

# 유세포분석기를 이용한 소 정자의 성판별 방법과 그 이용

김 현 종 박사

축산연구소 가축유전자시험장



# 유세포분석기를 이용한 소 정자의 성판별 방법과 그 이용

김 현 종 박사

축산연구소 가축유전자원시험장

## 1. 서 론

수천 년 동안 축주는 자신의 가축의 새끼의 성별을 원하는 대로 선택하려는 욕구를 가져왔다. 가축의 성을 결정하는 것은 암컷의 난자가 아닌 수컷의 정자가 결정하게 되는데, X 염색체를 보유한 정자가 X 염색체를 가진 난자와 수정이 일어나면 XX 염색체를 보유하여 암컷이고 되고, Y 염색체를 보유한 정자가 X 염색체를 가진 난자와 수정이 되면 XY 염색체를 보유하여 수컷이 되게 된다. 따라서 X 염색체를 보유한 정자와 Y 염색체를 보유한 정자를 분리하여 원하는 성으로 수정시키면 원하는 성의 새끼가 태어나게 되고, 이를 위해 1970년대부터 전자기를 이용하거나, 칼럼을 이용하거나, 정자운동성의 차이, 중량, 항체 등을 이용하여 다양한 방법으로 성을 분리하려 하였으나, 실용적인 방법이 확보되지 못했다.

그러나 1990년대에 들어서면서 USDA ARS 소속의 Johnson 박사가 개발한 X와 Y 정자의 미묘한 염색체 차이를 이용하여 염색체에 결합하여 발광하는 Hoechst 33342라는 형광물질을 정자의 염색체에 부착시켜 형광 차이를 유세포분석기를 통해 분리함으로써 90% 이상의 성공률로 X와 Y 정자를 분리하게 되었다(Beltsville sperm sexing technology). 태어난 새끼를 보면 X 염색체로 분리된 정자를 이용했을 때 성공률이 87.8%인데 반해, Y 염색체로 분리된 정자를 이용하면 성공률이 92.1%였다. 그러나 염색체 형광의 차이는 3~5% 정도 미미한 차이로, 축종에 따라, 그리고 형광을 감지할 때 정자의 방향에 따라 이 작은 차이를 구분하는 것이 상당히 어려운데, 이러한 차이를 성공적으로 감지하기 위해서는 많은 정자들이 감지기에 한 방향으로 재배치되어야 높은 효율로 성분리가 가능하다. 이 기술은 특허 출원되어 콜로라도 주립대학을 통해 XY Inc.에 재실시권이 주어졌다. 그리고 2000년 영국에서 소의 정자 성분리를 상업화하였으며, 유사한 상업화 과정이 전 세계적으로 진행되고 있다.

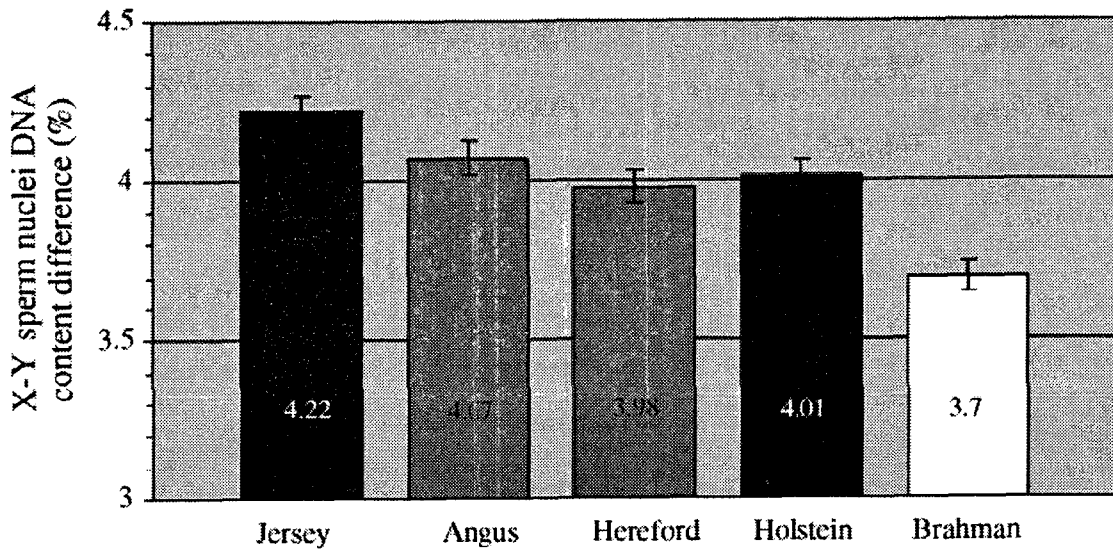
그러나 이러한 FACS를 이용한 정자 성분리에 장애가 있는데, 이는 성분리된 정자의 수정율이 낮아지고, 동결 후 생존성이 떨어지며, 원정액에 비해 성분리되는 정자수가 줄어든다는 점이다. 이러한 문제점은 수정율과 분할율, 배반포 발달율, 임신율의 저하와 정자의 부분적 침체반응, 수컷의 개체 차이 등과 관련이 있다. 그러나 최근 유세포 분석기의 노즐을 교정하여 과거 시간당 35만개의 정자를 분리했다면 최근에는 시간당 각 성별로 5~6백만개의 정자를 분리할 수 있게 되

