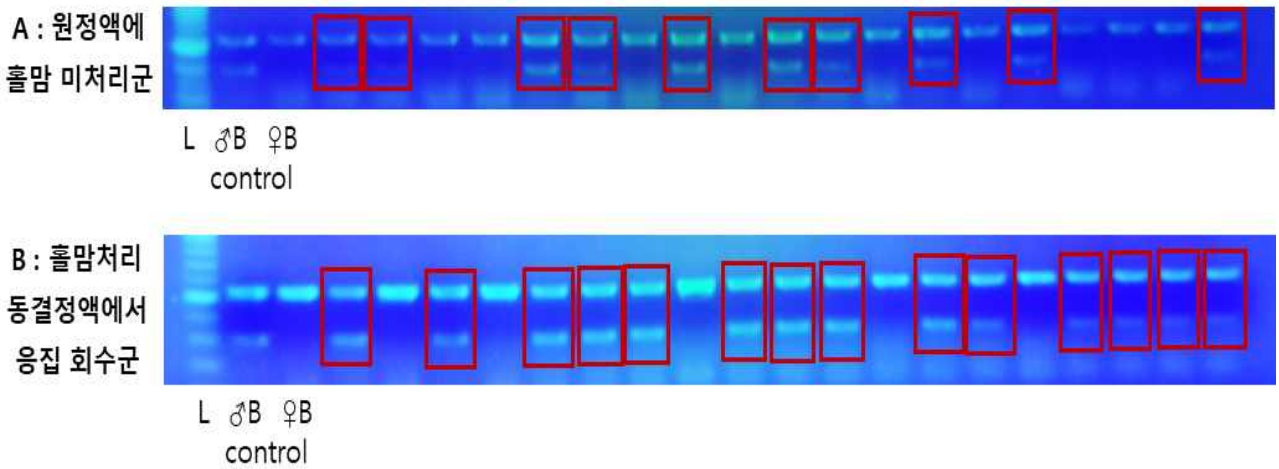
Treatment	No. of IVF oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocysts	Ratio of blastocysts in cleaved embryos
Control	481	368 (76.7%)[a]	135	36.8%[a]
Agglutination sperm	582	301 (60.4%)[b]	102	33.8%[a]

Values with different superscripts (a, b) within column differ significantly (P<0.05).

[원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액에서 응집된 정자만을 회수하여 체외수정 후 생산된 배반포의 성판별]

Treatment	No. of blastocysts	No. (%) of male blastocysts	No. (%) of female blastocysts
Control	92	51 (55.6)[a]	41 (44.4)[a]
Agglutination sperm	68	50 (74.2)[b]	18 (25.8)[b]

Values with different superscripts (a, b) within column differ significantly (P<0.05).

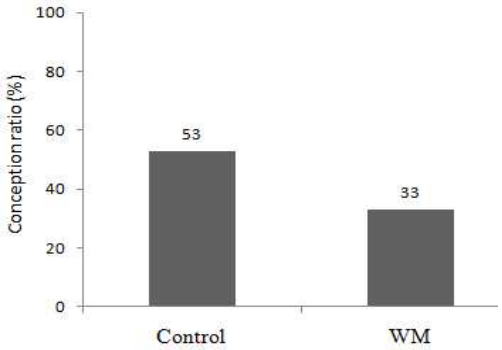


[Multiful PCR(소 수컷 특이 유전자; BY, 소 특이 유전자; BSP)을 이용한 체외배반포란의 성비 조사. A : 원정액에 홀맘 미처리군 배반포, B : 홀맘 처리 동결정액에서 응집 회수군 유래 배반포 (L : 100 bp leader, ♀ : 암컷 혈액 DNA, ♂ : 수컷 혈액 DNA, □ : 수컷)]

