

발간등록번호

11-1541000-001341-01

최 종 보 고 서

정자 성 분리 기법에 의한 젖소 암 송아지 생산에 관한 연구

(Production of female dairy calves by sperm sexing
technology)

(주) 노아 바이오텍

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “정자 성 분리 기법에 의한 젓소 암 송아지 생산에 관한 연구” 과제의
보고서로 제출합니다.

2012 년 7 월 18 일

주관연구기관명 : (주) 노아 바이오텍

주관연구책임자 : 손 중 호

세부연구책임자 : 손 중 호

연 구 원 : 권 은 정

연 구 원 : 박 수 혜

연 구 원 : 심 은 희

연 구 원 : 박 연 주

협동연구기관명 : 농협중앙회

협동연구책임자 : 김 홍 릉

협동연구기관명 : 이티 바이오텍 (주)

협동연구책임자 : 정 연 길

요 약 문

I. 제 목

정자 성 분리 기법에 의한 젓소 암 송아지 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 기술은 성 분리된 정자를 이용한 인공수정용 정액 및 수정란을 생산하여 개체의 개량, 증식, 원가구조개선, 수급조절, 가격안정 등을 통하여 농가의 소득증대에 기여하고 나아가 WTO 나 FTA 체제 하의 우리나라 축산업, 특히 젓소의 경쟁력을 높이는 데 기여할 것으로 생각된다. 현재까지 미국의 Sexing Tech Inc가 성 구분된 인공수정용 젓소 동결정자 보급사업을 추진해 오고 있으나, 정자의 생존율 및 수정 능력이 낮아 아직 본격적인 상용화 단계에는 이르지 못하고 있는 가운데, 본 과제 연구개발에 참여한 기관들이 보유하고 있는 정자 성 분리 기술과 수정란 생산기술을 접목시키는 연구개발을 통하여 국제적인 비교우위의 경쟁력을 가지는 것이 필요한 실정이다. 현재 이용되고 있는 수정란 성 분리 기술은 할구세포의 손상으로 인하여 생존율 및 이식 시 수태를 저하를 초래하고 있어, 성 분리된 정자를 이용하여 인공수정 또는 채란된 난자와 수정하여 이미 성이 결정된 신선한 수정란을 생산하고 이식함으로써 수태율을 높이고 원하는 성의 송아지를 생산하는데 이용하고자 한다. 젓소의 능력을 개량 하고자 할 때, 특정성별을 지닌 수정란 이식으로 송아지를 생산하게 되면 과거 검정에 필요로 하는 두수를 기준으로 볼 때 소요되는 비용, 시설, 인건비등을 절반으로 줄일 수 있어 검정 효율, 신뢰도를 제고할 수 있는 유익한 기술이다. 향후 성 분리 기술을 활용한 수정란 이식은 한 단계 높은 수준의 가축개량을 실현시킬 수 있는 대안으로, 지속적인 연구지원이 필요하며, 농가소득 증대는 물론 한정된 자원의 재활용을 통한 축산업 경쟁력확보 및 우수한 종모우 생산을 위한 기초 연구 과제가 될 것으로 생각된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

신선하게 채취된 종모우 정액에서 이론적으로 50:50 비율로 존재하는 X(암) 및 Y(수) 염색체를 가지고 있는 정자를 DNA 형광 염색인 Hoescht 33342 (Bisbenzimidazole) 로 미량 염색하고 407nm 파장의 UV 레이저로 형광을 발광시킨 후 X- 및 Y-염색체의 DNA 함량차이에 (3~4%) 따른 형광차이를 고성능 sorter가 장착된 정밀 flowcytometer (FACSAria) 상에서 분리하고, 성 분리된 정자를 인공수정 하거나, 체내 혹은 체외 수정으로 생산된 수정란을 (XX) 젓소 대리모에 이식하여 암 송아지 생산비율을 높이고자 함이다. 아울러 성 분리된 정자를 고 능력우에서 채취된 난자를 수정하여 우량형질의 특정 성의 송아지 생산을 유도하여 낙농업 경영의 합리화와 생산비 절감을 도모하고 능력개량을 하고자 한다. 정자 성 분리 기술의 농가 현장적용을 통해 우량 유전자원의 활용을 제고는 물론 우수종의 지속적인 확보 등 축산 산업 전반에 크게 기여할 수 있을 것이다.

IV. 연구개발 결과

본 연구과제 수행을 통하여, flowcytometer 를 이용한 정자 성 분리 기법이 정립되었으며, 그 분리 정확도는 95% 이상임을 분리된 정자를 FISH 방법과, 분리된 정자를 이용하여 생산된 수정란을 PCR 방법을 통하여 입증할 수 있었다. 정자 성분리 기술에 대해서는 1개의 국제특허 (미국) 와 1개의 국내특허를 2008년도에 주관연구기관이 국내최초로 특허 등록한 정자 성분리에 관한 내용 및 방법을 2011년에 보완하여 새로이 출원 하였다. 2010년 4월과 12월의 전국적인 구제역 파동으로, 안타깝게도 시료채취 및 실험농장 접근이 원천적으로 봉쇄되어 한동안 연구를 불가항력적으로 제대로 수행할 수 없었던 점이 큰 아쉬움으로 남는다.

성 분리된 정자를 이용하여 총 27두에 인공수정을 (수태율 66.6%) 그리고 56두에 수정란을 이식하여 (수태율 57.1%), 2012년 4월 9일 현재 태어난 산자들의 성 비는 각각 72.7% (암) 과 79.2% 를 보이고 있다. 구제역으로 인한 실험중단과 다른 축종에 비해 상대적으로 다소 긴 임신기간 때문에, 3년간의 과제수행동안 학술논문 발표 실적이 부족하지만 국내저널에 3편을 발표하였고, 국내,외 학회에 초록은 10편이상 발표하였다. 마지막 연구 3차년도 에도 현장에서 실시한 인공수정 및 수정란이식의 결과들이 과제 종료 후에도 계속 수집될 예정이며, 한데모아 국내,외 학술논문에 게재할 예정이며, 본 연구개발을 통하여 도출된 정자 성분리 기법이 앞으로 교육,지도,홍보등 기술확산을 위하여 쓰여지게 되기를 희망한다

V. 연구성과 및 성과활용 계획

가. 기술적 측면

- 국내 실정에 맞는 성 분리 정자 이용 젖소 암 송아지 생산 및 생산비 절감
- 성 분리 정자 이용 우량 젖소 수정란 생산
- 고 부가 가치의 형질전환 동물 생산과 연관된 연구 및 산업분야
- 수정란의 이용효율 향상을 위한 신기술 창출 분야
- 동결 수정란 생산 및 이식기술과 연관된 산업분야
- 확립된 정자 성 분리 기술의 국내,외 학술지 논문발표를 통한 연구 및 산업계 보급
- 미성숙 난자 체외성숙을 통한 수정란 생산 및 동결기술의 연구기술로 활용
- 현장 전문가를 위한 동결보존 수정란의 융해 및 이식기술의 교육
- 특허권 획득 및 산업계로 특허권 이전
- 국내,외 산업계와 정자 성 분리 기술 이용에 대한 공동연구
- 생명과학 및 의학 연구에 기초 자료제공
- 고가의 형질전환동물 생산의 기초 실험 자료 및 효율성 향상에 기여
- 멸종위기나 희귀동물의 유전자원 보존에 기여

나. 경제적 · 산업적 측면

- 국내 축산업 발전 및 소득증대
- 종축 생산 및 개량
- 인공수정 및 수정란 이식 보급률 향상
- 우수 유전자 확보 및 시스템구축

SUMMARY

Gender selection of offspring has been interested in livestock producer for thousands of years. But due to the lack of knowledge on controlling mammalian sex, many attempts were not successful and reproducible and it also brings a many disappointments. In 1981, however, new astonishing methodology introduced that could measure the sperm DNA content by flowcytometer. Thereafter, sperm sorting technology was accelerated and X- and Y-chromosome bearing spermatozoa can now be identified as many as 6,000/sec by high speed flowcytometer. So far, no specific sperm sexing technologies were developed except flowcytometrical sorting of X- and Y-sperm in high purity, in sufficient quantities and in repeatable manner. Motility and viability of sex-sorted sperm that has fertilizing ability, however, are the wall must go over. In the near future, more convenient, high efficient, price in reasonable new sperm sorting system will be introduced with the collaboration work of scientists in the area of reproductive physiology, cell biology, biomedical, computer science and biophysics. The application of sperm sexing technology is not limited in production of specific sex of economic animals such as cattle, pig, sheep, and horse, but application for the production of female dairy calves is the key for successful commercialization of sperm sexing technology. Also, production of specific sex of transgenic clone pig and mouse for human genetic disease model is another option for commercial interests.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	7
Section 1. Objectives	7
Section 2. Rationale	7
Section 3. Contents and scopes	7
Chapter 2. Status of technology	10
Chapter 3. Experimental results and discussion	13
Chapter 4. Achievements and contributions.....	39
Chapter 5. Applications of experimental results	40
Section 1. Application areas	40
Section 2. Types and plans of applications	40
Section 3. Abstract	40
Section 4. Aspect of experimental results	41
Chapter 6. Obtained scientific technology information from foreign countries while performing research project	42
Chapter 7. References	47

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요	7
제 1절 연구개발의 목적	7
제 2 절 연구개발이 필요성	7
제 3절 연구 개발의 범위	7
제 2장 국내 외 기술개발 현황	10
제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과	13
제 4장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	39
제 5장 연구개발 성과 및 성과 활용계획	40
제 1절 특허출원	40
제 2절 논문	40
제 3절 학회발표초록	40
제 4절 연구개발결과의 활용방안	41
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	42
제 7장 참고문헌	47

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 성 분리된 정자를 이용한 인공수정용 정액 및 수정란을 생산하여 개체의 개량, 증식, 원가구조개선, 수급조절, 가격안정 등을 통하여 농가의 소득증대에 기여하고 나아가 WTO 나 FTA 체제 하의 우리나라 축산업, 특히 젓소의 경쟁력을 높이는 데 기여할 것으로 생각된다. 현재까지 미국의 Sexing Tech Inc가 성 구분된 인공수정용 젓소 동결정자 보급사업을 추진해 오고 있으나, 정자의 생존율 및 수정 능력이 낮아 아직 본격적인 상용화 단계에는 이르지 못하고 있는 가운데, 본 과제 연구개발에 참여한 기관들이 보유하고 있는 정자 성 분리 기술과 수정란 생산기술을 접목시키는 연구개발을 통하여 국제적인 비교우위의 경쟁력을 가지는 것이 필요한 실정이다. 현재 이용되고 있는 수정란 성 분리 기술은 할구세포의 손상으로 인하여 생존율 및 이식 시 수태를 저하를 초래하고 있어, 성 분리 된 정자를 이용하여 인공수정 또는 채란된 난자와 수정하여 이미 성이 결정된 신선한 수정란을 생산하고 이식함으로써 수태율을 높이고 원하는 성의 송아지를 생산하는데 이용하고자 한다. 젓소의 능력을 개량 하고자 할 때, 특정성별을 지닌 수정란 이식으로 송아지를 생산하게 되면 과거 검정에 필요로 하는 두수를 기준으로 볼 때 소요되는 비용, 시설, 인건비등을 절반으로 줄일 수 있어 검정 효율, 신뢰도를 제고할 수 있는 유익한 기술이다. 향후 성 분리 기술을 활용한 수정란 이식은 한 단계 높은 수준의 가축개량을 실현시킬 수 있는 대안으로, 지속적인 연구지원이 필요하며, 농가소득 증대는 물론 한정된 자원의 재활용을 통한 축산업 경쟁력확보 및 우수한 종모우 생산을 위한 기초 연구 과제가 될 것으로 생각된다.

제 1절 연구개발의 범위

가. 년차별 연구개발의 목표 및 주요내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차 년도	2009 ~ 2010	<ul style="list-style-type: none"> 성분리 정자의 운동성 및 생존율 향상 	<ul style="list-style-type: none"> 정자의 성분리를 위한 최적조건의 정자부유액 개발 정자성분리를 위한 유세포분리기의 분리 압력, 온도 조건의 최적화 	정자 성분리
		<ul style="list-style-type: none"> 성분리 정자농도 따른 체외수정을 확립 분리된 정자로 체외배양 기술개발 	<ul style="list-style-type: none"> 성분리 정자의 농도별 체외수정을 및 발생을 비교검토 	체외수정
		<ul style="list-style-type: none"> 성분리 정자를 이용한 인공수정 및 체내회수란 생산 시험수행기초집단조성 	<ul style="list-style-type: none"> 시험 수행을 위한 기초집단 조성 성분리 정자를 이용한 인공수정 성분리 정자를 이용한 수정란 생산 수란우 번식현황 및 발육성적조사 수정란이식 	인공수정 채란 수정란이식 사양관리

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차 년도	2010 ~ 2011	<ul style="list-style-type: none"> 정자 두부 침체의 손상 최소화 및 분리속도 향상 	<ul style="list-style-type: none"> X, Y 정자의 선택적 분리와 속도 향상을 위한 유세포기기 내부 버퍼용액 유속 및 UV 레이저 딜레이의 최적화 개체별 정자 특성에 따른 유세포기 분리 압력 유동적 조절 검토 	정자 성분리 분자생물학적 분석
		<ul style="list-style-type: none"> 난소 개체별 성분리 체외수정란의 대량생산 성분리 수정란 동결보존 	<ul style="list-style-type: none"> 성분리 정자 및 우량등급 난자를 이용한 개체별 수정란 대량생산 우량형질의 젖소 수정란 동결보존 	체외수정 동결보존
		<ul style="list-style-type: none"> 성분리정자 및 개체별 난자로 생산된 수정란 이식 특정성 송아지 생산 특정성 송아지의 특성 및 육질분석 	<ul style="list-style-type: none"> 성분리 정자를 이용한 젖소에 수정란 이식 송아지 후대 생산 및 발육특성조사 	인공수정 채란 수정란이식 사양관리

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차 년도	2011 ~ 2012	<ul style="list-style-type: none"> ○ 성분리 정자에서 번식 및 유전에 영향을 미치는 요소의 분자생물학적 고찰 ○ 정자 성분리 기법의 체계화 및 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> ○ UV 상에서 노출되어 분리된 정자 두부 침체 손상 여부 검사 ○ 성분리된 정자 세포의 DNA 상태 미토콘드리아 기능, 여러 세포막 표면 수용체 이상 유무 분석조사 	정자 성분리 분자생물학적 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 성분리정액을 이용한 수정란 대량생산 및 동결보존의 상업화 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 성분리 정자 및 우량등급 난자를 이용한 개체별 수정란 대량보급 및 우량형질 수정란 동결보존을 통한 상업화 	체외수정 동결보존
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 송아지의 발육특성분석 ○ 성 분리 정자 및 개체별 난자로 생산된 수정란 이식의 상업화 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 후대송아지의 발육 및 도체형질 조사 	인공수정, 수정란이식 사양관리

X (암) 및 Y (수) 염색체를 가지고 있는 정자를 Hoescht 33342 (Bisbenzimidazole) 로 형광 염색하고 407 nm 파장의 UV 레이저로 발광시킨 후 X, Y 염색체 DNA의 함량차이에 따른 형광 차이를 세포분리기가 장착된 초정밀 flowcytometer (FACS Aria) 상에서 분리하고, 성 분리된 정자를 체내 혹은 체외 수정시켜 생산된 수정란을 종빈우에 이식하여 우량형질의 젖소 암 송아지를 생산하고자한다. 본 기술의 현장적용을 통해 희귀 우량유전자원의 재활용과 우수종의 지속적인 확보 등 젖소의 산업적 부가가치를 높일 수 있을 것이다. 본 연구개발은 다음과 같이 크게 3개의 목표를 가지고 진행되었다.