었다. 이러한 분리속도는 앞으로 더욱 기술개발로 빨라질 것으로 기대된다(Wheeler 등, 2006).

## 2. 정자 성분리에 영향을 미치는 요인들

정자 성분리를 위하여 일반적인 직교의 유세포분석기를 변경하게 되는데, 레이저 빔에 0도의 전면 형광을 감지하는 이차 감지기를 추가하고, 썬기형 주입튜브나 경사진 니들로 원하는 방향으로 정자의 방향을 교정하는 비율이 20~40%를 얻었으며, 이에 따라 이들 위치 교정이 된 정자들에서 X와 Y 정자의 염색체 함량에 따라 정자의 염색체 성별로 분리해 내게 되었다.

















축종 및 품종 간에 X와 Y염색체의 함량 차이가 존재하는데, 이는 Y염색체의 크기가 다르기 때문에 기인하는 걸로 보인다. 저어지는 홀스타인이나 헤어포드보다 더 큰 X-Y간의 차이를 가진 것으로 나타났다.



Garner (2006), Theriogenology 65:943-957.

포유동물 정자간의 가장 중요한 차이는 정자머리의 모양이다. 대부분 축화된 포유동물은 평편하고 계란 형태의 두부를 가지고 있다. X와 Y 염색체를 가지고 있는 정자들 간의 DNA 함량 차이를 이용하는 데는 상대적인 DNA 차이뿐만 아니라 이들 배우체들의 염색체를 측정하는 시점에 정자두부의 방향도 영향을 미치게 된다. 평편하고 계란 형태의 두부는 정자분리기에서 쉽게 방향을 일방적으로 향하게 하기 쉽다. 이렇게 하면 실제 성별간의 DNA 함량 차이에 따른 분리가 가능하게 된다. 수소의 저의 두부는  $34.5 \mu\text{m}^2$ 와 X-Y 염색체 함량 차이는 3.8%로 정자 성분리 인덱스는 131이 된다. 소의 정자 성분리가 가장 성공적인 것은 이러한 이유도 하나의 요인이 될 것이다. 사람 정자의 성분리는 소나 돼지에 비해 거의 4배 정도 어려운 것으로 나타난다. 그리고 중간에 형광염색 Hoechst 33342에 대한 세포내 흡수율도 적지만 차이를 보인다. 그 외에도 레이저 노출에 대한 정자의

Dimensions and profiles of sperm heads and flow cytometric sorting indices for some domestic mammals and man\*

Dimension	Bull	Boar	Ram	Rabbit	Cat	Dog	Horse	Man
Length ( $\mu\text{m}$ )	9.1	9.0	8.1	7.7	7.7	7.0	6.5	4.6
Head sagittal section								
Width ( $\mu\text{m}$ )	4.7	5.0	4.0	4.5	3.2	3.5	3.4	3.2
Head profile								
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	34.5	37.5	26.6	28.0	19.0	20.9	15.2	10.8
X-Y difference (%)	3.8	3.6	4.2	3.0	4.2	3.9	3.9	2.8
Sorting index <sup>b</sup>	131	115	112	84	80	82	59	31

Garner (2006), Theriogenology 65:943-957.