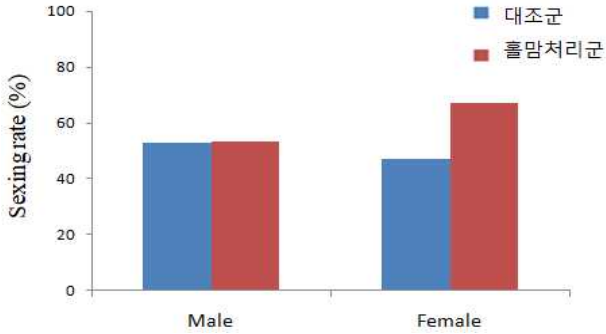
자. 국외 홀맘 임상 시험

(1) 브라질에서의 임상 효능 검증 결과

브라질에서 홀맘 제품 공급을 통하여 현지 농장에서 사육하고 있는 총 207마리의 소를 대상으로 발정동기화를 유도한 다음 냉동정액을 사용해 인공수정을 실시하고 총 87마리의 대조군 소에 일반 냉동정액을 인공수정 하고 총 120마리의 소를 대상으로 홀맘 처리한 냉동정액으로 인공수정을 실시하였음. 이 결과 대조군에서는 41.4%의 수태율이 관찰되었고 홀맘 처리군에서는 39.2%의 수태율이 관찰되어 두 군간의 유의한 수태율의 변화가 관찰되지 않았음. 또한 성비 조절 효능을 분석한 결과 대조군에서는 암컷(47%), 수컷(53%)의 비율로 성비가 관찰되었으나 홀맘을 처리한 냉동정액으로 수정한 소에서는 암컷(67%)와 수컷(33%의 비율로 약 25%이상의 암컷 생산 비율이 증대되는것이 관찰되었음.



[수태율]



[성비조절 효능]

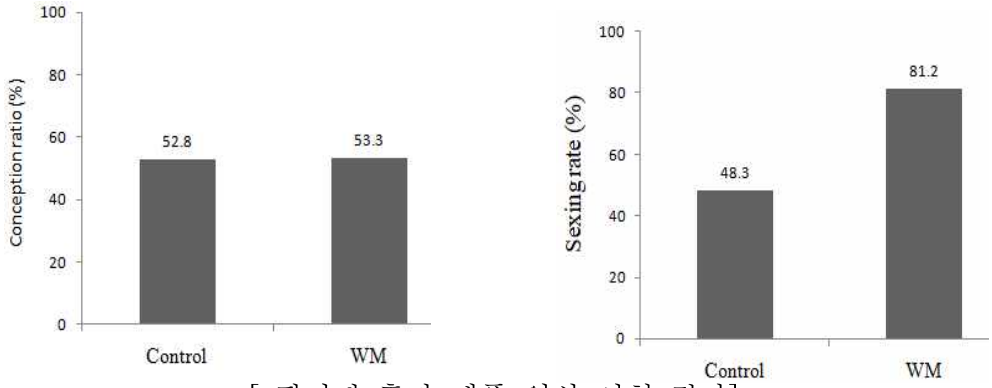
[브라질 홀맘 제품 임상 시험 결과]

(2) 필리핀 홀맘 성 조절 효능 검증

필리핀의 물소를 대상으로 하는 홀맘 제품의 임상시험을 실시하여 성비 조절 효능을 검증하였음. 먼저 원정액에의 첨가를 통한 홀맘에 의한 정자 특이적 결합 및 분리 효능을 검증하고자 총 20억마리의 정자를 채취하여 원심분리(1000G)로 정장부분을 제거한 다음 4ml의 난황단백질이 함유된 정액희석제를 첨가하고 2ml의 홀맘을 첨가하여 4E에서 0.5, 1,2,3,과 4시간동안 반응을 유도하여 CASA분석을 실시하였음. 처리 후 정자의 운동성은 시간 경과에 따른 93, 95.6,85.5의 비율로 정자의 생존이 관찰되었음. 또한 정자의 운동성은 처리후 4시간 에 CASA분석을 통하여 비교한 결과 대조군과 차이가 없음. 또한 응집된 정자를 회수하여 응집 정자의 Y염색체를 지닌 정자의 비율을 유전자 검증을 실시한 결과 95%의 비율로 Y정자가 응집되어 있다는 사실이 밝혀졌음.

물소를 대상으로 하는 임상시험은 총 120두의 물소를 대상으로 PGF2 alpha와 GnRH로 발정동기화를 유도한 다음 각각 60마리의 소를 대상으로 대조군과 홀맘 처리군에 동결된 정액으로 인공수정을 실시하여TDma. 인공수정 후 65일령에 임신감별을 실시한 결과 대조군에서 52.8%, 홀맘처리군에서 53.3%의 수태율이 관찰되어 홀맘 처리군과 비처리군에서는 차이가 관찰되지 않았음. Ultrasound를 이용해 임신된 소의 성비를 조사한 결과 대조군에서는 48.3%, 홀맘처리군에서는 81.2%의 비율로 암소가 임신되어있다는 사실이 검증되었음.