1. 첨단 세포분리기술을 이용, X, Y 염색체를 가진 정자의 분리 정확도 향상
2. 성 분리 정자의 장기간 보존기술 개발 및 수정란 대량 생산
3. 성 분리 정자를 이용한 체내, 외 유래 수정란이식 후 젖소 암 송아지 생산

제 2장 국내. 외 기술개발현황

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

성 염색체의 발견과 더불어 본격적으로 시작된 정자 성 분리 시도는 1971년에 Pennsylvania State University 에서 'Sex Ratio at Birth' 라는 제목으로 컨퍼런스가 (American Society of Animal Science) 가 열리면서 많은 관심을 불러일으켰고, Patec GmbH (Munster, Germany) 사가 정자 DNA 함량을 impulse cytophotometer 방법으로 측정하는 장비를 선보였으며 (Otto 등 1979), Pinkel 등 (1982) 이 정자 두부의 DNA 함량을 정확하게 측정할 수 있는 방법을 발표하였고, Oklahoma State University 가 Lawrence Livermore National Laboratory 와 협동으로 X- 및 Y- 정자 집단을 구별하는데, flowcytometer 의 이용 가능성을 최초로 보고 하였다 (Gledhill 등 1982). 1982년 에는 Lawrence Livermore National Laboratory에서 Vole (흑쥐) 의 정자를 flowcytometer 로 성 분리에 성공 하였다고 발표하면서 X- Y -정자 성분리가 더욱 활기를 띠었다 (Pinkel, 1982). 이때까지만 해도 X- Y-정자 DNA 함량차이를 (Table 1) 분석하기 위하여 정자 막 투과가 안되는 (membrane impermeable) DAPI 형광 dye를 사용하여 정자 막을 파괴하여야 했고 성 분리가 주목적은 아니었다. Johnson (1987; 1988) 이 정자막 투과가 가능한 DNA 염색인 Hoechst 33342 을 이용하여 살아있는 정자 성 분리에 성공하였다고 보고하였다. 살아있는 정자세포를 Hoechst 33342를 사용하여 성 분리 한 후 (분리순도가 높지는 않았지만), 분리 된 정자를 AI 하여 소와 (5×10^6) 토끼를 (7.5×10^6) 생산한 최초의 연구자는 Morrell (1988; 1989) 이었다. Johnson (1989) 은 같은 해에 Beltsville의 USDA ARS에서 성 분리된 토끼정자를 외과적으로 난관에 이식해 81% 숫컷과 94% 암컷 산자를 생산하였다고 보고하였다.

1991년 USDA 는 이 정자 성 분리 기법에 대해 미국 특허를 출원하여 등록하게 된다 (US Patent # 692958, 발명인 Lawrence Johnson). 이 당시에 flowcytometer 로 분리해 낼 수 있는 정자 수는 대략 초당 100개 정도로 천만개의 정자를 분리한다고 했을때 약 27.7 hr 라는 시간이 소요되어 분리 효율이 높지를 않았다. 전형적인 방법으로 소 인공수정을 위해서 20×10^6 정자가 필요하다고 하면 48시간 정도 분리 하였을때 소 1마리를 수정시킬 수 있다는 계산이 나온다. 이후 USDA 는 정자 성분리에 대한 특허권을 사람 정자는 Genetics & IVF Institute (Microsort[®], Fairfax, VA) 에 그리고 동물 정자 성 분리 특허기술은 Cytomation사와 연계된 XY Inc., (Fort Collins, CO) 에 각각 특허권을 이양했다. Cytomation사는 MoFlo[™] 장비를 선보이기 시작하여 이후 특수한 형태의 노즐을 사용하는 MoFlo SX[™] 가 나왔으며 유체역학적 기술 의 응용으로 정자세포의 샘플라인을 따라 내려가는 배향각도를 일률적으로 유지할 수 (~70%) 있도록 장비를 고안하였다 (Rens, 1998; Johnson 1999), 이때 초당 정자 성 분리 속도는 ~6000 개 정도로 소개 되었다. 2003년에는 Dakocytomation A/S 사가 DAKO A/S로 이름이 변경되었다가 이 회사를 Beckman Coulter (Fullerton, CA) 사가 매입을 하여 오늘날에 이르게 된다.

1. Flowcytometer 을 통과한 정자의 성상

성공적인 정자 성 분리를 위하여 여는 정자가 분리과정 중에 받는 여러 물리적 스트레스를 최소화하게 하여 운동력 및 생존율에 영향을 미치지 않도록 하여 성 분리된 정자를 이용하여 AI 나 IVF-ET 를 통하여 산자 생산 효율을 높일 수 있어야한다. 이를 위해서는 축종에 따른 정자 생리학적 특성을 고려한 염색방법, 노즐 선택, 분리 과정중의 시료의 적정 온도 유지, 분리 압력, sheath 버퍼용액 조성의 적절한 변화를 주어야 가능하다.

초창기에 DNA 형광을 식별하기 위하여 사용된 레이저 광원은 주로 125 mW 파워 이었으나 현재는 기술의 발달에 힘입어 25 mW 가 사용되어진다. Johnson 등 (1999) 의 보고에 의하면 정자 성 분리를 위하여 사용되는 레이저의 파워는 수정과 배 발달 율에 영향을 준다고 보고하고 있다. 정자의 DNA 손상은 flowcytometer 를 통과하거나 (Sperm Chromatic Structure Assay, Evenson 등, 2002) 레이저 광원에 (25 mW) 의해서는 아주 미약한 것으로 보고되고 있다 (Garner, 2002). Hoecsht 33342 형광염색이나 (Parrilla, 2004) 분리과정 중에 부과되는 40 psi 압력 (Suh TK, 2005) 은 정자의 운동성에 큰 영향을 주지 않는다고 보고를 하였고, 분리과정중의 물리적 스트레스가 정자 생존율에 또한 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Garner, 2002; 2006). 성 분리된 정자를 이용하여 AI로 생산된 산자의 경우 유산, 사산, 임신 기간, 난산, 생시체중, 이유체중은 분리 안한 정자를 이용하여 생산된 산자와 비교하여 볼 때 특별히 차이가 나지 않았다 (Tubman, 2004). 지금까지 발표된 결과들을 종합해 볼때 정자 성 분리과정에 있어서 정자가 받는 여러 물리적 스트레스에 의한 손상은 정자의 여러 성상이나, 수태율, 임신을 그리고 태어난 산자들에 대한 유전적 손상은 미약하거나 무시할 수 있는 정도의 차이라고 볼 수 있다. 하지만 성 분리 된 정자를 이용하여 IVF를 실시하였을 때 배 발달 률이 더디게 진행되거나 fragmentation 율이 증가 된다는 보고와 (Guthrie 등, 2002) 생산된 산자수가 적은 경향은 (Johnson 1989; 1991) 분리 과정 중에 UV 광원에 의해 노출된 정자의 손상 때문이라고는 정확히 말할 수는 없지만 embryo 생존에 어떤 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

2. 성 분리 정자의 분리 정확도 검증

Flowcytometer 를 이용하여 분리된 정자를 이용하여 수정란을 생산한 후 그 수정란을 PCR 통하여 성 감별을 하여 성 분리 순도를 간접적으로 측정할 수 있고 X- Y 염색체의 특정 probe를 이용하여 FISH 하거나 RT-PCR 로 정자 자체의 분리 순도를 측정할 수 있다. 또한 분리된 정자를 다시 flowcytometer 로 분석하여 형광 peak 값을 계산하여 분리 순도를 측정할 수 있다.

3. 수태율

성 분리된 정자를 이용하여 AI를 실시하고 분리안한 정자와의 편견 없는 정확한 번식률을 비교한 현장 데이터를 얻기는 쉽지 않지만, 미 경산우를 사용했을때 경산우에 비해 수태율이 높다는 보고가 일반적이다. DeJarnette 등은 (2007) 90% 순도의 X-정자 (Navasota, TX) 2.1×10^6 개를 사용했을때 평균 수태율이 44% (n = 16,587, range 33~72%) 였다고 보고하였고, Texas에서 정자를 분리한 후 동결하여 California Jerz-Boyz 농장으로 수송한 후 AI 를 실시하였을 때 미경산우는 57%를 경산우 에서는 39%의 수태 율을 보고하였다. 수태 율은 가축의 사양관리, 영양상태, 발정적기, 주입 정자 수, 정액의 취급, 시술자등 여러 요인에 의해 달라질 수 있을 수 있어서 명확히 비교할 수는 없지만, 정자 성 분리 후 동결하고 용해한 정자로 AI

했을 때 수태율이 대조군과 비교해 다소 떨어지는 경향을 나타내고 있다.

4. 정자 성 분리 사업을 추진하고 있는 회사

정자 성 분리기술을 상업화 하고자 했던 회사는 4개사가 있는데, American Breeders Service 사가 정액을 Lawrence Livermore National Laboratory에 공급을 하여 정자 성분리 기술을 개발하였고, Atlantic Breeders Cooperative, Mastercalf LTD와 XY Inc 가 있었다. 그다음에 미국외의 나라로 Cogent Ltd (UK), Goyaike Ltd (Argentina), Hokkaido Genetics (Japan) XY (China) 이 있고, 최근에는 Monsanto (St. Louis, MO) 가 노줄이 16개가 장착된, 새로운 정자 분리 시스템을 개발하여 2006년에 상용화를 하였으나, 저조한 수태율로 인하여 사업을 포기하였고, 이후에 Texas 에 있는 Sexing Tech가 그 특허권을 Monsanto로부터 구입하였고, XY Inc 의 모든 주식을 현재 보유하고 있는 상태가 되었다.

현재 우리나라에서 상업적으로 정자 성 분리 기술을 보유하고 있는 곳은 (주) 노아 바이오텍과 섹싱 바이오텍이 유일한 실정이다. 우리나라의 경우 종모우를 국가가 관리하고 있어, 정자 성 분리 산업은, 개인 기업이 영위하기에는 시설, 설비, 자본등의 한계가 있고, 국가와 연계하여 사업이 실시된다면, 농장 현장 적용성면에서 더욱 효율적이라 사료된다.

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
flowcytometer를 이용한 정자 성 분리	미국	10%	70%	95%	
정자 보존방법 및 수태율	미국	40%	70%	70%	

제 3장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

1 정자 성 분리 기법 - (주) 노아바이오텍

정자의 고 순도 성 분리방법은 X-염색체를 가진 정자와 Y-염색체를 가지는 정자를 분리함에 있어, 정액내에 이론적으로 50:50의 비율로 혼합되어있는 X- 및 Y- 정자들의 분리 순도를 높이기 위하여 분리정확도를 떨어뜨리는 부분을 제거하기 위한 파라미터를 사용하고, 또한 몇 가지 조건들을 조절함으로써 고순도의 성 분리된 정자를 얻을 수 있도록 하였다 (국내 최초 특허등록). 이를 위하여 본 발명은 정자의 생리학적 특성에 기초하여 X 염색체를 갖는 정자세포와 Y 염색체를 갖는 정자세포로 성 분리방법에 있어서, X 및 Y 염색체의 DNA 함량 차이를 차별함에 있어 정자세포 두부내 핵의 폭의 차이를 분리의 파라미터로 이용하는 방법으로, 상기 핵의 폭의 측정은 정자 세포가 각각 샘플라인을 따라 이동할 때 핵이 레이저를 통과하는 시작점과 끝점의 시간을 측정함으로써 이루어질 수 있다.

$$\text{핵의 폭 (width)} = \frac{\text{면적 (area)}}{\text{형광 피크 (pulse)}} \times 64000.$$

이러한 시도는 종래의 유세포 분리를 이용한 정자의 성 분리를 위해 특정한 가정 조건의 설정 없이 최대한 자연적 조건하에서 실시하기 때문에 현실적이며, 아울러 분리된 정자의 생존율과 운동성이 유지되고, 살아서 운동성이 있어 다양한 각도로 배향이 이루어질 수밖에 없는 정자세포의 분리 한계성을 극복하여 정자의 성 분리 효율을 현저히 향상시킬 수 있게 된다.

일반적으로 핵을 형광염색한 후 이를 탐지하기 위하여 UV 레이저를 이용한다. 형광의 전체적인 강도 내지는 정도를 측정하는 것인데, 측정의 정확성을 위하여 상대적으로 높은 와트의 레이저를 사용하게 되고 이 경우 정자의 손상을 가져올 수 있다. 이러한 문제점은 핵을 염색하여 이의 전체적 형광성을 측정하여 분리하는 방법의 문제점으로 지적되어 오고 있다. 20 mW 정도의 경우라면 비교적 정자의 손상을 가져오지 않으나, 형광 정도를 측정함에 있어서 X 정자와 Y 정자의 DNA 함량 차이를 분별하는데 정확도가 떨어지게 된다. 따라서 대개는 40 mW 이상의 UV 레이저를 사용하고 있으나, 본 연구에서는 분리된 정자의 활력을 유지하고 레이저에 의한 손상을 방지하기 위해서 낮은 와트의 (25mW) UV 레이저를 사용하여 정자의 핵의 폭을 측정하였다. 블루레이저를 통해서도 Hoechst 33342 등의 형광을 발광시킬 수 있으며, 충분히 형광 정도의 차이를 측정할 수 있기 때문에 블루레이저와 UV 레이저를 동시에 사용하여 정자의 핵의 폭을 측정하였다.

한편, 정자의 형태는 완전 구형이 아니고 타원형에 가깝고 또한 운동성이 있어서 늘 일정한 각도로 레이저에 의해 발광하지 않기 때문에, 측정시의 정자의 움직임이나 위치에 의해 데이터가 달라지므로 탐지되어 나온 데이터만을 믿고 게이팅하는 경우에는 실제로 X 염색체의 정자와 Y 염색체의 정자가 명확하게 구분되지 않는 영역이 존재할 수 있다. 즉 정자가 방향

을 달리하여 측정된 경우에는 잘못된 분류 데이터가 나올 수 있어서 본 연구에서는 이를 폭에 대한 파라미터를 측정해 정보를 얻었고, 블루레이저를 이용하여 상기 전체 형광성 (형광정도) 을 측정하였다.

X- 및 Y- 정자 집단을 분리하기 위하여 광전자 증폭관을 250~350 볼트 로 적절히 조정 하면 특정 그룹을 보다 명확히 구분 할 수 있다. 광전자 증폭관을 250~350 볼트 시이로 조절 하면, 정자가 사멸되어 영켜 있거나 살아있지만 혼합되어 영켜 있는 부분에 대해 특이성을 보 이며 이러한 부분을 차별하여 제거하는 단계를 거쳤다. 지금까지는 분리숫자 내지는 분리속도 를 높이는 경우 그 분리 순도가 대폭 낮아지는 문제점이 있었다. 이는 분리속도를 높일 경우 X- 및 Y-정자들이 혼합되어 나타나는 부분이 대폭 증가하는데, 종래방법에서는 그 부분이 닷 플릿 상에서 명확히 나타나지 않아 구분하기 힘들기 때문이지만 본 연구에서는 정자들이 혼합 되거나 영켜있는 부분, 또는 운동성이 많아서 배향이 달라지는 경우라도 닷 플릿 상에서 어느 정도 특징적인 구분 형태를 보여주기 때문에 분리속도와 숫자가 변동되어도 분리 시 고 순도 를 유지할 수 있는 방법을 고안하였다.