민감도, 희석, 고압력 (40~50 psi), 배양개조성의 변경에 대한 내성, 개체 차이 등도 영향을 미친다.

죽은 정자나 손상된 정자는 Hoechst 33342로 염색된 집단을 분석하기 전에 세포막 불투과성 형광염색인 propidium iodide (PI)로 먼저 확인하여 제거하게 된다. 죽은 정자나 세포막이 손상된 정자는 PI가 투과되어 PI의 형광을 발광하기 때문에 제거가 가능하다. PI를 대체할 식이 염색인 FD&C#40을 쓰기도 하는데, 이는 Hoechst 33342의 형광을 억제하는 비발암성 물질이다. 소 정자의 성분리는 정자 분리에 적합한 정자를 일방향으로 돌려주는 노즐의 개발로 상업화가 가능해졌는데, SX MoFlo 시스템(Dako Cytomation)의 Cytonozzle이다. 이 노즐을 이용하면 정자를 원하는 방향으로 돌려주는 비율이 썬기형 주입 튜브나 경사진 니들의 교정 비율이 20~40%인데 비해, 이 노즐로 인해 70% 이상으로 높아져, 높은 압력인 40~50psi에서 초당 2만개의 정자를 선별할 수 있게 되며, 이때 순도는 85% 이상이다. 성분리 과정에 투입된 정자의 1/3만이 성분리가 이루어지며, 나머지는 정확한 분리가 안 되어 폐기되게 된다. 따라서 시간당 2천만개의 정자를 성분리하여, 2백만개의 생존정자를 스트로에 봉입한다면 시간당 10개의 스트로를 생산할 수 있다

정자 성분리가 제대로 되었는지 확인하는 방법으로 FISH와 재분석을 하는 방법이 있다.

### 3. 성분리 정자를 이용한 활용

핀란드의 헬싱키 대학 Andersson팀(2006)에서 영국에서 상업적으로 판매되고 있는 성감별된 정액을 이용하여 157두에 인공수정을 실시하여 일반 인공수정 149두와 비교하였다. 성감별된 정액은 스트로당 2백만개의 정자를 넣어 판매하고 있는데, 이를 배란 직전의 난소가 있는 자궁각에

인공수정을 실시하여 20%의 분만율을 얻었다. 원하는 암컷의 생산 성공률은 82%였으며, 모두 정상이었다. 반면 15백만개의 정자가 든 일반 스트로를 이용하여 인공수정한 경우에는 자궁체에 실시하여 45%의 분만율을 얻었으며, 암컷 비율은 49%였다.

성감별된 정액을 인공수정에 사용하는 방법 이외에 활용할 수 있는 방법이 수정란을 만들어 수정란이식을 실시하는 방법이 될 것이다. Lu 등 (1999)은 성감별된 정자를 이용하여 체외수정을 실시하였을 때 배반포 발달율을 비교한 결과, 성감별하지 않은 정액이 성감별한 정액에 비해 분할율과 배반포 발달율이 유의적으로 높은 것으로 보고하였다.