[수태율] [암소 생산 효율]



[필리핀 홀맘 제품 임상 시험 결과]

[필리핀에서의 소 성 조절 효능 결과 포스트]

Gender preselection in water buffaloes calves through sexed semen using "sexing reagent"

L. C. Cruz[1], DongKu Kim[3], Emma Venturina[2], Hernando Venturina[2], Erwin Encarnacion[2] Paolo Ventrurina[2], Anabelle Sarabia[2], Claro Mingala[1] and Rosemarie

[1]Stephenhann Df, Lomboy, Tayabo, San Jose City, Nueva Ecija, Philippines
[2]Philippine Carabao Center, Science City of Munoz, Nueva Ecija, Philippines
[3]NURI Science Inc, 320 Achasan-Ro,Gwangji-Gu, Seoul 05053, Korea

ABSTRACT

Semen from Italian Mediterranean buffaloes semen donor was collected and aliquot containing 2 billion sperm cells were subjected to centrifugation at 1000G. Thereafter, the seminal plasma was completely removed and was replaced with 4 ml semen yolk extender. The diluted semen were divided into two equal volume. The first part served as the control and the second part was diluted with 2 ml of "WholeMom" resulting at sperm concentration of 250 million/ml. The diluted semen were stored under 4C and sperm motility and sperm agglutination were observed at 0.5, 1, 2, 3 and 4 hours thereafter. Initial sperm motility evaluated under CASA after collection, after centrifugation and after dilution were 93.01, 85.59 and 85.50, respectively. Sperm motility in both treatments remained unchanged after 4 hours of incubation under 4C. Agglutination of sperm was noted starting 0.5 hour after addition of "WholeMom" and maximum agglutination was noted 2 hours after dilution. The agglutinated sperm were collected and were analysed thru PCR and were found to be 95% Y sperm cells.

A follow up study was conducted involving 120 Italian mediterranean buffalo multiparous cows synchronised using PGF2 alpha and GnRH. Sixty cows were inseminated using the frozen-thawed semen (Treatment 1), while the other 60 cows were inseminated using frozen-thawed semen diluted with "WholeMom" 20 minutes prior to insemination (Treatment 2). Pregnancy Diagnosis conducted at 65 days after insemination revealed that 52.8% and 53.3% pregnancy rate in Treatments 1 and 2, respectively. Fetal gender determination using ultrasound at day 65 revealed that sex of fetuses were 48.3 % and 81.2 % female in Treatments 1 and 2, respectively.

(3) 미국의 CRI 정액 생산 센터에서 시행한 홀맘 성 조절제품의 성 조절효능을 검증 의뢰하여 동결정액을 이용한 홀맘 처리 정액을 사용해 수정란 생산을 통한 성비 조절 효능을 검증한 결과, 대조군의 43.8%의 암컷 수정란 생산 효율에 비해서 홀맘 처리 냉동정액에서는 88.5%의 암컷 수정란이 생산되었음. 또한 원정액에 홀맘을 처리해 생산된 성감별 냉동정액을 이용한 수정란에서의 성비 조절 효능을 검증한 결과 대조군의 42.9%에 비해서 홀맘 처리 성감별 냉동정액에서는 80%의 암컷 수정란 생산 효율이 관찰되었음.

[미국 CRI 정액 센터에서의 홀맘 성 감별 효능 검증 결과]

Group (semen)	Replicate	No. of culture	No. of cleaved (%)	No. of blastocyst D8 (%)	Sexing (Female, Male)	Female to male ratio %
Control (frozen-thawed)	1	44	38 (86.4)	7 (15.9)	4F, 3M	57.1
	2	51	44 (86.3)	10 (19.6)	5F, 5M	50
	3	57	48 (84.2)	8 (14.0)	3F, 5M	37.5
	4	48	39 (81.3)	7 (14.6)	2F, 5M	28.6
	Total	200	84.6±2.4	16.0±2.5	14F, 18M	**43.8**
Whole Mom (frozen-thawed)	1	39	32 (82.1)	4 (12.5)	4F	100
	2	47	41 (87.2)	7 (14.9)	6F, 1M	85.7
	3	56	44 (78.6)	9 (16.1)	8F, 1M	88.9
	4	51	43 (84.3)	6 (11.8)	5F, 1M	83.3
	Total	193	83.1±3.6	13.8±2.0	23F, 3M	**88.5**