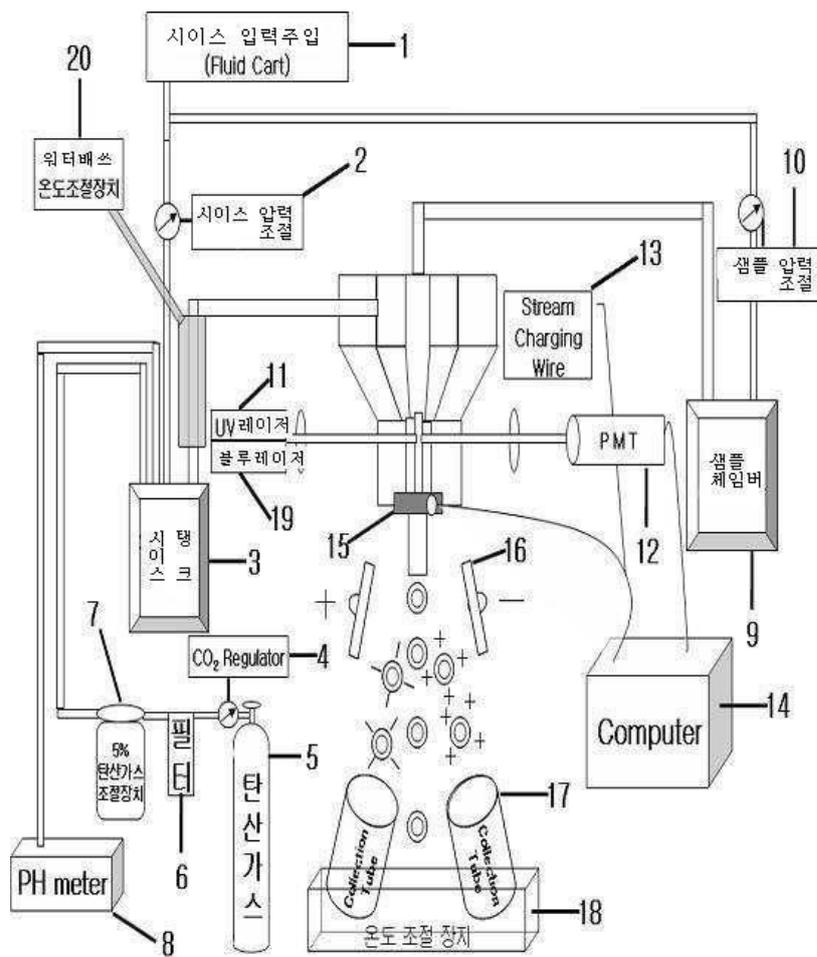


그림 1. Flowcytometer 를 이용한 정자 성 분리 모식도

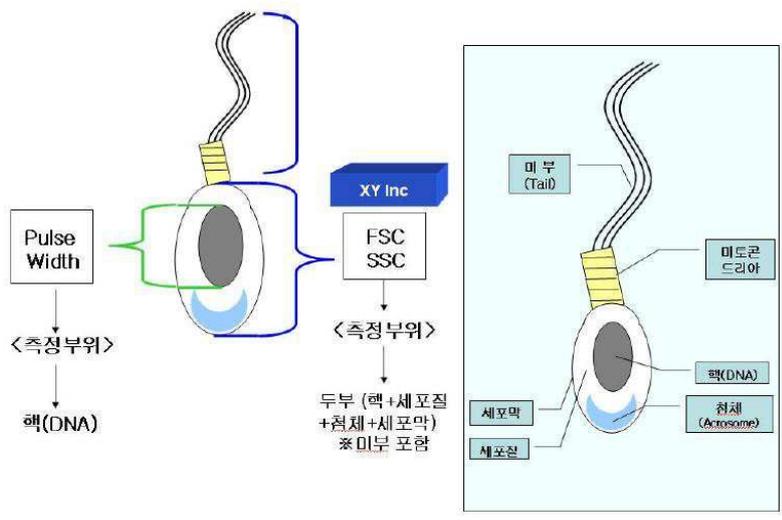
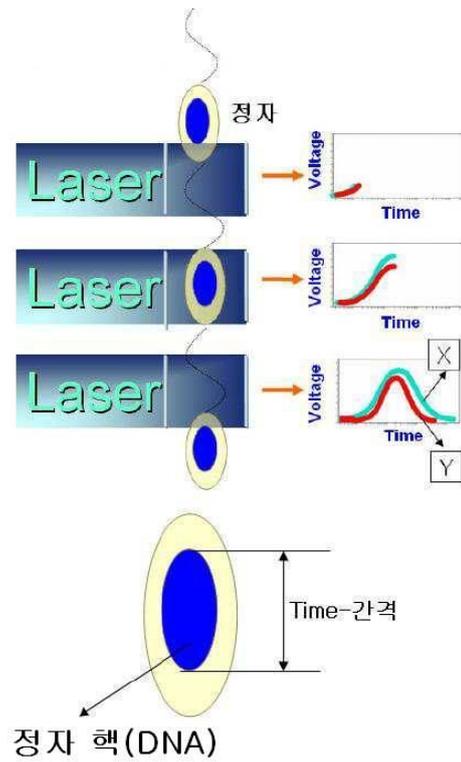


그림 2. 정자 핵의 폭에 대한 측정부위의 대상과 전체 체적의 측정 대상의 내용의 비교도면

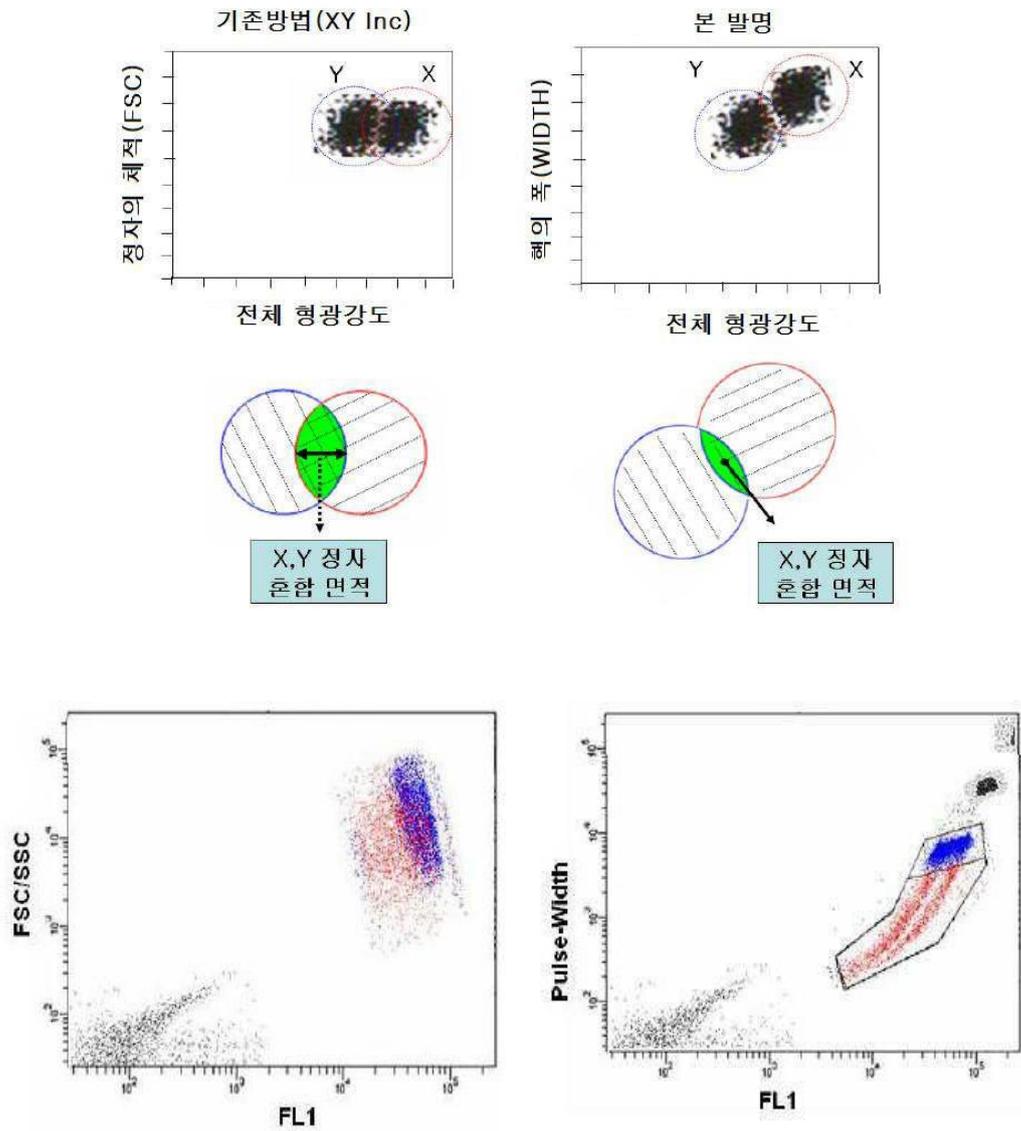


그림 3. 정자의 미부를 절단함이 없이 그대로 사용하고 배향각이 다양화된 것을 모두 포함하여 나타낸 도면

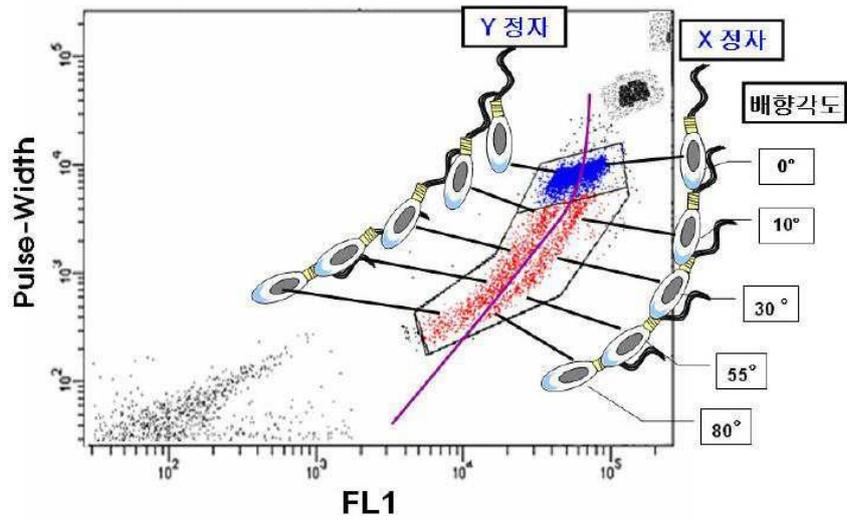


그림 4. 정자의 배향각도와 분리 파라미터에 대한 값을 표시한 도면

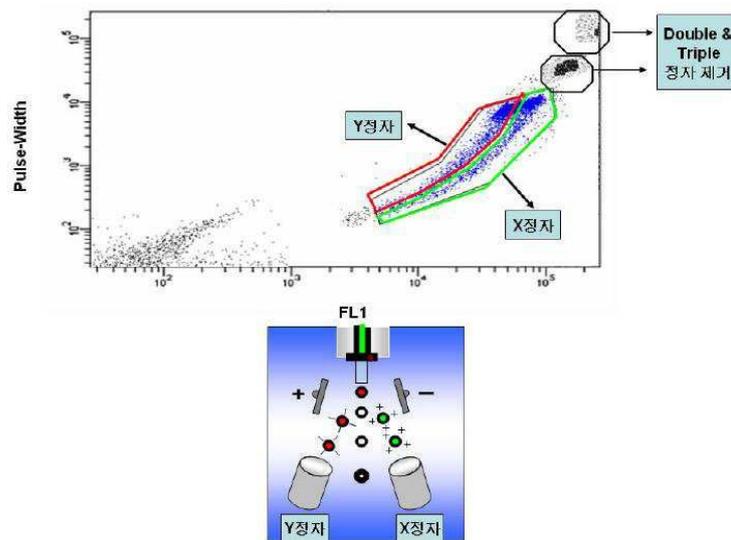
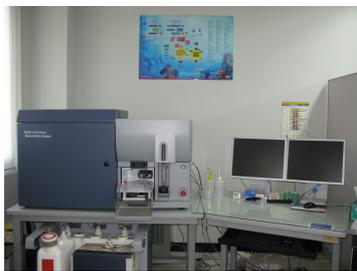
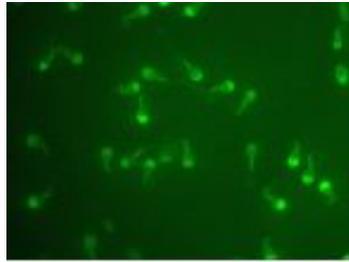


그림 5. Dot plot 상에 나타난 정자들의 분포에 따라 이를 X- Y- 성 분리하는 것을 나타낸 모식도

2. 신선하게 채취된 젖소 증모우 정자의 성 분리 (Facs Aria 유세포 분리기 이용)



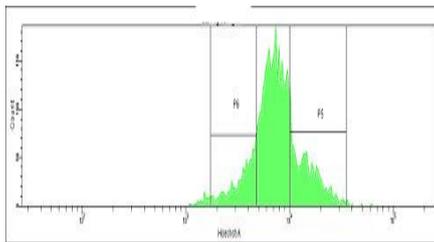
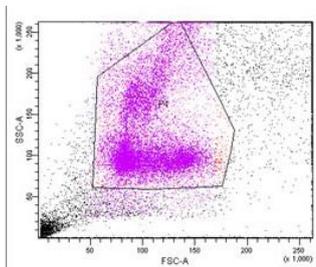
FACS Aria 유세포 분리기



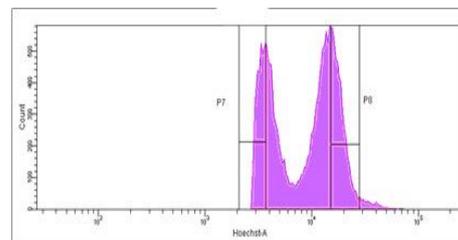
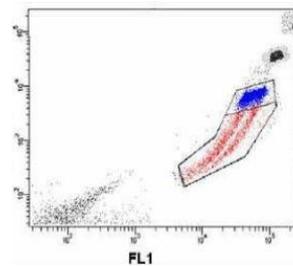
DNA 형광 염색된 정자



X 및 Y 정자 분리



유세포 분리기 상에 나타난
X 및 Y 정자가 혼합되어 있는 모습



X 와 Y 정자로 구분하여 group화 한 모습

그림 6. FACS Aria 를 이용한 젖소 X- 및 Y-정자 성 분리 실시

3. 성 분리된 정자의 정확도 검증

가. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) 방법

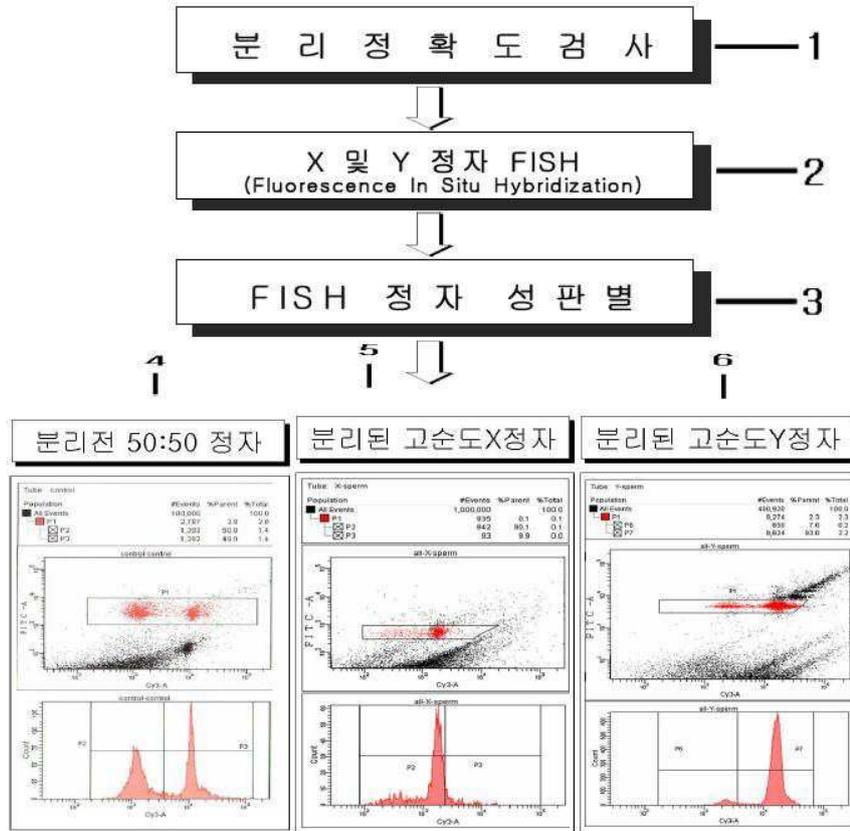


그림 7. 성 분리된 정자를 형광 접합 보인법(FISH)으로 분리정확도를 확인하는 방법과 그에 따른 성 분리된 정자의 순도 효율을 보여주는 도면

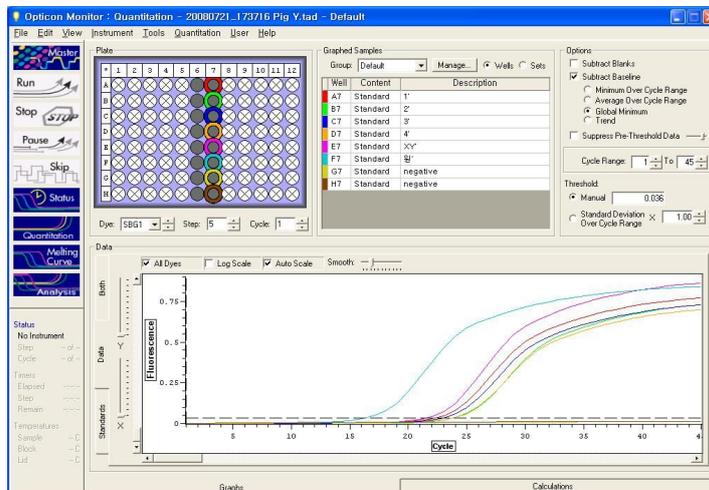


그림 8. 성 분리된 정자의 Real Time PCR을 이용한 분리 정확도 검사

나. 성 분리 정자 유래 생산된 수정란의 성감별 (PCR 방법)

수정란 성 감별에 이용된 프라이머:

Primer	Sequence	Fragment size
Bovine specific	5'-TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT-3' 5'-TCG TGA GAA ACC GCA CAC TG-3'	216bp
Bovine Y chromosome-specific	5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3' 5'-GGC TAT GCT AAC ACA AAT TCT-3'	141bp

PCR 조건:

Denaturation at 94°C for 5 min x 34 cycles

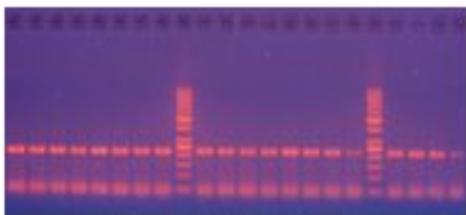
Denaturation at 94°C for 50sec

Annealing at 47°C for 30sec

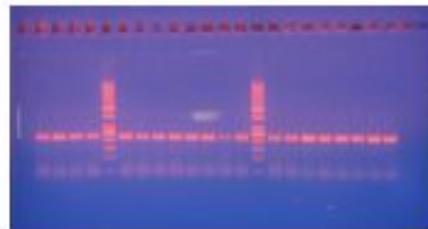
Primer extension at 72°C for 1Min.