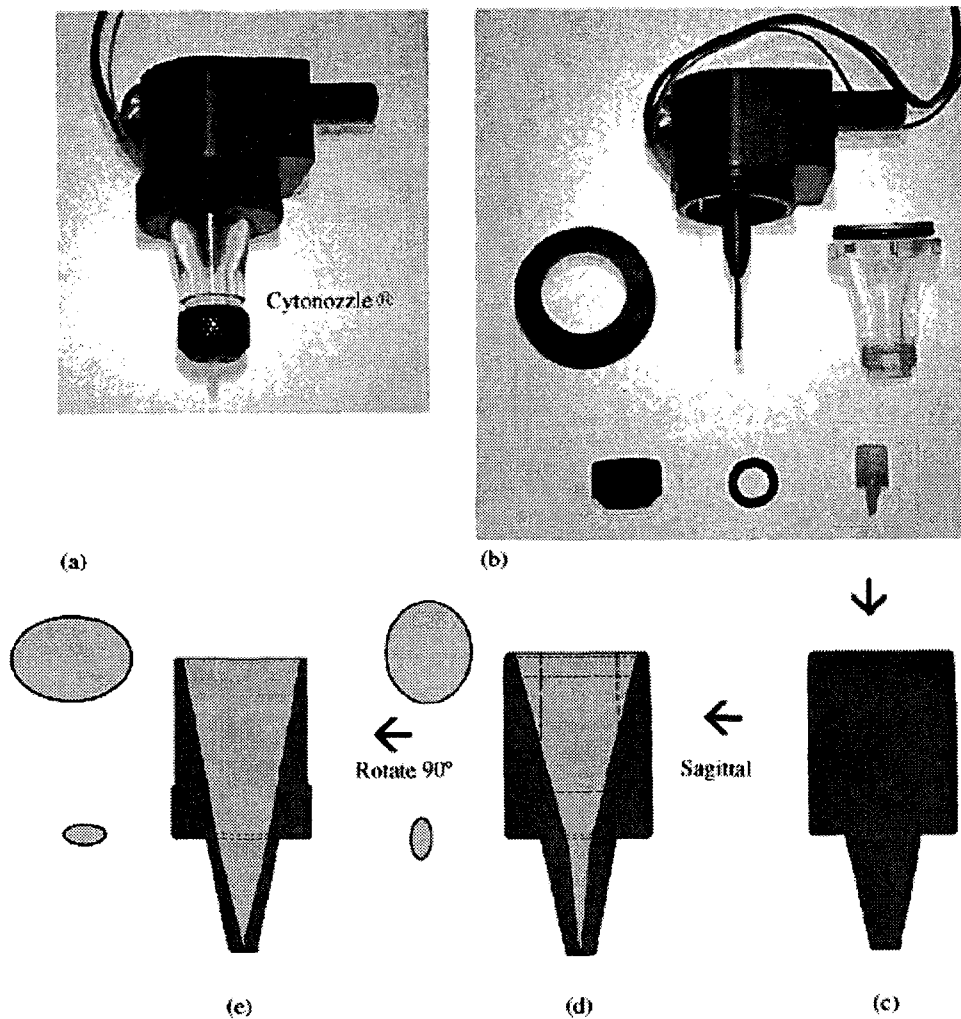


Illustration of an assembled Cytonozzle<sup>36</sup> (a); a disassembled nozzle showing the flow chamber, tapered injection needle and the ceramic tip [surrounded by dotted lines] (b); a profile of the ceramic tip (c); sagittal section of the tip showing the narrowest elliptical orienting configuration [shaded cross sections of the tip interior are shown on the immediate left of the tip] (d); and a sagittal section after rotation of the tip 90° the illustrate the widest portion of the elliptical internal bore of the tip [shaded cross sections of the tip interior are shown on the immediate left of the tip] (e).

Garner (2006), Theriogenology 65:943-957.