Group (semen-bull)	Replicate	No. of culture	No. of cleaved (%)	No. of blastocyst D8 (%)	Sexing (Female, Male)	Female to male ratio %
Control (fresh-12859)	1	48	38 (79.2)	9 (18.8)	4F, 5M	44.4
	2	46	24 (52.2)	8 (17.4)	4F, 4M	50
	3	31	14 (45.2)	4 (12.9)	1F, 3M	25
	Total	125	58.9±13.6	16.3±9.5	9F, 12M	**42.9**
Whole Mom (fresh-12859)	1	43	31 (72.1)	7 (16.3)	6F, 1M	85.6
	2	44	24 (54.5)	5 (11.4)*	3F, 1M	75
	3	33	15 (45.5)	4 (12.1)	3F, 1M	75
	Total	120	57.4±9.8	13.2±7.2	12F, 3M	**80.0**

*lost 1 sample during fixation. Possible daily variations in Bull #12859 collection. Need further modification for the IVF procedure using fresh semen which requires longer capacitation time than using in frozen thawed semen.

2-5. 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.88억원
			향후 3년간 매출	10억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	10억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.04% 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 0.5 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : 2 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		2 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1 위

항 목	세부 항목				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1		
	소요예산(백만원)		2,000		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0.88	100	1,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.44	10	20
		국외	0	1	3
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		염소 암컷 생산 성조절 키트, 양 암컷 생산 성조절 키트, 말 암컷 생산 성조절 키트, 개 암컷 생산 성조절 키트		
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		0.9	60	100
	수 출		0.05	40	900

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표
1차 년도 (2017)	정자 특이 단백질을 이용한 성 감별 정자 생산 제품 개발	정자 성분리 바이오 제제 대량 생산 및 정제 기술 확립
	개발된 기술/제품의 실용화를 위한 임상 효능 평가	수정란 생산을 위한 난자확보 및 성 감별 정자 분리 방법 확립
2차 년도 (2018)	정자 특이 단백질을 이용한 성 감별 정자 생산 제품 개발	고 효율의 성 감별용 수정란 생산 키트 개발
	개발된 기술/제품의 실용화를 위한 임상 효능 평가	체외 수정란 생산용 키트 제품의 성감별 효능 검증
3차 년도 (2019)	정자 특이 단백질을 이용한 성 감별 정자 생산 제품 개발	원정액을 이용한 성 감별된 냉동정액 생산 기술 개발
	개발된 기술/제품의 실용화를 위한 임상 효능 평가	성감별 원정액을 이용해 체외수정 및 인공수정을 통한 성 감별 정액 효능 검증

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	개발내용	달성도	목표별 가중치
1차 년도 (2017)	정자 특이 단백질을 이용한 성 감별 정자 생산 제품 개발	정자 성분리 바이오 제제 대량 생산 및 정제 기술 확립	단백질 생산 세포주의 무혈청 배양 기법 확립	·무혈청 배지를 이용해 각 배지별에 따른 세포의 증식 효능을 MTT분석 방법으로 검증하여 최적의 세포주 증식 효능을 지닌 무혈청 배지 한 개를 선별하였음.	100	5
			단백질 제제의 특성 및 안정성 검증	·각 배지별에 따라 생산되는 단백질의 생산량 및 특성을 ELISA 기법을 통하여 분석한 결과 최적의 단백질 생산용 배지를 선별하였음. 또한 실제 소 정자를 이용한 반응 여부를 조사한 결과, 기존의 혈청 배지 생산 단백질과 동일한 정자 반응이 유도된다는 사실이 판명되었음.	100	5
			정자 분리 기반	무혈청 배지에서 생산된 단백	100	5