Samples extension at 72°C for 5min.

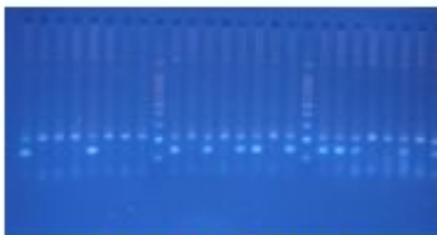
PCR products의 전기영동 --수정란의 성감별 (총 1,200여개의 수정란 성감별 예.)



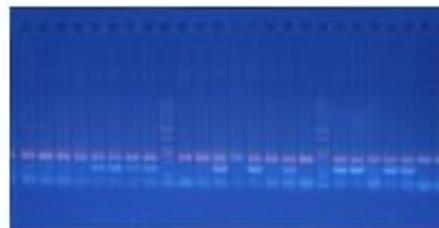
X-정자 이용 생산된 수정란



X-정자 이용 생산된 수정란



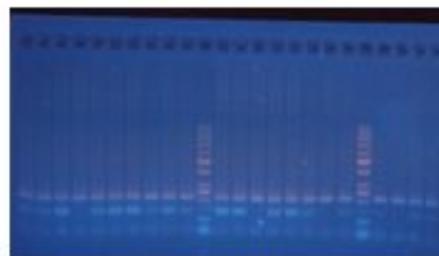
성 분리 안된 정자 이용 생산된 수정란



성 분리 안된 정자 이용 생산된 수정란



Y-정자 이용 생산된 수정란



Y-정자 이용 생산된 수정란

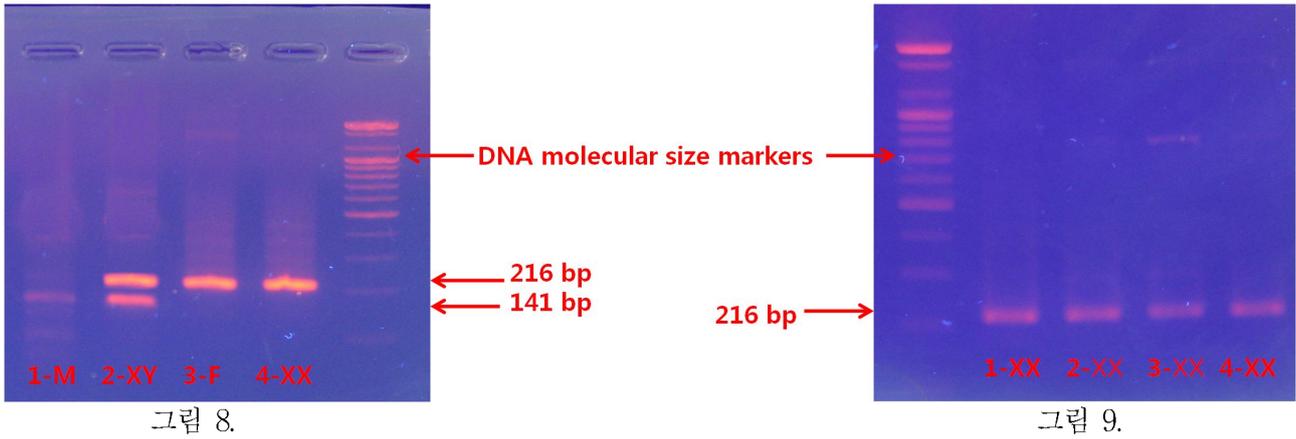


그림 9. For sexing of bovine embryo by detection of X, Y chromosome specific sequence using PCR. Lane M is 141 bp and F is 216 bp DNA ladder. Lane 1 and 3 are PCR products from immature oocytes and bull muscle of hanwoo. Lane 2 and 4 are PCR products from male and female embryos genomic DNA.

그림 10. Sexing of embryos derived from X-sorted spermatozoa

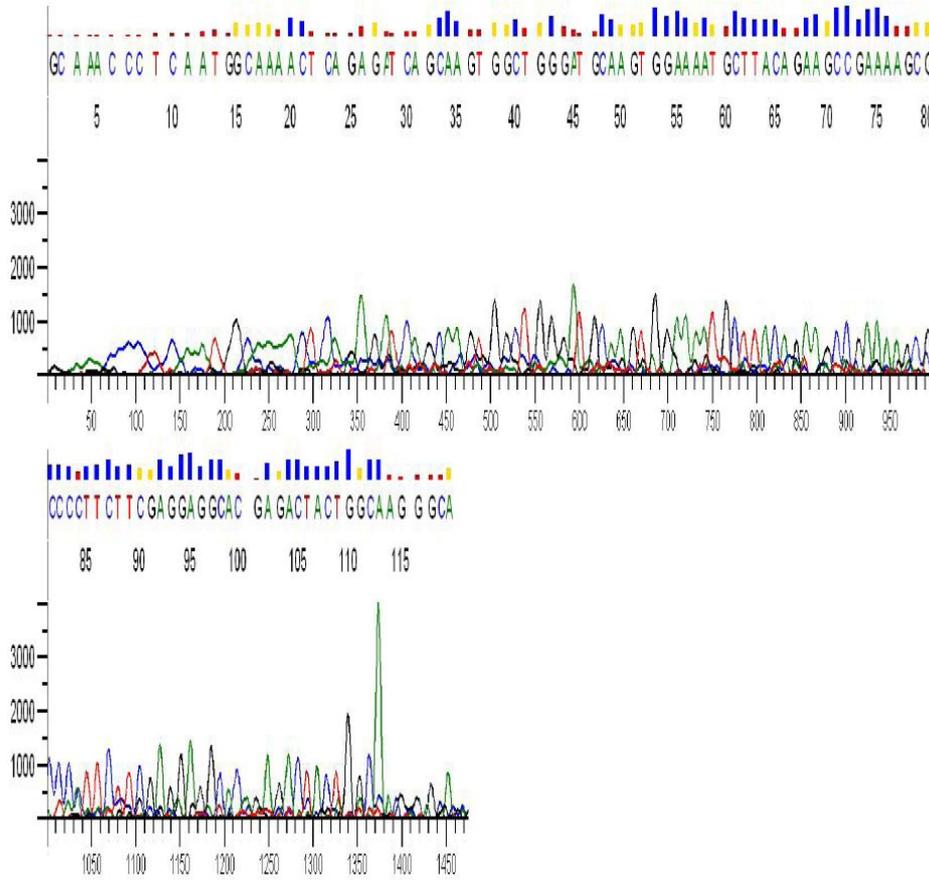


그림 11. PCR 기법을 이용한 수정란 성 감별의 정확도를 기하기 위하여 PCR products를 전기영동 한 후 특정 밴드를 random으로 추출하여 DNA sequencing 하여 재 검증

(2) 종모우 정액 채취, 정액 희석보존제 개선 및 성 분리 정자 정상검사 - 젓소개량 사업부

농협 중앙회 젓소개량부에서는 (원당), 주 1회 종모우 정액을 채취하여, 4도씨에 보관 상태로 천안으로 발송하면, 노아 바이오텍에서 정자를 성 분리 한 후, 분리된 정액의 일부를 다시 4도씨 상태로 농협중앙회로 보내어 분리된 정자의 생존율 및 활력을 CASA 분석하였다. 연구기간동안 다양한 희석보존제와 수송조건등을 변경시켜 가면서, 분리된 정자의 활력 및 생존율을 최적화 시키는데 주력하여, 분리된 정자를 이용하여 농가현장에서 이용하는데, 그동안 문제시 되어왔던, 분리된 정자의 활력 및 생존율을 크게 향상시켰다.

가. 종모우 정액 채취 및 희석

정자 성 분리를 위한 정액 희석 보존제: 6 리터의 증류수 + A + B + 항생제

A. (g)

Sodium citrate	sigma S4641	90
Dextrose (D-(+)glucose)	sigma G7528	50
Lactose	sigma L8783	5
Potassium citrate	sigma P1722	2.5
Sodium phosphate	sigma S7907	5
Sodium bicarbonate	sigma S6297	10

B. (g)

Tris	sigma T1378	30.2
Citric acid	sigma C7129	17.4
Fructose	sigma F2543	10.0
E.D.T.A	sigma E5391	1.5

C.

Lincomycin	sigma L6004	Lincomycin 300 μ g/ml
Tyrosine	sigma T6271	Tyrosine 100 μ g/ml
Spectinomycin	sigma S4014	Spectinomycin 600 μ g/ml
Gentamycin	sigma G3632	Gentamycin 500 μ g/ml

F1 : extender + Egg Yolk (final concentration, 20%)

F2 : F1 + Glycerol 14% (* Glycerol - sigma G 5150)

F3 : (F1+F2) + same volume

* 삼투압 : 290~310

* PH : 6.8~7.0

* 4 $^{\circ}$ C 냉장 보관

나. 성 분리된 정자의 성상 검사

(1) 정자의 품질검사

지난 몇 년간 정자의 구조와 기능을 보다 정확히 평가할 수 있는 방법들이 계속 보고되고 있다. 정자의 두부 침체와 세포막 손상, 활력 또는 생존율 검사 방법으로서 종전의 염색 방법이 아닌 형광염색방법이 많이 응용되고 있다. 특히 돼지정자의 경우, acrosin 활성, HOST (hypo- osmotic swelling test), 미토콘드리아 기능검사가 돼지 정자의 수정능력을 평가하는데, 매우 유용한 방법으로 제시되고 있다. 최근에는 정자 DNA 구조 이상 유무 검사가 종모축의 번식력 저하 원인, 수태율 예측, 정액 품질관리의 지표로서 이용될 수 있는 것으로 보고되었다.



그림 12. CASA System



그림 13. 유세포 분석기

정자 품질 검사 항목

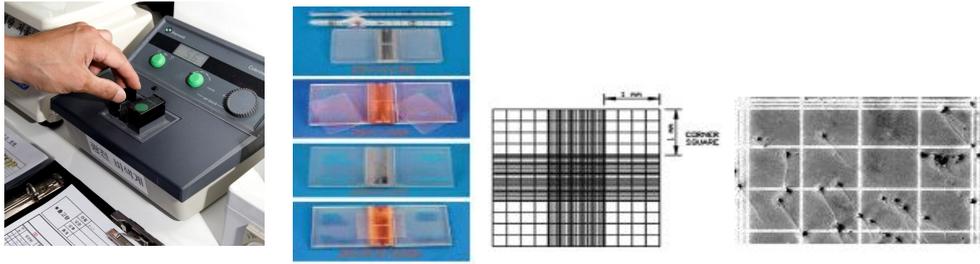
1. 정자 농도검사
2. 정액의 pH
3. 정액의 삼투압
4. 정자 활력 및 생존율
5. 정자 DNA 구조이상 유무
6. 정자 기형을 및 침체 이상 유무
7. 정자 수정율 검사 (IVF)

1. 정자 농도 검사

정자농도는 광전 비색계 (photoelectric colorimeter), 혹은 혈구계산판을 (hemacytometer) 사용하여 측정하였다. 광전비색계는 장비를 워밍업 시킨 후, 3% sodium citrate 용액 7.2ml 과 원정액 0.3ml을 시험관에 넣고 광전 비색계에 옮겨 잘 혼합시킨 후 측정한다.

혈구계산판을 이용한 정자 숫자 계산은 혈구계산판과 커버글라스 사이에 정액을 소량 (10 μ l) 떨어뜨려 계산판의 눈금 내에 (높이10 μ m) 정액이 스며들게 한다. 그 다음 혈구계산판에서 25구획의 정자 수를 모두 세었을 때 (혹은 5 구획만을 계수하고 x 5) 그 수에다 10⁴을 곱하면 정액 ml당 정자수가 된다. 혈구계산법 의 계산은 다음과 같다.

정자 수 (/ml) = 혈구계산판 내의 총 정자 수 x 희석배율 x 1mm³로 환산 (10⁴) 로 계산한다.



2. 정액의 pH 검사

pH 검사는 수소 이온 농도를 측정하는 것으로 pH meter로 측정한다. 먼저 pH 미터를 calibration하기 위해 pH 4, 7, 10의 표준 용액을 활용하여 영점을 잡은 후 시료를 측정하였다. 젖소 정액의 평균 pH 는 6.8~7.2 이며 정상 범위를 벗어나는 정액은 부생식선의 분비액에 문제가 있거나, 이물질에 의한 오염으로 간주할 수 있다. pH 7.0 (중성)을 기준으로 정자가 산성 환경에 노출되면 운동과 대사율이 감소됨으로, 알칼리 환경에 비해 생존율이 다소 길어진다. 반면 알칼리 환경에 정자가 노출되면 대사가 증진되어 활력은 증가하지만 그 만큼 생존기간은 단축 된다.

3. 정액의 삼투압 검사

삼투압은 주로 빙점강하도 측정 장치를 사용하여 (OSMOMAT 030-D) 검사를 실시한다. 위밍업이 끝난 장비는 증류수와 calibration standard로 (OSM 300) 로 영점을 맞추고 시료의 삼투압을 측정한다. 젖소 정액의 평균 삼투압은 290~310 mOSM/kg 으로 이 범위내에서 측정되면 정상범위로 간주한다. 정액 보존을 위한 희석제의 삼투압은 정액보다 약간 고장액이 좋지만, 심각한 차이는(>360mOSM/kg) 정자의 활력과 생존성을 저해한다. 저장액에서는 처음에는 정자 활력이 증가되어 활력이 좋아 보이지만, 시간이 지나면 이상 운동성이 나타나고 마침내 정지한다. 한편 고장액에서는 서서히 정자 운동성이 저하되고 나중에는 멈추게 된다.



pH 미터



삼투압 측정기

4. 정자 활력 및 생존율

일반 광학현미경 하에서 육안검사를 통해 정자의 활력을 검사할 수 있으나, 이는 검사자의 주관이 많이 포함되어있다 할 수 있다. 보다 객관적인 정자의 운동성을 분석하기 위해서는

현미경에 video camera 와 컴퓨터가 연결되어 다양한 정자의 운동성을 분석하는 자동 정자 분석기 (Commuter Assisted Sperm Analysis) 와 좀 더 정밀하게는 유세포 분석기 (Flowcytometry) 를 활용하면 정확한 정자의 활력 뿐만 아니라, 생존율 및 그 외 다양한 기능검사를 동시에 수행할 수 있다.

CASA 를 통한 정자 운동성 분석 항목

- ① **Mot** : motility (%) - 운동성
 - 전체 정자 중에서 운동성이 있는 정자의 비율
- ② **VCL** : curve linear velocity ($\mu\text{m/s}$) - 곡선속도
 - 각 정자의 운동경로를 따라 형성되는 곡선의 단위시간당 이동 거리
- ③ **VSL** : straight line velocity ($\mu\text{m/s}$) - 직선속도
 - 정자의 처음위치와 마지막 위치 사이의 직선거리를 전체 경과한 시간으로 나눈 값
- ④ **VAP** : average path velocity ($\mu\text{m/s}$) - 평균이동속도
 - 전체 이동한 거리를 경과한 시간으로 나눈 값
- ⑤ **LIN** : linearity(%) - 직진성



Table 1. 젓소 개량사업소에서 (원당) 원정액 채취 후 노아 바이오텍으로 (천안) 수송하여 성 분리한 후 성 분리된 정자를 다시 젓소개량 사업소로 운송하여 CASA 분석실시 (예)

차수	채취일	검사일	정액 번호	정자	정액량	정자 농도	MOT	PROG	VAP	VSL	VCL	비고
1	07/21	07/23	H-302	X	0.50	0.030	53	11	85.8	69.2	192.6	원심 분리
				Y	0.50	0.015	56	5	80.8	63.9	164.9	원심 분리
2	07/28	07/30	H-302	X	0.50	0.030	59	21	126.0	93.0	260.8	
				Y	0.50	0.015	58	17	114.9	84.0	272.7	
3	08/04	08/06	H-302	X	0.50	0.015	56	18	124.0	88.9	260.7	원심 분리
				Y	0.50	0.015	63	15	133.6	95.8	288.1	원심 분리
4	08/25	08/27	H-302	X	0.50	0.030	64	1	40.0	35.5	74.4	
5	09/01	09/03	H-304	X	0.50	0.030	85	63	126.0	86.6	246.2	
6	09/08	09/10	H-304	X	0.50	0.015	78					
7	09/15	09/17	H-304	X	0.50	0.015	64					
8	09/29	09/30	H-302	X	0.50	0.015	62					
9	10/06	10/08	H-302	X	0.50	0.030	54	28	108.1	85.1	238.5	
10	10/13	10/14	H-304	X	0.50	0.030	56	9	60.9	48.5	97.7	
11	10/20	10/21	H-304	X	0.50	0.050	57	13	77.7	64.6	129.9	
12	10/27	10/28	H-1009	X	0.50	0.070	53	43	126.1	85.5	223.0	
13	11/03	11/04	HK-165	X	0.50	0.040	49	18	87.9	56.3	133.4	
14	11/10	11/11	H-1007	X	0.50	0.040	56	2	43.4	28.5	83.5	
15	11/17	11/18	H-1009	X	0.50	0.060	58	47	122.1	89.6	228.8	이물질 미량
16	11/24	11/25	H-1009	X	0.50	0.070	78	64	138.3	97.0	257.9	
17	12/01	12/01	H-1009	X	0.50		59					
평균					0.50	0.045	60.90	23	99.7	73.3	197.1	

정자의 생존율은 생사염색을 통하여 (Live/Dead kit, Maxwell과 Johnson, 1997), 형광 현미경 혹은 유세포 분석기 (flowcytometer) 로 분석한다. 정자를 머큐리 아크 (mercury arc) 램프로 조사하면 살아있는 정자는 SYBR-14 (Syber Green, 100nM, 5~10분) 에 염색되어 녹색으로 보이고 사멸된 정자는 PI (Propidium Iodide, 12μM, 5~10분) 에 염색되어 오렌지색으로 나타낸다. 형광 현미경 혹은 유세포 분석기에 옮겨 측정하고자하는 시료에서 녹색 및 오렌지색으로 염색된 형광 비율을 분석하여 보존시간 경과별 정자의 생존율을 분석한다.

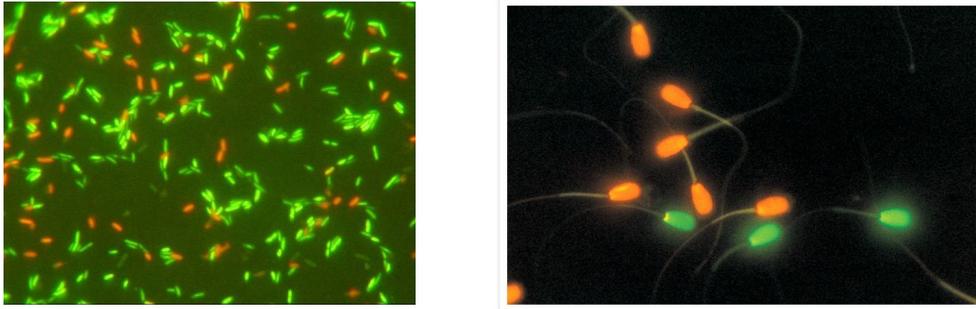


그림 14. 생사염색 (SYBR-14 + PI 염색)

정자 활력을 위한 에너지원 인 미토콘드리아 함량을 조사하면 보다 정확하고 객관적인 활력을 조사할 수 있다. 검사를 위해 정자 내 미토콘드리아를 선택적으로 염색할 수 있는 Rhodamin-123 형광염료에 10분간 36~7°C에 염색하고, 형광 현미경으로 계수하거나 유세포분리기를 이용하여 분석한다. 정자의 운동성 및 생존율은 정액 보존 일수에 따라 점차 감소하는데, 활력이나 생존율이 60% 이하이면 수태율이 감소한다는 연구결과가 있어, 본 연구에서는 양축농가에서 인공수정 시 정자의 운동성이 60% 이상인 정자를 사용하였다.

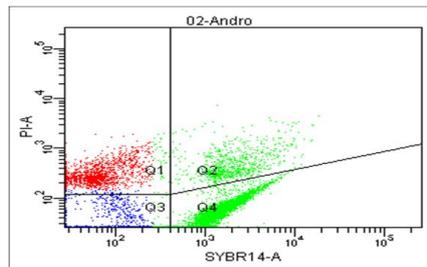


그림 15. SYBR-14+ PI 염색

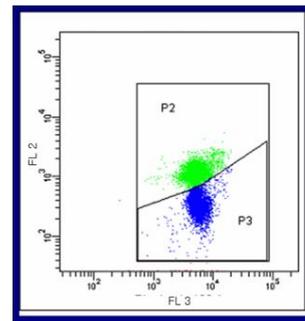


그림 16. Rhodamin-123 염색

그림 12 : 형광 염색의 경우 사멸정자는 붉은색으로 (Q1), 생존정자는 녹색으로 (Q2) 염색되며, 생존은 하고 있지만 운동성이 없는 죽어가는 정자 (Q2) 로 정확하게 구분되어진다. Q3 영역은 정자 이외의 먼지 등 이물질.

그림 13 : SYBR-14 염색액으로 생존정자를 염색하고 (녹색 영역), Rhodamin-123 염색액으로 생존정자의 미토콘드리아를 염색한 후 (파란색 영역), 미토콘드리아 함량을 측정하면 매우 정확성 정자 활력을 측정할 수있다.

5. 정자 DNA 구조이상 유무 테스트

정자 보존 경과 일수에 따른 정자세포막 지질의 산화로 발생할 수 있는 정자 DNA 손상여부를 검사할 수 있다. 정상적인 2중 나선구조의 DNA 가닥은 Acridine Orange 형광 염료에 의해 염색이 되고 블루 레이저 광원(488nm)에 의해 녹색의 형광을 발광하게 되어 530/30nm 밴드 필터에 의해 형광 시그널이 집광되는 반면 손상된 단일 가닥의 DNA 구조는 블루 레이저 광원(488nm)에 의해 빨강 형광을 발광하게 되어 610/20 nm 밴드 필터에 의해 형광 시그널이 집광된다. 상기 열거한 두 개의 형광염료를 실온에서 각각 5분간 염색한 후 형광 현미경 혹은 유세포 분석기로 정자 보존 시간 경과별 DNA 구조 이상 유무를 비교 분석할 수 있다.

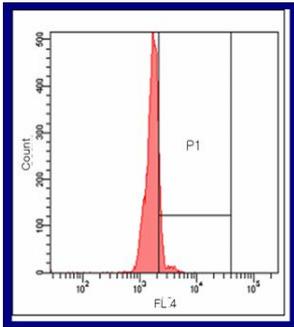


그림 17. 최근에는 사람에서 불임 남성의 경우와 정자내 DNA 손상 여부와는 높은 상관관계가 보고되어있어, 옹돈의 수정능력을 평가하는데 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

그림 17. Acridine Orange 염색

6. 기형 정자 및 침체 이상유무 검사

정자의 기형은 정자 형성과정에서 발생하는 일차적 기형과 (두부, 경부, 및 중편부 기형), 정상적으로 형성된 후 정소상체나 정관, 요도를 통과하는 과정에서 2차적으로 발생하는 미부기형, 정액 채취한 후 온도충격이나, 급격한 삼투압의 변화로 인하여 발생하는 인위적 기형으로 구분된다. 젯소 정자의 기형율은 14~17% 이내 인데, 정자 경부에 세포질소적이 (염주달린 정자, 미숙정자) 30%를 넘으면 수태율이 현저히 떨어진다는 보고가 있다. 기형을 검사는 Carbo-Fuchsin 염색법으로 비교적 손쉽게 광학현미경하에서 정자의 이상 형태를 관찰하고 분석할 수 있다. FITC 나 PI 형광 염색하는 경우 형광현미경하에서 좀더 선명하게 관찰할 수 있다. 상품화된 “Spermac” 염색액을 이용하여 기형 정자 및 침체 이상유무를 광학현미경하에서 동시에 검사할 수 있다.

1. 액상정액 2~10 μ l 를 슬라이드위에 떨어뜨려 커버 글라스를 이용하여 도말 한 후 공기 중에서 약 5분간 건조시킨다. (정자의 농도 조절이 필요한 경우는 1:1 비율로 시트르산 수용액으로 희석)
2. 정자가 도말된 슬라이드 위에 포르말린으로 고정하고 (5분~1시간) 증류수로 6~7회 세척한 다음 (비이커에 넣었다 뺏다를 반복) 한 다음 공기 건조시킨다. 과도한 물기는 페이퍼 타올을 이용하여 살짝 닦게 하여 제거한다.
3. 염색액 A를 이용하여 1~2 분간 염색 후 증류수로 6~7회 washing한다.
4. 염색액 B를 이용하여 1분간 염색 후 증류수로 6~7회 washing 한다.
5. 염색액 C를 이용하여 1분간 염색 후 증류수로 6~7회 washing 한 후 공기 건조후 1000x 광학 현미경하에서 정자를 관찰하여 그 비율을 검사 한다.

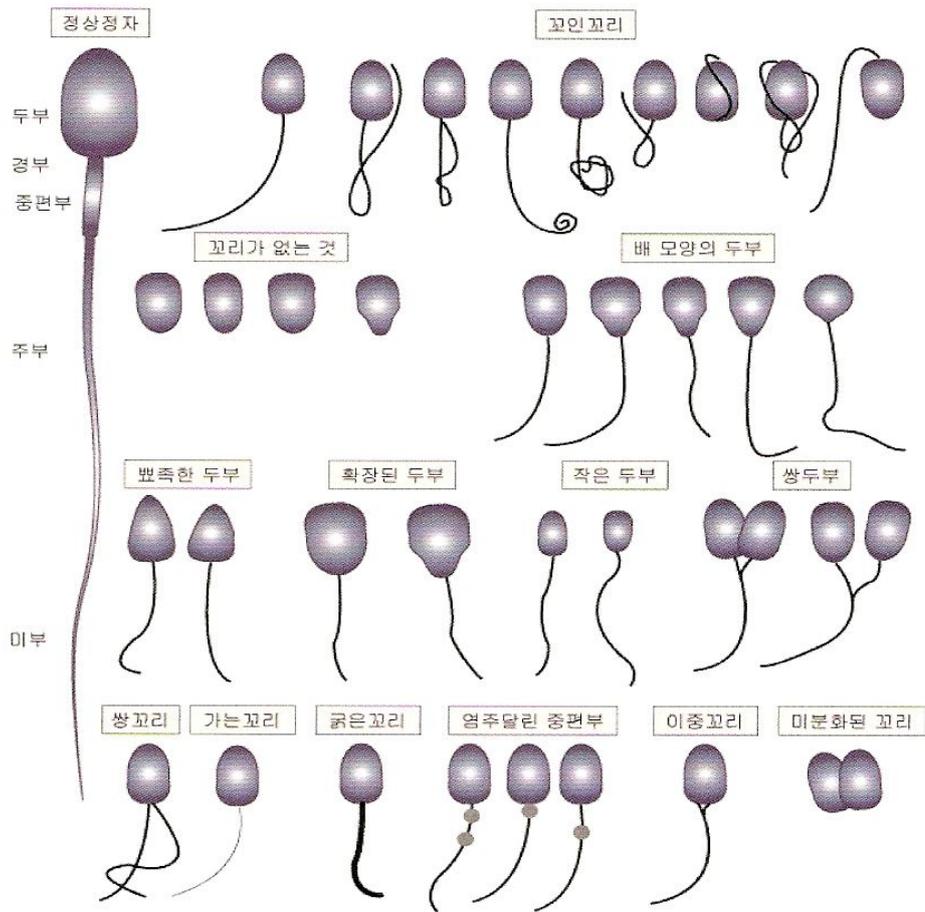
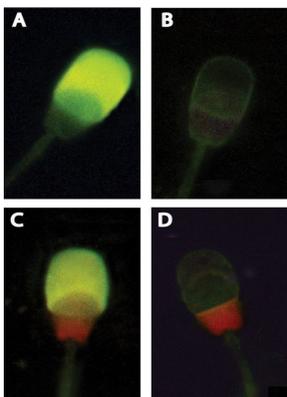


그림 18. 기형정자의 종류

정상적인 젖소 정자는 타원형 두부의 크기는 가로 2~3 μm , 세로 3~5 μm 이며 손상 되지 않은 경부, 중편부, 미부를 포함하여 약 15 μm 가 된다. Spermac 염색액으로 염색한 경우 첨체부위는 진한 녹색으로 염색되고, 핵은 빨간색으로 염색되고 중편부와 꼬리는 연한 녹색으로 염색된다.



- A: 첨체반응이 일어나지 않은 (acrosome intact) 살아 있는 정자
- B: 첨체반응이 일어난 (acrosome reacted) 살아있는 정자
- C: 첨체 반응이 안 일어난 죽은 정자,
- D: 첨체 반응이 일어난 죽은 정자

그림 19. FITC+PI 염색액으로 염색한 정자. 첨체부분은 FITC로 염색되어 녹색으로 나타나고, 죽은 정자는 정자 핵 부위가 PI에 염색되어 오렌지색으로 염색됨.

7. 정자의 수정능력 평가

A. 체외수정을 검사

젖소 정자의 수정능력을 현미경적 평가나 화학적 검사만으로는 그 상관관계를 예측하기에는 다소 무리가 있고, 정자의 수정능력을 좀더 객관적으로 평가 할 수 있는 방법으로는 체외수정 (IVF) 방법을 이용하여 정자 수정능력을 간접적으로 평가할 수 있다. 도축장에서 채집된 난소에서 회수된 미성숙 난자는 IVM-I 배양액에서 약 22시간, IVM-II 배양액에서 에서 약 20시간 총 42시간 동안 체외성숙시켜 수정에 이용한다. 수정액은 m-TBM을 이용하며, 난자는 50~100 μ l drop 안에서 준비된 돼지 정자를 이용하여 체외수정 시킨 후 계속하여 배양하면서 수정율, 할구분할율 및 배반포 단계로까지 발달율을 측정하면 종모돈의 수태능력을 간접적으로 평가할 수있다.