			기술 확립	질을 이용해 동결 정자를 대상으로 X 정자 또는 Y정자의 정자 분리 방법을 확립하여 각 농도에 따른 정자 분리 효능을 확인하였음. 침전 및 Percoll을 이용한 Y정자 및 X 정자 분리 방법을 확립하였음.		
	개발된 기술/제품의 실용화를 위한 임상 효능 평가	수정란 생산을 위한 난자확보 및 성 감별 정자 분리 방법 확립	성 분리 키트가 처리된 정액을 이용한 체외수정란 생산 방법 개발	·성 분리 키트인 홀맘의 처리 시간이 20분후에는 최고수준으로 정자가 응집되었음 ·동결정액의 홀맘처리 방법에 따른 체외수정 방법 개발하였음	100	5
			성 분리 키트를 활용해 생산된 체외수정란의 성 분리 효율 검증	·동결정액의 홀맘처리 후 체외수정하여 암컷 배반포 85.4% 생산하였음	100	10
			생산된 성 분리 체외수정란의 동결보존	·EM grid 동결용기를 이용한 소 배반포의 초자화 동결방법 개발	100	5
			성 분리 키트가 처리된 동결정액을 이용한 현장에서의 인공수정	·19개 목장의 100두의 한우에 동결정액에 홀맘처리 20분간 처리 후 인공수정하여 72.0% 암컷 생산	100	5
2차 년도 (2018)	정자 특이 단백질을 이용한 성 감별 정자 생산 제품 개발	고 효율의 성 감별용 수정란 생산 키트 개발	침전 방법을 이용한 X정자 및 Y 정자 분리 기술 확립	· 홀맘 제품과 동결 정액을 반응 시킨 후, 응집된 Y 정자와 응집되지 않는 X 정자를 침전 속도변화에 따른 목적 정자의 분리 효능을 검증한 결과 침전된 부분 Y 정자와 상층의 침전되지 않는 X 정자의 분리 효율이 90%이상 높은 것으로 판명되었음.	100	5
			필터 방식을 이용한 X정자 및 Y 정자 분리 기술 확립	· 홀맘 제품을 이용해 동결된 소 정액으로 반응시킨 후, 홀맘 단백질에 의해서 유도되는 Y 정자의 응집반응을 이용해 필터 또는 상층액을 분리하여 암소 생산 X정자의 분리 효능을 유세포분석기를 이용해 분석한 결과 90%이상의 높은 분	100	5

				리 확률이 검증되었음. · 동일한 방법으로 냉동정액을 반응 시킨후 응집된 부분의 정자를 분리하여 수소 생산용 Y정자의 분리도를 유세포분석기를 분석한 결과, 74.5%이상의 Y 정자가 분리되는 것을 확인하였음.		
			홀맘 단백질에 의한 정자에 미치는 영향 분석	· 냉동 정액을 이용해 홀맘 단백질과으의 반응 후, 정자의 생존성이 미치는 영향을 조사 분석한 결과 홀맘 반응에 따른 정자의 viability에는 영향이 없다는 것이 판명되었음.	100	5
	개발된 기술/제품의 실용화를 위한 임상 효능 평가	체외 수정란 생산용 키트 제품의 성감별 효능 검증	수정란 생산 기반 기술을 활용한 키트 제품의 효능 검증	·성 분리 키트인 홀맘의 냉동 정액의 융해 후 농도와 처리 시간에 따른 응집능력 조사하였음 ·홀맘이 처리된 정자에서 Y-정자를 분리하여 체외수정란 생산방법 개발 및 수컷 배반포 76.5% 생산	100	5
			임상 시험을 통한 수정란 생산 키트 제품의 효능 검증	·본 연구진이 갖고 있는 체외 수정란 이식기술을 이용하여 40두의 대리모에 이식하여 72.7% 암컷 생산	100	10
3차 년도 (2019)			홀맘을 이용한 원정액의 최적 응집 반응 유도 조건 확립	홀맘 단백질의 농도변화에 따른 원정액 정자 응집반응을 검증하여 정자의 밀도, 정장 제거에 따른 응집반응 유무, 정자 원심분리 방법에 대한 검증을 통하여 원정액에서 최적의 정자 응집 반응 조건을 확립하였음.	100	5
			성감별용 냉동정액 제조 방법 확립	· 홀맘 처리 원정액을 반응 시간 및 반응 온도별에 따른 정자 응집을 검증 한 후, 냉동정자 제조를 시행하였고 이에 따른 성감별 냉동정자의 해동에 따른 정자 응집반응 유지 여부를 조사하여 응집이 유지되는 조건을 확립하였음.	100	5

	개발된 기술/제품의 실용화를 위한 임상 효능 평가	성감별 원정액을 이용해 체외수정 및 인공수정을 통한 성 감별 정액 효능 검증	성감별용 냉동정액 스트로우를 이용한 체외 효능 평가	·원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 방법 개발 ·원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정액을 이용하여 체외수정 후 95.8% 암컷 배반포 생산 ·원정액에 홀맘처리 후 동결보존된 정액에서 응집된 정자만을 회수하여 체외수정 후 74.2% 수컷 배반포 생산	100	10
			성감별용 냉동정액 스트로우를 이용한 인공수정을 통한 효능 평가	·원정액에 홀맘 처리 후 동결보존 정액을 이용한 인공수정 실시	100	10

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

가. 고 효율의 성 조절 소 생산 방안

○ 한우와 같은 비육우의 경우에는 암컷은 수컷에 비해서 증체량이 작기 때문에 번식우 농장 및 암소개량을 목적으로 하는 경우에는 암컷 생산을 원하고 단순한 비육우 농장의 경우에는 수컷 생산을 선호함. .