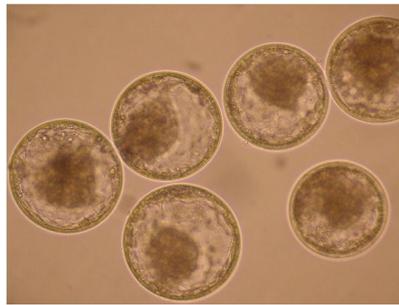


그림 20. 배반포 단계의 소 수정란

(3). 체내,외 수정란 생산 및 수정란 이식관련 연구 성과 - 이티 바이오텍 (주)

본 연구과제의 참여기업인 이티바이오텍 (주) 은 개체별 체외수정란 생산을 통해 도축되는 암소 한 마리당 평균 29개의 미성숙난자를 회수하여 도축되는 암소 한 마리로부터 평균 배반포 8.4 개를 생산, 유전자원을 재활용할 수 있는 기틀을 마련하였다 (표1 참조).

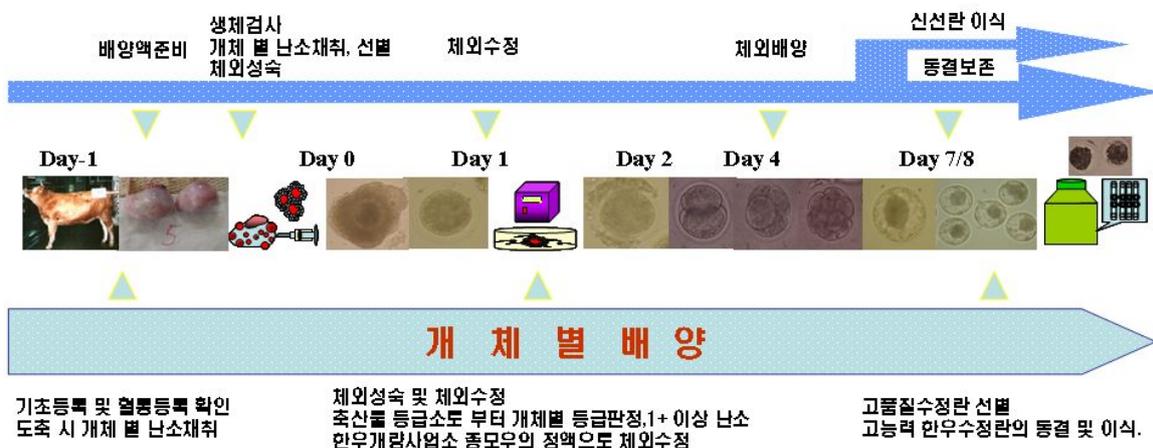


그림 21. 도축우의 개체별 수정란 생산과정

가. 공시 난소

울산시 울주군 소재에서 도축된 젖소의 난소를 난소 표면의 혈액과 이물질을 제거하고 생리식염수가 들어있는 보온병(20℃)에 침전하여 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다.

나. 배양액

본 실험에 사용한 배양액은 난포란 회수용 배양액은 0.3% bovine serum albumin(BSA)가 첨가된 tissue culture medium-199(TCM-199)이고, 미성숙 난자의 체외성숙용 배양액은 IVMD101(일본:기능성펩티드연구소), 체외수정용 배양액은 IVF100(일본:기능성펩티드연구소), 체외배양용 배양액은 IVMD101, IVD101(일본:기능성펩티드연구소)로 완전 무혈청배양액이다(Yamashita et al., 1999). 성 분리된 정자의 세정 및 체외수정을 위한 배양액은 BO 배양액(Brackett and Oliphant, 1975)에서 구성성분을 일부 변경한 IVF100 용액을 사용하였고, 그 구성성분은 25mM sodium pyruvate, 0.5mM cysteine, 5mg/ml BSA, 5mM caffeine(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Ooka, Japan), 7.5mg/ml heparin이었다. 각 배양액은 사용하기 2주 전에 제조하여 0.22 μ m membrane filter(Gelman Science, Ann Arbor, MI)로 여과하고, 4℃ 냉장고에 보관한 후 사용하기 전에 반드시 5% CO₂배양기에서 4~5시간 평형한 후 사용하였다.

다. 난포란의 회수

도축장에서 개체별로 채취한 난소는 개체별로 생리식염수로 2~3회 세척한 후, 난소 표면의 혈액과 이물질을 제거한 후 10ml 주사기에 18gauge 주사침을 부착하여 2~6mm 직경의 난포로부터 난포란을 개체별로 회수하여 TCM-199용액으로 2~3회 세척한 후 상층액을 제거하고, pasteur pipette으로 실체현미경(40~80 \times)하에서 Wiemer 등(1991)의 방법에 따라 난구세포가 잘 부착되어 있는 난포란만을 회수하여 35mm petri dish에 분주하였다.

라. 난포란의 체외성숙

회수한 난포란은 IVMD101 배양액으로 1~2회 세척한 후 5 well dish에 IVMD101 배양액을 800 μ l씩 분주하고 각 개체별로 1 well당 20~40개씩 넣어 39℃, 5% CO₂ incubator에서 22~24시간 동안 각각 체외성숙을 유도하여 난구세포가 잘 확산된 난포란만을 선발하여 체외수정에 사용하였다.

마. 정자의 준비와 체외수정

성 분리된 정자는 준비해둔 15ml 원심분리관 (Falcon, 2097)에 4ml의 IVF100 용액에 정액을 넣고 pipetting한 후 700rpm으로 5분간 원심분리한 후 200 μ l 정도 남기고 상층액을 제거하고, 조심스럽게 pipetting하고 재차 4ml의 IVF 100 용액에 희석하여 700rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 최종정자농도가 1 \times 10⁷/ml가 되도록 조절하였다. 체외수정은 미리 준비해둔 60mm petri dish에 mineral oil로 피복된 100 μ l drop의 IVF100 배양액에서 22시간 동안 체외성숙과정을 거친 난포란을 1~2회 세척한 후 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 정자와 난자를 8시간 동안 체외수정을 유도하였다.

바. 수정란의 체외배양

8시간 동안 체외수정을 실시한 후 개체별 난포란은 200 μ l의 micropipette으로 pipetting하여 난구세포를 3층만 남기고 제거하고 실체현미경하에서 난자에 존재하는 제2극체 유무와 관계없이 형태적으로 정상이라고 판단되는 수정된 난자를 회수하였다. 회수된 수정란을 미리 준비해둔 60mm petri dish에 mineral oil로 피복된 100 μ l drop의 IVMD101 용액으로 2~3회 washing한 후 60mm dish(Falcon, 3002)에 100 μ l drop의 IVMD101 배양액에 수정란을 개체별로 20~40개씩 분주하고 24시간 동안 체외배양을 하였다. 30시간 체외배양한 후 수정란에 부착된 3층 정도의 난구세포를 완전히 제거하여 6 well dish에 IVD101 배양액으로 well당 200 μ l씩 넣고 mineral oil을 도포한 다음 개체별로 5%의 저산소 incubator에서 배양하였다. IVD101 배양액은 수정한 후 5일째에 200 μ l 중 100 μ l를 교환하고, 7~8일째까지 배양하여 배반포배를 확인하였다.

사. 수정란이식

수정란이식을 위한 수란우는 합천, 거창, 담양의 목장에서 생후 16개월 이상된 건강한 젖소를 공시하였고, 수정란이식 시술을 하기 전에 3회 이상의 정상적인 발정주기를 보인 미경산우만 선발하여 발정 7일째에 직장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치(좌 또는 우)를 확인하고, 황체의 크기가 정상(15~25mm)이고 형태가 정상인 황체를 갖고 있는 수란우를 발정주기에 관계없이 25ml의 prostaglandinF₂ α (PGF₂ α :Lutalyse, Upjohn Co.)를 11일 간격으로 2회 근육주사하는 방법으로 발정동기화를 유도하였다. 발정동기화를 유도한 수란우는 1일 3회, 1회 30분 이상 관찰하여 standing estrus(발정 0일)를 보이는 개체를 발정우로 판정하여 7일째에 비 외과적인 자궁경관 경유법에 의해 수정란을 이식하였다.

체외수정란의 발생능력과 수란우의 수태율을 조사하기 위해 수란우를 수정란을 이식한 후 50일째에 직장검사법으로 태막 및 양막낭을 촉진하여 수태여부를 조사하였다.

X정자를 이용한 과배란 처리과정

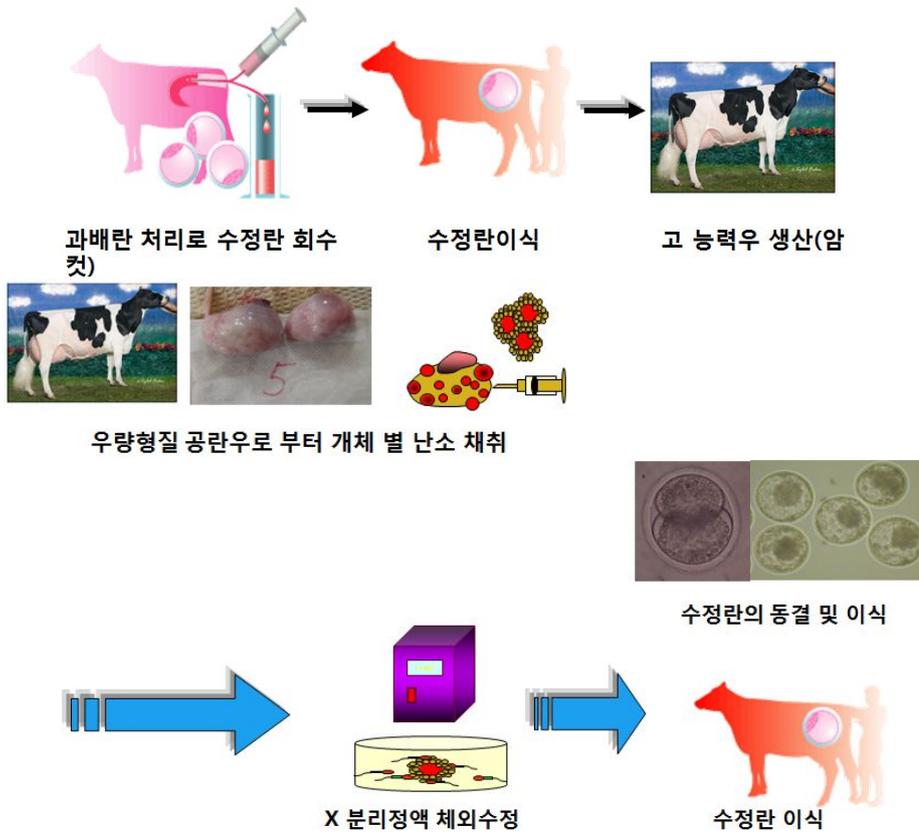


그림 22. 성 분리 정자 유래 체내, 외 수정란 생산 및 이식

제 2절 연구개발결과

가. 성 분리정자의 인공수정 (계획 10두---> 실시 27두) 및 수정란이식 (계획 50두 ---> 실시- 56두)

경북 경주시	오XX 농장 (인공수정 : 8두)
경남 합천군	백XX 농장 (수정란이식 : 16두)
경남 거창군	추XX 농장 (수정란이식 : 22두, 인공수정 : 12두)
전남 담양군	이XX 농장 (수정란이식 : 18두, 인공수정 : 7두)

나. 수정란 생산 실적 (2010. 8 ~ 2012. 2)

구 분	난자수	2세포	상실배	배반포
대조구	3,632	2,895 (79.7)	2,125 (58.5)	886 (24.4)
XX	3,213	2,422 (75.4)	1,452 (45.2)	713 (22.2)

다, 성 분리 정자를 이용한 인공수정 및 수정란 이식 현황

두수	수정 일자	AI/ET	ID	산차	분만/예정	압	수	비고
1	2010-06-09	AI	3823	1	2011-03-22	○		
2	2010-06-09	AI	1724	2	발정 재귀			
3	2010-06-09	AI	830	1	2011-03-23		○	
4	2010-06-09	AI	6724	1	2011-03-24	○		설사
5	2010-06-09	ET	612	2	발정 재귀			신선란
6	2010-06-16	ET	384	1	발정 재귀			신선란
7	2010-06-16	ET	287	1	2011-03-29	○	설사	신선란
8	2010-06-16	ET	9431	1	2011-03-30	○		신선란
9	2010-06-16	AI	1230	2	발정 재귀			
10	2010-07-08	AI	478	1	2011-04-19	○		
11	2010-07-08	AI	5301	1	발정 재귀			
12	2010-07-08	AI	2374	2	2011-04-21	○		장염
13	2010-07-08	AI	9820	1	2011-04-20	○		
14	2010-07-08	ET	1003	1	발정 재귀			신선란
15	2010-09-01	ET	1730	1	발정 재귀			신선란
16	2010-09-01	ET	871	1	2011-06-14	○		신선란
17	2010-09-01	ET	2341	2	발정 재귀			신선란
18	2010-09-01	ET	437	1	2011-06-16	○		신선란
19	2010-09-01	ET	417	2	2011-06-14	○		신선란
20	2010-09-01	ET	846	1	발정 재귀			신선란
21	2010-09-08	ET	1457	2	2011-06-21		○	동결란
21	2010-09-08	ET	2396	1	발정 재귀			동결란
23	2010-09-08	ET	3641	1	2011-06-22	○		동결란
24	2010-09-08	ET	9910	1	발정 재귀			동결란
25	2010-09-08	ET	3314	1	2011-06-23	○		동결란
26	2010-09-15	ET	2768	1	발정 재귀			신선란
27	2010-09-15	ET	L860	2	2011-06-27	○	설사	신선란
28	2010-09-15	ET	961	1	발정 재귀			신선란

29	2010-09-15	ET	891	1	2011-06-28	○		신선란
30	2010-09-15	ET	924	2	2011-06-28		○	신선란
31	2010-10-06	ET	1006	1	유산			동결란
31	2010-10-06	AI	1580	2	발정 재귀			
32	2010-10-06	AI	962	2	2011-07-20		○	
33	2010-10-06	AI	5509	1	2011-07-20	○		
34	2010-10-06	AI	973	1	발정 재귀			
35	2010-10-06	ET	718	1	2011-07-21	○		신선란
36	2010-10-06	ET	2784	2	2011-07-21	○		신선란
37	2010-10-06	ET	3706	1	발정 재귀			신선란
38	2010-10-12	ET	7771	2	2011-07-25	○		신선란
39	2010-10-12	ET	652	1	2011-07-25		○	신선란
40	2010-10-12	ET	863	2	발정 재귀			신선란
41	2010-10-12	ET	981	1	2011-07-26	○		신선란
42	2010-10-12	ET	988	1	2011-07-26	○		신선란
43	2010-10-12	ET	1084	2	발정 재귀			신선란
44	2010-10-12	AI	2387	1	2012-07-26	○		
45	2010-10-20	AI	156	3	발정 재귀			
46	2010-10-20	ET	887	1	2011-08-02		○	동결란
47	2010-10-20	ET	1349	1	2011-08-02	○		동결란
48	2010-10-20	ET	2048	2	발정 재귀			동결란
49	2010-10-20	ET	3689	2	2011-08-02	○		동결란
50	2010-10-27	AI	8639	1	2011-08-09	○		
51	2010-10-27	AI	2478	1	2011-08-09	○		
52	2010-10-27	AI	152	1	발정 재귀			
53	2010-10-27	ET	6581	1	2011-08-09	○		신선란
54	2010-10-27	ET	2684	2	2011-08-09		○	신선란
55	2010-10-27	ET	4760	2	2011-08-09	○		신선란
56	2010-10-27	ET	5001	1	2011-08-09	○		신선란
57	2010-11-03	AI	1694	1	발정 재귀			
58	2010-11-03	AI	2657	2	2011-08-16		○	
59	2010-11-03	AI	630	2	2011-08-16	○		
60	2010-11-03	ET	4712	1	발정 재귀			신선란
61	2011-08-03	ET	1163	2	2012-05-22	○		신선란
62	2011-08-03	ET	4126	2	발정 재귀			신선란
63	2011-08-03	ET	1785	1	2012-05-22		○	신선란
64	2011-08-03	ET	4610	1	발정 재귀			신선란
65	2011-08-03	ET	1698	2	2012-05-22	○		신선란
66	2011-08-03	ET	2846	1	2012-05-22	○		신선란
67	2011-08-03	AI	1687	1	발정 재귀			
68	2011-08-10	AI	3147	1	2012-05-29	○		
69	2011-08-10	ET	4216	1	2012-05-29	○		동결란

70	2011-08-17	ET	335	1	2012-05-29	○
71	2011-08-17	ET	1469	2	발정 재귀	
72	2011-08-17	ET	2398	1	2012-06-19	○
73	2011-09-07	AI	78	1	2012-06-19	○
74	2011-09-07	AI	E782	1	2012-06-19	○
75	2011-10-12	ET	1496	2	발정 재귀	
76	2011-10-12	ET	4614	1	발정 재귀	
77	2011-10-19	AI	2347	2	2012-07-31	
78	2011-10-19	AI	1389	2	2012-07-31	
79	2011-10-19	ET	258	1	발정 재귀	
80	2011-10-19	ET	779	1	2012-07-31	
81	2011-10-19	ET	3471	2	발정 재귀	
82	2011-10-19	ET	1826	1	2012-07-31	
83	2011-10-19	ET	245	2	발정 재귀	

요약 (2012년 6월 29일 현재)

수정	두수	수태율	성 비
인공수정:	27두	66.6%	81.25%
		(9 / 27)	(3 / 16)
수정란이식:	56두	58.9%	78.78%
		(23 / 56)	(26 / 33)





제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년도	내용	목표	달성도
1차년도:	* 정자 성 분리 정확도	95% 이상	달성
	* 성 분리 정자의 활력 및 생존율	80% 이상	달성
	* 성감별 된 체내, 외 수정란 생산 및 동결보존		달성
	* 체내, 외 수정란 배반포 발달률	35% 이상	~24%
2차년도:	* 정자 성 분리 초당 분리 속도 향상	2,000정자/sec	달성
	* 성 분리 정자 인공수정 및 수정란 이식	수태율 >60 %	달성
3차년도	성 분리 정자 인공수정 및 수정란 이식 발육 특성 조사 및 유전 능력 검사	암 산자 비율 70%이상	달성 부분달성

지금까지 국내의 여러 연구진이 flowcytometer 를 이용한 가축의 정자 성 분리 시도를 여러 차례 했었지만, 만족할 만한 성과를 얻지 못하였다. 본 연구개발을 통하여 flowcytometer 를 이용한 정자 성 분리 기법이 확립되어, 본 연구 분야의 기술발전에 나름 데로 기여하였다고 사료된다. 본 연구과제 수행을 통해 도출된 자료들이 형질전환 동물의 대량생산을 포함하여 여러 고부가 가치가 있는 가축에게 적용된다면, 장래 국내 축산산업의 발전에 크게 기여할 수 있을 것이며, 나아가 축산농가의 소득증대, 축산산업의 생산성향상에 기여할 것이며, 생명공학 기술향상을 통한 타 분야로의 발전과급효과 또한 기대할 수 있다.

제 5장 연구개발 성과 및 성과 활용계획

제 1절 연구개발 성과

1. 특허 출원

특허 출원				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2010	New Parameter for X- and Y-Chromosome Bearing Sperm with high degree of sperm sorting	손중호	미국	US-PCT 12/676,217
2010	마그네틱 비드를 이용한 정자 성 분리방법	손중호	한국	10-2010-0132896

2. 논문

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2010	Effects of sperm motility on in vitro production of embryo and correlation with mitochondria amount in pig	정기화	손중호	김인철	한국수정란 이식학회지	25(4)	국내	비SCI
2011	Effects of bacterial contamination (<i>Escherichia coli</i>) on extended porcine semen parameters	소경민	김인철	손중호	한국동물 번식학회지	35(4)	국내	비SCI
2011	Optimization of Electrofusion Condition for the Production of Korean Cattle Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos	김세웅	노상호	정연길 김대환	한국동물 번식학회지	35(2)	국내	비SCI

3. 학회 발표 초록

- 가. Sex Determination of Hanwoo embryos derived from IVF by Polymerase Chain Reaction (2009, 한국 수정란 이식학회)
EJ Kwon¹, EJ Choi¹, JH. Whang¹, KH. Kim¹, YG. Jeong², HR Kim³, JH Son¹
- 나. Analysis of mitochondrial function by flowcytometry on elapsed time after liquid preservation in five different boar semen extenders (2010, 수정란이식 학회)
SH Park¹, EJ Choi¹, EJ Kwon¹, KH Chung², IC Kim³, JH Son¹
- 다. Comparison of two different sperm sexing methods (2010, 수정란이식 학회)
EJ Kwon¹, SH Park¹, EJ Choi¹, YG. Jeong², HR Kim³, JH Son¹

라. Sex Determination in bovine embryos derived from Y-chromosome bearing spermatozoa marker beads (2010, 수정란이식 학회)

EJ Kwon¹, SH Park¹, EJ Choi¹, YG. Jeong², HR Kim³, JH Son¹

마. Sperm sexing by magnetic beads: Efficient and reliable new sperm sorting method (2011, 호주 번식학회)

Kwon, EJ¹, SH Park¹, H. Clemente², SJ Sa³, IC Kim³, KH Chung⁴, JH Son¹

바. (2011, 호주 번식학회)

311

EFFECT OF ALPHA-TOCOPHEROL SUPPLEMENTATION ON SPERM CHARACTERISTICS DURING SEMEN CRYOPRESERVATION IN KOREAN NATIVE PIG

I. C. Kim¹, K. M. So¹, M. J. Kim¹, K. H. Cho¹, D. W. Kim¹, J. H. Son², K. H. Chung³, S. J. Sa¹

사. (2011, 호주 번식학회)

376

COMPARISON OF DIFFERENT COMMERCIAL SEMEN EXTENDERS ON SPERM MOTILITY AND MEMBRANE INTEGRITY OF FRESHLY EJACULATED KOREAN NATIVE BOAR SEMEN

S. J. Sa¹, K. M. So¹, M. J. Kim¹, K. H. Cho¹, D. W. Kim¹, J. H. Son², K. H. Chung³, I. C. Kim¹

4. 연구개발결과의 활용방안

가. 기술적 측면

- 국내 실정에 맞는 성 분리 정자 이용 젖소 암 송아지 생산 및 생산비 절감
- 성 분리 정자 이용 우량 젖소 수정란 생산
- 고 부가 가치의 형질전환 동물 생산과 연관된 연구 및 산업분야
- 수정란의 이용효율 향상을 위한 신기술 창출 분야
- 동결 수정란 생산 및 이식기술과 연관된 산업분야
- 확립된 정자 성 분리 기술의 국내,외 학술지 논문발표를 통한 연구 및 산업계 보급
- 미성숙 난자 체외성숙을 통한 수정란 생산 및 동결기술의 연구기술로 활용
- 현장 전문가를 위한 동결보존 수정란의 용해 및 이식기술의 교육
- 특허권 획득 및 산업계로 특허권 이전
- 국내,외 산업계와 정자 성 분리 기술 이용에 대한 공동연구
- 생명과학 및 의학 연구에 기초 자료제공
- 고가의 형질전환동물 생산의 기초 실험 자료 및 효율성 향상에 기여
- 멸종위기나 희귀동물의 유전자원 보존에 기여

나. 경제적 · 산업적 측면

- 국내 축산업 발전 및 소득증대
- 종축 생산 및 개량
- 인공수정 및 수정란 이식 보급률 향상
- 우수 유전자 확보 및 시스템구축

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 정자 성 분리 산업 현황 (유럽)



R&D brief

10

June 1998

Project funded by
from 1992 to 1996



Beef Production:

The development of bovine sexed sperm

- Can I chose the sex of my calves?
- Can I use one of my high breeding value cows as the mother of all my replacements?
- How can I speed up the genetic gains to be made in my herd?



Reproductive advancements for beef and dairy herds

With the help of Meat New Zealand funding, AgResearch has been working towards developing a system whereby beef and dairy farmers could choose the sex of their calves.



The ability of the farmer to pre-select the sex of cattle offspring has enormous

advantages in terms of genetic improvement and production management.

For example, under ideal conditions a beef farmer could breed 80 steers and 20 replacement heifers from their 100 head of cows.

The Research

This project trialed a process called 'sperm sexing', where the populations of X (female) and Y (male) bearing chromosome sperm in a semen sample are separated.

X (female)

Y (male)

How they are separated:

- The sperm population is stained using a fluorescent dye.
- The X chromosome sperm absorb more dye than the Y chromosome sperm.
- The dyed sperm is then passed through a laser beam in a sorter, one by one.
- This gives them a charge, either positive or negative.
- The sperm cells then pass through an electric 'gate' which sorts them into X and Y groups based on their electrical charge.

The dyed X cells have a different charge to the Y cells, because they have a different mass.

Currently, this process is not efficient enough to be used commercially for direct inseminations.

The project achieved an **89% accuracy rate** in sorting X and Y sperm but this was dependent on the types of bulls and ejaculates.

R&D Briefs are summaries of results from meat New Zealand-funded research projects. They are free to meat New Zealand levy payers. Reproduction of this document is welcome although copyright must be acknowledged to the source.

본 내용은 소 정자 성 분리 기술 개발을 위해 Meat New Zealand사로부터 받은 AgResearch 펀드의 (1992~1996) 연구 결과에 대한 요약서 형식의 소 정자 성 분리에 대한 기본 설명서 라고 할 수 있다.

내용을 간추려 보자면, 정자 성 분리 기술의 현주소와 성 분리된 소 정자를 활용했을 때 의 장점에 대해서 기술하고 있다.

성 분리 정자를 활용하여 산자를 분만하여 본 결과 정자 성 분리 정확도는 89%로 보고되었고, 당시 (1996년) 정자 분리 속도가 초당 약 100개로, 분리속도의 향상이 숙제라고 기술 하였습니다 (장비 및 기술의 발달에 힘입어, 2011년도 현재 정자 분리 속도는 초당 최대 2만 5천개 정도까지 가능하다).

성 분리된 정자를 농가에서 활용하였을 때의 장점으로,

1. 농가에서 원하는 성의 산자를 얻기 위해서는 2번의 수정을 해야만 가능하지만 (자연 성비가 50:50임으로), 성 분리 된 정자를 활용할 경우 90%까지 예측이 가능 하다.
2. 성 분리된 정자 활용의 중요한 점으로는, 유전적 개량을 가속화 할 수 있다는 큰 장점이 있다. 이는 고 능력의 아버로부터 성 분리 된 정자를 산유능력이 우수한 고 능력의 어미 소에 인공수정하거나, 수정란을 이식하면 유전적 개량의 속도가 현저하게 빠르기 때문이다.
3. 농가에서는 어미 소를 앞으로 대체할 후보 암 젖소 (미 경산우) 를 매년 준비해야 하는데, 성 분리 된 정자를 활용할 경우 대체 속도를 적절하게 조절할 수 있기 때문에 생산비 절감을 통해 경쟁력을 확보할 수 있다.

본 연구 프로젝트를 통하여 뉴질랜드에서 가축 번식공학의 발달에 많은 기초자료를 제공하는 계기가 되었다. 뉴질랜드에서는 2000년도부터 정자 성 분리 기술을 낙농우 및 육우 산업 발전에 접목하여 가축의 유전적 개량에 많은 노력을 하고 있다.

2. 미국 Sexing Tech 회사의 성 분리 정자 판매 안내책자


Because Your Business Begins at Conception

[home](#) [history](#) [process](#) [semen collection](#) [in vitro fertilization](#) [embryo collection](#) [sales](#) [economic aids](#) [links](#) [contact](#) [testimonials](#)

home / sales

GO

Sales






Sales

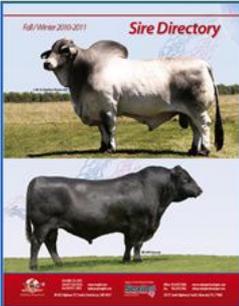
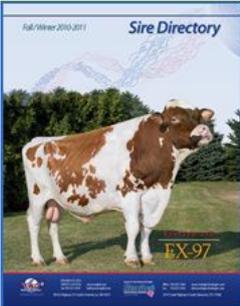
Sexing Technologies is the worldwide leader in Sexed Semen and Embryo production. ST is well known around the globe as one of the top sources for assistance in locating and exporting quality semen, embryos, and live cattle from the United States. Today, embryos are an economical way to export/import the genetics you desire.

ST is certified to send semen to every continent through their multiple facilities. The Headquarters in Navasota, Texas is certified to send semen and embryos to most continents and TWG-ST in Fon du Lac Wisconsin is approved to send semen to China and the European Union as well as any other destination in the world. All our facilities are CSS approved.

ST through the experience of its staff specializes in helping find quality cattle, semen, and embryos for placement in foreign countries. Their multilingual abilities and successful shipments port to port, make Sexing Technologies a truly reliable source for marketing to cattlemen worldwide.

Satisfaction is paramount for both buyers and sellers and ST is dedicated to providing quality genetic improvement throughout the world.

BEEF

<p>Individual Breed</p> <ul style="list-style-type: none"> Gray Brahman Red Brahman Angus Red Angus Red Brangus Simmental Braunvieh Beefmaster Hereford-Wagyu Gyr-Guzerat Bucking AI Recommendations Beef 	<p>Entire Catalog</p> 	<p>Entire Catalog</p> 	<p>Individual Breed</p> <ul style="list-style-type: none"> Holstein Red Holstein Jersey Brown Swiss AI Recommendations Dairy
---	---	--	---

3. 미국 Select Sires 사의 성 분리 정액 판매 안내 책자

Our Best Are Sexed

DEFINE "BEST"...

◆ GENETICS:

~ You don't have to sacrifice genetics for more heifer calves. Count on Select Sires to provide the highest ranking bulls. Whether you are breeding for type, production, health traits or a combination, Select has you covered.

◆ FERTILITY:

~ To minimize the variance in success of our *gender* SELECTed sires, Select Sires closely scrutinizes both the semen quality and field fertility data of conventional semen before a bull is allowed to qualify as a candidate for sex-sorting. Select Sires continually collects conception data from herds using *gender* SELECTed semen to calculate sexed semen fertility deviations and removes bulls from the lineup that perform unacceptably.

◆ OPPORTUNITY:

~ Dairymen who have used Select Sires *gender* SELECTed semen value the opportunities they have - more heifers for sale, replacements and internal expansion and smaller calves from first calf heifers, resulting in easier calvings and lower health costs. The opportunities to garner more profitability by using *gender* SELECTed semen are abundant.



"An added benefit that we see from the use of *gender* SELECTed semen is that our first lactation cows that have heifer calves breed back quickly and come into milk more rapidly. I feel it is because these heifers are calving in with a smaller calf."

- Vern Bussing, Baileysville, Kan.