○ 현재 동결정액을 대상으로 하는 인공수정용 성 조절용 제품은 각 농장주 및 인공수정사에 따라 성 조절 효율에 차이가 나며 이는 반응 시간(20-30분) 및 반응온도(35도이상)에 차이로 인해서 발생된다는 사실이 밝혀졌음.

○ 이러한 문제점을 해결할 수 있는 가장 좋은 대안 방법으로서 현 과제의 3년차에 수행된 원정액에의 홀맘 단백질 적응을 통해 얻어진 96%이상의 높은 암컷 생산 기법을 적용하는것이 가장 이상적인 방안으로 사료됨. 이를 위해서 국내 유일의 한우 정액 생산 AI센터인 한우개량사업소에서 원정액으로 부터 동결정액을 생산하는 과제에서 홀맘 단백질을 적용하여 성감별용 냉동정액을 생산하여 농가에 보급하는 방법이 가장 이상적인 방안으로 사료되며 이를 위해 현재 한우개량사업소와의 협력 방안을 모색하고 있는 중임.

○ 한우 비육우 사육 농가를 대상으로 증체량이 좋은 수소 생산을 위해 홀맘 단백질의 원정액 단계에서의 적용을 통하여 응집 또는 마그네틱을 이용한 Y정자 분리와 냉동정액 제작을 통한 농가 보급형 Y 정자만 들어있는 성조절 냉동정액 생산과 공급이 가장 이상적인 방법으로 사료됨. 이 또한 한우개량사업소와의 협력방법을 모색중에 있음.

○ 젖소 사육 농가에서는 암컷만의 생산을 선호하기 때문에 현재 젖소개량 사업소에서 생산 및 판매되고 있는 젖소 냉동정액에도 홀맘 적용을 통하여 응집에 의한 암컷 생산용 성 감별 냉동정액을 생산하여 공급하는것이 가장 이상적인 방안으로서 젖소개량사업소와의 협력방안을 모색하고 있음.

○ 현재 젖소 개량 사업소에서 생산되는 젖소 정액은 국내 젖소 시장의 약 40%를 농가에 공급하고 있으며 여분의 냉동정액은 아프리카(수단) 및 동유럽과 동남아시아에 판매 또

는 지원하고 있는 실정임. 위와 같은 해외 우량 젖소 냉동정액 판매용에도 홀맘 단백질을 적용하여 암컷 젖소 생산용 냉동정액으로 판매가 가능하며 고 부가가치의 성감별 정액을 제공할 수 있고 이에 따른 축산선진국의 위상 정립에도 도움이 될것으로 사료됨. 이를 해결할수있는 방안으로서 젖소 개량사업소와의 연대 및 협력방안이 절대적으로 필요하다고 사료됨.

○ 당사에서 개발된 소 성 조절용 단백질 제제는 합성 화학물질과 달리 복제가 어렵고 세포 배양을 통하여 생산 및 정제된 제제를 활용하고 있음. 현재 본 단백질제제에 대한 물질 특허가 국내 및 PCT출원된 상태이며 기술력 보호를 위하여 관련 제품(수정란 생산 키트, 성감별 냉동정액 제품)등에 관련된 제품 제작 및 사용방법에 관련된 특허를 출원하여 본 기술에 대해 기술력을 보호할 예정임.

○ 인공수정용 키트 판매를 통하여 국내 한우 및 해외 소 사육 농가에의 공급과 현장 활용이 이루어졌으며 수정사의 수정 능력과 정성등 제품이외의 다양한 성 감별 효능에 미치는 영향이 존재하고 있다는 사실이 확인됨. 현재 이를 해결하기위하여 제품에 함유하는 단백질의 농도를 높이거나 반응 온도 준수등에 관련된 주의사항을 전달하여 철저한 사전 교육을 실시하고 있음.