Code No. & Name	Milk	%F	Fat	%P	Prot.	NMS	Rel.%	SCS	PL	DPR	Type	JUI™	Rel.%	GJPI™	
Jersey															
• 507JE738 LOUIE	+1,233	-0.15	+27	-0.02	+40	+138	94	3.13	-0.4	-1.1	+0.7	-0.13	85	+96	
• 507JE762 FANTOM ^{HB} ✓	+103	+0.05	+14	+0.03	+10	+319	90	2.96	+5.0	+0.8	+1.3	+4.40	82	+105	
• 507JE778 HARVEST	+176	+0.01	+10	+0.03	+12	+9	92	2.98	-1.3	-1.7	+1.3	+2.11	78	+26	
• 507JE821 SPECTACULAR ^{HB} ✓	+142	+0.16	+36	+0.08	+20	+360	88	2.96	+3.4	+0.9	+0.9	+3.44	79	+127	
• 507JE859 RILEY ^{HB} ✓	+374	-0.06	+5	-0.02	+10	+320	88	2.88	+4.6	+1.9	+1.7	+5.30	75	+120	
• 507JE865 KYROS	+916	+0.11	+62	+0.03	+37	+308	83	3.03	+1.0	-1.3	+1.1	+2.05	68	+133	
• 507JE867 GOVERNOR ^{HB} *	-316	+0.12	+7	+0.02	-9	+58	95	3.08	+1.8	+0.7	+1.6	+3.45	88	+11	
• 507JE1000 TBONE	+319	+0.20	+53	+0.09	+28	+343	97	2.98	+2.0	-0.1	+1.6	+3.64	99	+144	
• 536JE3 IMPULS [▼]	+495	+0.18	+57	+0.11	+38	+454	99	3.10	+3.9	+1.4	+0.5	+1.36	99	+173	
Jersey Super Samplers™															
• 507JE1038 VALENTINO	+1,345	-0.10	+40	-0.04	+40	+444	69	2.95	+5.1	-0.7	+2.30	+4.99	61	+185	
• 507JE1044 CHILI-P	+1,131	-0.03	+47	-0.06	+28	+337	69	2.96	+3.3	-0.4	+0.90	+1.66	62	+125	
• 507JE1057 DANDY	+1,387	-0.03	+53	-0.03	+45	+467	58	2.94	+4.3	+0.5	+1.00	+2.03	52	+189	
• 507JE1069 SIXTYNINE	+1,490	-0.09	+48	-0.03	+47	+505	57	2.82	+4.7	+0.1	+0.80	+0.33	51	+186	
Brown Swiss Super Samplers															
• 507BS832 MAGIC	+715	-0.05	+16	+0.00	+25	+401	51	2.78	+5.9	-0.4	+1.00	+1.19	+0.77	46	+155
• 507BS840 GRANDSLAM *	+86	+0.02	+8	+0.00	+2	+236	57	2.89	+3.6	+1.5	+0.70	+0.64	+0.93	52	+62
Ayrshire Super Sampler															
• 507AY91 MADWAX	The first RAMIUS son available in A.I. His dam's lifetime production is over 233,000M, 10,000F and 7,700P. An outcross to add milk and style.														
Guernsey Super Sampler															
• 507GU439 CRUNCH	Elite AARON son from a unique cow family with longevity and components. Expect moderate frames, outstanding udders and correct feet and legs.														
Milking Shorthorn Super Sampler															
• 507MS349 NITRO EXP *	From two All-American dams, he's bred to make the modern kind. He has two Very Good sisters projected to make over 22,000M as two-year-olds.														

* Eligible for semen export to Canada; ^{HB} HerdLife Builder; ^{LC} Below breed average for Service Sire %DBH; ✓ HealthMark; ▼ FeedPRO; * Showcase Selections; TM gender SELECTed, HerdLife Builder, HealthMark, Showcase Selections, Super Sampler and FeedPRO are trademarks of Select Sires Inc.; JPI and JUI are trademarks of the American Jersey Cattle Association; 12-10 USDA/AIC/A/BS/CSBA Genomic Production & Type data; SS938-3M-CM-12 10-PP Product of the USA. Artificial insemination straws of *gender* SELECTed™ semen are for single use artificial insemination of heifers only. Not for resale. U.S. Patent Nos. 5,135,759; 7,208,265; 6,372,422. ^{Sexin} [®] *536JE3 IMPULS semen is produced and supplied by Viking Genetics and is available from Select Sires only in the United States.



JANUARY 2011

Ask your Select Sires representative for all the facts!
Phone (614) 873-4683 Fax (614) 873-5751 www.selectsires.com



MORE HEIFERS, MORE OPPORTUNITIES!

Code No. & Name	Milk	%F	Fat	%P	Prot.	NMS	Rel.%	SCS	PL	DPR	Type	UDC	FLC	Rel.%	SCE	Rel.%	GTPI™
• 507H07173 ROLEX ^{CE HB}	+702	+0.05	+39	+0.03	+29	+237	99	2.95	+0.7	-2.0	+0.58	+0.53	+0.90	96	5	99	+1579
• 507H07466 MOSCOW ^{CE ✓}	+986	-0.14	-2	-0.06	+14	+247	99	2.73	+2.7	+0.8	+1.21	+1.38	+1.21	98	7	99	+1683
• 507H07735 CADET ^{CE ✓}	+909	-0.04	+22	-0.07	+9	+318	96	2.81	+4.2	+0.1	+1.36	+1.64	+0.35	91	7	99	+1768
• 507H07744 BLADE ^{CE}	+1,134	-0.13	+7	-0.10	+6	+27	99	3.05	-0.4	-0.6	+1.75	+1.49	+0.68	96	7	99	+1481
• 507H07762 FLINT ^{CE}	+1,019	-0.05	+23	-0.08	+9	+185	98	2.92	+0.8	-0.7	+1.43	+0.64	+1.81	92	7	98	+1583
• 507H07763 SANA ^{CE}	+1,825	-0.18	+17	-0.07	+36	+266	97	2.83	+1.3	-0.5	+0.59	+0.30	+0.82	91	5	98	+1664
• 507H07838 GLEN ^{CE HB}	+349	+0.05	+25	+0.02	+16	+213	99	2.96	+0.8	-0.3	+1.98	+2.17	+1.86	94	7	99	+1695
• 507H07853 MICHAEL ^{CE ✓}	+78	+0.15	+41	+0.01	+5	+418	94	2.82	+3.5	+2.2	+1.01	+1.11	+0.89	90	6	99	+1802
• 507H07858 GRAND ^{CE DS}	+1,149	-0.13	+8	-0.03	+26	+194	99	3.20	+2.1	+0.2	+1.85	+1.38	+3.06	95	7	99	+1737
• 507H08036 MASTER ^{CE}	+600	+0.00	+21	-0.06	+1	+152	96	2.75	+0.9	-1.2	+2.01	+1.99	+1.38	90	6	99	+1596
• 507H08081 PLANET ^{CE ▼}	+1,782	-0.03	+56	-0.01	+52	+584	93	2.88	+4.5	+0.0	+1.70	+1.53	-0.30	89	6	99	+2065
• 507H08165 MILLION ^{CE DS}	+626	+0.12	+54	+0.00	+18	+391	94	2.87	+2.8	-0.4	+2.35	+2.22	+1.58	90	7	99	+1889
• 507H08190 SANCHEZ [★]	+738	-0.08	+5	-0.02	+18	+98	92	3.01	+0.2	-1.5	+3.27	+2.23	+2.11	89	8	99	+1668
• 507H08221 ALEXANDER [★]	+760	+0.14	+66	+0.00	+23	+330	92	2.88	+1.4	-2.3	+2.37	+1.51	+1.86	89	9	99	+1781
• 507H08351 LUCIUS ^{CE HB}	+436	-0.09	-7	-0.03	+6	+195	95	2.94	+2.3	-0.1	+1.08	+1.86	+2.19	91	7	97	+1590
• 507H08361 DOMINGO ^{CE ✓ ▼}	+1,058	+0.05	+52	-0.01	+28	+572	93	2.68	+4.7	+0.6	+1.12	+0.93	-0.21	88	5	94	+1956
• 507H08398 HUFFIN ^{CE ✓}	+560	+0.00	+21	+0.03	+26	+274	92	2.81	+0.6	+0.4	+1.88	+1.96	+0.66	88	8	94	+1749
• 507H08444 GRAYBIL ^{CE ✓ DS}	+847	-0.03	+24	-0.01	+22	+320	92	2.99	+2.6	+0.6	+1.87	+1.70	+2.12	89	5	99	+1821
• 507H08477 GABOR ^{CE DS}	+1,713	-0.14	+24	-0.07	+32	+341	93	2.85	+2.5	-0.1	+2.32	+1.82	+1.18	90	7	99	+1879
• 507H08530 AUTUMN ^{CE HB ▼}	+584	+0.16	+64	+0.03	+25	+391	96	2.72	+0.4	-0.2	+0.61	+0.61	+2.09	92	6	96	+1738
• 507H08738 SS DEUCE [★]	-60	-0.09	-27	+0.01	+2	+104	99	3.00	+2.4	+1.8	+2.28	+1.77	+2.36	97	8	98	+1656
• 507H08743 DUSK [★]	+125	+0.09	+29	+0.03	+11	+197	89	3.01	+1.1	-0.8	+2.42	+1.76	+1.95	92	9	92	+1670
• 507H08772 GROOVY ^{CE HB ✓ ▼ DS}	+484	+0.09	+42	+0.06	+31	+373	95	2.94	+1.9	+0.2	+1.15	+1.11	+2.13	90	7	86	+1815
• 507H08778 ALLSTAR ^{CE}	+1,099	-0.09	+17	-0.03	+26	+126	92	2.63	-1.8	-1.5	+2.11	+1.63	+2.00	89	7	89	+1602
• 507H08885 EMPHASIS ^{CE DS}	+385	-0.07	-4	-0.03	+4	+264	92	2.66	+2.1	-0.2	+2.54	+3.14	+2.89	89	7	85	+1772
• 507H08914 PERFORM ^{CE ✓}	+464	+0.02	+22	+0.05	+26	+273	98	2.84	+1.5	+0.9	+1.52	+0.65	+2.43	95	7	92	+1751
• 507H08946 ROLAND ^{CE ✓ DS}	+1,512	-0.15	+15	-0.09	+21	+425	92	2.81	+4.5	+1.3	+1.73	+1.56	+1.08	90	7	84	+1900
• 507H09030 RICHMAN ^{CE HB DS}	+940	-0.05	+22	-0.05	+14	+421	91	2.76	+4.3	-0.1	+2.18	+2.64	+1.81	89	7	84	+1901
• 507H09052 MORPHEOUS ^{CE DS}	+167	+0.09	+31	+0.05	+18	+377	91	2.70	+3.4	-0.1	+1.97	+1.38	+1.42	89	7	82	+1853
• 507H09064 PAXTON-RED ^{CE ✓}	+412	+0.04	+25	-0.02	+7	+271	91	2.98	+2.3	+1.1	+1.08	+0.99	+1.95	86	8	83	+1687
• 507H09107 DURABLE ^{CE ✓ DS}	+377	+0.12	+45	-0.03	+3	+419	93	2.58	+3.6	+0.4	+2.23	+1.55	+2.84	90	9	84	+1899
• 507H09118 NEON ^{CE}	+693	+0.02	+31	+0.08	+43	+291	92	2.94	+1.0	-2.0	+1.63	+1.18	+0.93	89	8	84	+1742
• 507H09133 CAMMO ^{CE}	+1,374	-0.11	+20	-0.04	+31	+280	90	3.02	+2.2	-1.0	+2.11	+1.52	+2.06	84	8	83	+1771
• 507H09165 BRAXTON ^{DS ★}	+829	-0.06	+13	-0.04	+14	-46	91	3.00	-1.9	-3.0	+3.84	+2.62	+2.99	86	9	96	+1577
• 507H09176 MINISTER ^{CE HB ✓}	+127	+0.09	+28	+0.03	+12	+316	92	2.83	+2.7	+0.2	+1.01	+0.99	+1.23	90	6	91	+1717
• 507H09222 SHOT ^{CE DS}	+893	+0.10	+60	-0.03	+19	+388	90	2.93	+2.4	-0.6	+2.62	+1.78	+2.09	87	6	87	+1898
Super Samplers™																	
• 507H09893 ATLANTIC [★]	+670	-0.01	+23	+0.02	+24	+309	80	2.75	+1.9	-0.8	+3.42	+2.68	+2.42	75	7	97	+1901
• 507H010000 APPLE-RED [★]	-1,150	+0.22	+13	+0.13	-1	+181	75	2.97	+3.0	-1.2	+2.20	+2.27	+1.74	70	8	93	+1627
• 507H010052 TIME ^{CE}	+257	+0.07	+28	+0.03	+16	+520	81	2.64	+5.1	-0.6	+4.12	+3.75	+3.14	76	5	98	+2156
• 507H010059 ALAN ^{CE}	+1,079	+0.08	+61	+0.04	+43	+547	81	2.69	+3.3	-1.2	+2.96	+1.88	+1.64	76	7	93	+2089
• 507H010176 AL ^{CE}	+1,059	+0.15	+77	+0.03	+38	+620	80	2.76	+3.9	-0.8	+2.54	+2.15	+2.04	75	7	95	+2126
• 507H010506 G W ATWOOD [★]	+515	+0.13	+51	+0.03	+24	+347	80	2.84	+0.9	-1.1	+4.23	+2.95	+3.26	76	8	92	+1977
• 507H010547 SHOTZY-P-RED ^{CE}	+439	-0.01	+13	+0.02	+18	+406	79	2.83	+4.8	+0.5	+1.43	+1.78	+1.68	74	6	72	+1866
• 507H010550 MACGUINNESS ^{CE}	+1,236	+0.08	+66	+0.03	+44	+579	80	2.81	+3.8	-1.7	+3.14	+2.73	+2.52	75	5	73	+2153
• 507H010604 OSMOND ^{CE}	+1,367	+0.03	+57	+0.00	+42	+730	77	2.55	+6.4	+0.0	+2.93	+2.56	+1.46	72	6	70	+2298
• 507H010606 OBSERVER ^{News}	+1,025	+0.04	+47	+0.01	+34	+742	78	2.70	+7.4	+1.9	+2.67	+2.83	+0.97	73	5	73	+2316
• 507H010624 TEMPO ^{CE}	+1,640	+0.01	+62	+0.00	+51	+705	78	2.69	+5.9	-0.5	+2.60	+2.23	+0.88	72	6	71	+2239
• 507H010647 AARON-RED ^{CE}	+180	+0.09	+31	+0.07	+23	+525	77	2.99	+5.4	+2.2	+1.44	+1.83	+1.32	72	6	73	+2008
• 507H010819 CAMELOT ^{CE}	+990	+0.07	+54	+0.01	+31	+646	78	2.65	+6.4	-0.4	+2.76	+2.16	+1.70	72	7	71	+2183

• Eligible for semen export to Canada; ^{HB}Herd/He Builder; ^{CE}below breed average for Service Sire & DRH; [✓]HealthMark; [▼]FeedPRO; [★]Showcase Selection; ^{DS}DIAMOND SELECTION; TMgender SELECTed; TMHerd/He Builder; TMHealthMark; TMShowcase Selection; TMSuper Sampler; TMFeedPRO and TMDIAMOND SELECTION are trademarks of Select Sires Inc.; TPI is a trademark of Holstein Association USA; 12-10 USDA/HA Genomic Production & Type data; SS938-3M-GM-1210-PP Product of the USA; Artificial Insemination straws of gender SELECTed™ semen are for single use artificial insemination of heifers only. Not for resale. U.S. Patent Nos. 5,135,759; 7,208,265; 6,372,422. **Sexin**



JANUARY 2011

Ask your Select Sires representative for all the facts!

Phone (614) 873-4683 Fax (614) 873-5751 www.selectsires.com



제 7장 참고문헌

- Johnson LA. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art. *Anim Reprod Sci.* 60-61:93-107.
- Garner DL, Seidel Jr GE. 2003. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Can J Anim Sci.* 83:375-384.
- Mann T, Lutwak-Mann C. 1981. Male reproductive function and semen. Heidelberg, New York: Berlin, Springer-Verlag.
- Pinkel D, Lake S, Gledhill BL, Vandilla MA, Stephenson D, Watchmaker G. 1982. High resolution DNA content measurement of mammalian sperm. *Cytometry.* 3:1-9.
- Otto FJ, Hacker U, Zante J, Schumann J, Gohde W, Meistrich ML. 1979. Flowcytometry of human sperm. *Histochemistry.* 62:249-254.
- Gledhill BL, Pinkel D, Garner DL, Van Dilla MA. 1982. Identifying X- and Y-chromosome-bearing sperm by DNA content: retrospective perspective and prospective opinion. In Amann RP, Seidel GE, editors for sexing mammalian sperm. Boulder CO: Colorado Associated University Press. p.177-191.
- Johnson LA, Flook JP, Look MV, Pinkel D. 1987. Flow sorting X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res.* 16:1-9
- Johnson LA, Flook JP, Look MV, 1987. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res.* 17:203-212.
- Johnson LA. 1988. Flow sorting of intact X and Y chromosome bearing mammalian spermatozoa. *Cytometry (Suppl).* 2:66 (abstract)
- Morrell JM, Dresser DW. 1989. Offspring from inseminations with mammalian sperm cytometry. *Mutat Res.* 224:177-183.
- Morrell JM, Keller KD, Noakes DE, Mackenzie NM. 1988. Sexing of sperm by flow cytometry. *Vet Rec.* 122:322-324.
- Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. 1989. Sex preselection in ravnits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol reprod.* 41:199-203.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 **생명산업기술개발** 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 **생명산업기술개발** 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.