[선진국 대비 각 제품별에 따른 가격 대비표]

(단위 : $)

구 분	제품 종류	일반 정액	성 감별 냉동 정액 (/스프로우)	홀 맘 제품 가격	최종 가격 (/스트로우)
S T genetics	성 감별 냉동정액	3 - 10	24 - 30	-	24 - 30
주)누리사이언스	인 공 수정용 제품	3 - 10	-	15	18 - 25
	수정란 생산용 제품	3 - 10	-	25	25
	원 정액용 제품	3 - 10	8 - 15	5	8 - 15

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 활용분야 및 활용방안

○ 한우 및 젖소를 비롯한 각 나라별 사육 품종에의 적용을 통한 제품
○ 소 냉동정액을 이용한 인공수정용 암소 생산용 제품으로서의 활용
○ 체외 수정란 생산과 이식을 통한 소 암컷 생산용 수정란 생산 키트
○ 원정액에의 적용을 통한 암컷 생산용 성감별 냉동정액 생산에의 적용
○ 원 정액에의 적용을 통한 Y정자 분리 및 냉동 보관을 통한 수컷 생산용 성감별 냉동정액 생산에의 적용
○ 농림부가 추진하고 있는 우량한 암소 선별을 통한 암소 유전능력 개량사업에의 적용을 통하여 우수 암소 개량을 위해 활용되면 단기간에 걸쳐 우량한 암소를 대량으로 생산 가능하고 이를 농가에 보급함으로서 농가 소득 창출에도 기여됨
○ 구제역을 비롯해 다발하는 전염성 질병으로 인한 국내 사육 우량 한우 유전자원 보존 및 번식을 위하여 홀맘 단백질을 적용하여 성 감별된 한우 및 젖소 우량 암소 및 수소의 난자 및 정자, 수정란을 생산하여 냉동 보관하여 위기사항에 대처 가능할 수 있도록 하며 우수 유전 능력 확보와 단기간의 축산업 회복과 원상복귀를 위한 방안으로서 가장 이상적 방안으로서의 활용이 가능함.
○ 한우 개량 사업소에서 생산되는 원정액에의 홀맘 단백질 적용을 통한 일반냉동정액, 홀맘 적용 암컷 생산용 성감별 냉동정액, 수컷 생산용 성 감별 냉동정액을 생산하여 한우 사육 농가의 목적(번식농장, 비육우 농장)에 따른 정액 공급에의 활용
○ 젖소 개량 사업소에서 생산되는 젖소 원정액에의 적용을 통하여 암컷만 생산되는 성감별 냉동정액을 생산하여 젖소 사육 농가에 공급하는 방법
○ 칡소 및 흑우등과 같은 한우 재래종에 적용하여 부족한 소 대량생산을 위한 암컷 생산용 성감별용 정액에의 적용
○ 국내 재래종 소의 유전자원 확보를 위해 홀맘적용 암컷 수정란 및 수컷 수정란을 생산하여 냉동보관용으로 활용이 가능하며 또한 홀맘 적용 성 감별 냉동정액의 대량 보관을 통한 국내 고유의 유전자원 대량 확보 및 보존 정책에의 활용

4-2. 타 연구에의 응용

○ 본 과제 수행을 통하여 소 성조절용 단백질 제제인 홀맘은 소 Y정자와의 특이적인 결합 특성을 지니고 있음과 동시에 다른 종인 염소, 말, 개에서도 동일한 정자 결합 특이성이 존재하고 있다는 사실이 밝혀졌음.
○ 따라서 소의 성 조절용 단백질 홀맘을 이용해 현재 국내서 과잉 생산되는 젖소 우유의 대체유로서 주목을 받고 있는 산양유 생산 목적인 산양산업에도 적용 가능한 제품을 개발하고 임상 시험을 통한 목적 산양 생산용 성 조절 제품 개발이 필요할것으로 사료됨.
○ 영국, 중국, 이슬람국가에서 대량으로 사육되고 있는 양과 염소 성 조절용 제품은 전 세계에도 전무한 상태이며 특히 이슬람국가에서 사육되고 있는 가장 중요한 식량 자원인 염소와 양은 매우 높은 비율로 인공수정이 이루어지고 있으며 중요한 국가 식량산업으로서 막대한 부가가치 창출이 기대되는 분야임.

○ 소의 연구과제와 동일하게 냉동정액 또는 원정액 생산 양과 염소 농장을 대상으로 하는 성 조절 제품 개발과 임상시험 및 홍보를 통하여 전 세계 최초로 성 조절제품을 개발 및 판매가 가능하다고 판단됨.

○ 말의 경우에도 전체 말의 97%이상을 차지하는 승용마 산업에도 숫컷에 비해서 암컷 말을 선호하기 때문에 홀맘 단백질을 이용한 말 정액에의 적용을 통한 암컷 생산용 성 감별 냉동정액 생산용 제품 개발에도 적용 가능할 것으로 사료됨. 이는 국내 승용마 산업 발전에도 기여할 것으로 사료됨.

4-3. 기업화 추진 방안

○ 현재 본 과제 수행을 통하여 확보된 연구결과를 토대로 글로벌 제품 홍보활동을 지속적으로 수행하였고 전 세계 주요 축산 선진국을 비롯해 축산개도국에 충분한 제품 홍보가 이루어진 상태임.

○ 젖소의 경우에는 전 세계 젖소 정액의 약 60%의 냉동정액을 생산하고 있는 캐나다 및 미국 AI센터를 중심으로 홀맘 성조절제품에 대한 홍보가 이루어졌고 특히 글로벌 1위 기업인 Semex(캐나다)에서 제품 구매 요청이 이루어지고 있는 상태임.

○ 특히 소 냉동정액용 스트로우를 제작 판매하고 있는 글로벌 회사인 imv와의 제품 판권 계약이 진행중인 상태이며 본 계약이 성사되면 일본과 중국 및 한국을 제외한 글로벌 홀맘제품 판매가 원활하게 이루어질것으로 예상됨.

○ 현재 브라질의 BIO 회사외의 홀맘 제품 수출 업무협약(MOU)이 성사된 상태로 세계 최대의 소 사육 국가인 브라질을 비롯해 남미국가에의 제품 수출이 본격적으로 진행될 예정임.

○ 현재 전 세계 두 번째의 큰 시장과 미래 가능성을 지닌 중국 소 사육 시장에의 홀맘 제품 판매는 TechBank사와 업무협약을 체결하고 현재 홀맘 제품의 중국 현지 임상시험이 진행되고 있는 상태임.

○ 일본 시장 진출을 위하여 일본의 가장 큰 조직인 Zenno(농협)와의 일본 농장에의 홀맘 제품 판권에 관련된 업무협약 계약을 추진중이 있음.

○ 국내의 젖소 개량 사업소와의 협력을 통하여 현재 젖소 성 감별용 냉동 정액 생산에 대한 협력 연구를 추진하고 있으며 이를 통해서 생산된 젖소 성감별용 냉동정액의 국내 젖소 생산 농가를 비롯해 해외(수단, 말레이시아등) 국가에의 정액 판매를 위한 진행하고 있음.

○ 현재 본 과제의 수행 및 홍보를 통하여 개발된 수정란 생산 키트는 국내 및 글로벌 수정란 생산 업체 공급하기 위해 글로벌 최대의 수정란 생산 업체인 SEMEX에서 제품 품질 검증 연구를 진행하고 있어 이를 통한 글로벌 수정란 업체 홍보 및 기술이전 효과를 기대하고 있음.

○ 본 연구결과를 토대로 인공수정용 성 조절용 키트, 수정란 성 조절용 키트, 원정액 적용을 통한 성 조절용 키트등에 관련된 제품 및 기술을 토대로 신기술 인증 확보를 추진할 예정임.

붙임. 참고문헌

1) Iwata H, Kimura K, Hashimoto S, Ohta M, Tominaga T, Minami N. Role of G6PD activity on sex ratio and developmental competence of bovine embryos under oxidative stress. J reprod Dev 2002; 48:447-453.

2) Iwata H, Shiono H, Kon Y, Matsubara K, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y. Effects of modification of in vitro fertilization techniques on sex ratio of the resultant bovine embryos. Anim Reprod Sci. 2008; 105: 234-244.

3) Rattanasuk S, Parnpai R, Ketudat-Cairns M. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. J Reprod Dev. 2011; 57:539-42.

4) Reed KC, Matthaei KI, Mann DA, Beaton S, Matthews MA. Determination of genetic sex in ruminants using Y-chromosome specific polynucleotides.Patent Cooperation Treaty No. Wo 1989;89/07154.

5) Heo YT, Kim DK, Uhm SJ. Analysis of sex ratio on bovine in vitro fertilized embryos using sex determination kit treated sperm. J. Emb. Trans. 2018. 33(3), 169-175.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화 연구개발 사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화 연구개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.