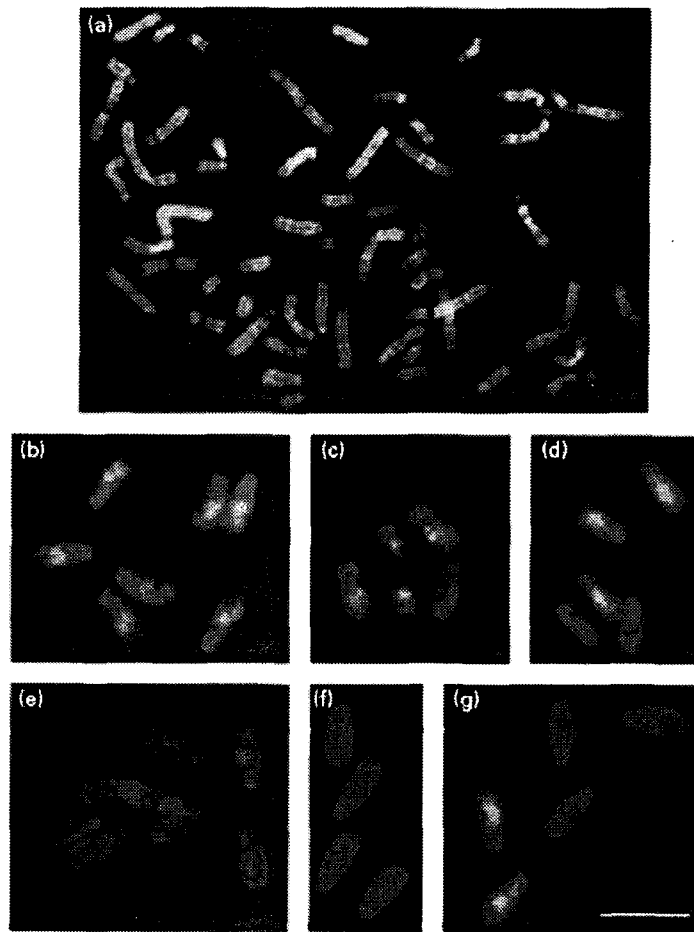


Fig. 2. (a) X-Y paints hybridized to a bovine metaphase. X-Y paints hybridized to three X-sorted samples indicating proportions of (b) 90, (c) 75 and (d) 50%. X-Y paints hybridized to three Y-sorted samples indicating proportions of (e) 90, (f) 90 and (g) 50%. Scale bar represents 10  $\mu$ m.

Table 1. X- and Y-labelling of bovine spermatozoa sorted by flow cytometry

Sample	Reanalysis		X-Y paint set (%)				Number of spermatozoa counted
	X	Y	X	Y	Unlabelled	Double-labelled	
Day 1							
1	8	92	3	89	3	–	112
2	50	50	46	50	4	–	164
3	87	13	76	19	5	–	139
4	50	50	47	47	6	–	167
5	91	9	85	5	10	–	87
6	18	82	12	82	4	2	74
Day 2							
1	5	95	3	93	4	–	169
2*	91	9	97	2	1	–	110
3	79	21	74	24	2	–	116
4	20	80	16	78	1	3	116

\*Significant difference compared with values obtained with X-Y paint analysis ( $P < 0.05$ ).

Rens *et al.* (2001), *Reproduction* 121:541-546.

IVF rates of sexed sperm

Sperm	No. of oocytes	% of cleaved	% of blastocysts
Sexed-fresh	792	66a	16a
Unsexed-fresh	721	76b	24b
Sexed-frozen	554	71	18a
Unsexed-frozen	566	75	25b

Lu *et al.* (1999), *Theriogenology* 52:1393;  $P < 0.05$

이러한 분할율과 배반포 발달율은 수컷의 개체 차이에 따라 변이가 큰 것으로 알려져 있는데, 14%에서 43%까지 차이를 보였다(Campos, 2003).

Bull effects on IVF rates with sexed sperm(% cleavage/% blastocysts)

Bull A	B	C	D	E	F
56/18	35/14	85/43	83/34	72/27	85/29

Campos (2003), *Theriogenology* 59:506.

성감별된 정자를 이용하여 태어난 새끼는 일반 새끼와 차이가 없는 것으로 보고되었다(Tubman 등, 2004).

Calving results of sexed sperm

Sperm	N	Gestation length (d)	Neonatal death (%)	Birth weight(kg)	Live at weaning(%)
Sexed	574	279	3.9	34.3	92
Control	385	279	5.9	34.1	88.9

Tubman *et al.* (2004), *J Anim Sci* 82:1029.

인공수정을 실시할 때 분리되는 정자의 수가 제한적이어서 일반적인 인공수정에 사용하는 정자수가 2천만개라면 성감별된 정자를 이용한 인공수정에는 2백만개를 사용함으로써 정자의 수가 적어 수태율이 떨어지는 면이 있으나, 성감별되지 않은 정자를 2백만개 수준으로 맞추어 인공수정해도 성감별된 정자보다 높은 수태율을 보여 정자수 때문에 수태율이 낮아지는 것만은 아닌 것



으로 추정된다. 인공수정 이외에 체외수정란을 생산하여 수정란이식을 하거나, 공란우에 과배란 처리하여 인공수정 후 채란하여 수란우에 수정란이식을 실시할 때는 산자수 당 성감별된 정액의 가격이 상대적으로 저렴해져 유리한 것으로 사료되며, 난자세포질내 정자 미세주입법(intracytoplasmic sperm injection; ICSI)을 이용한다면 더욱 저렴한 성감별 수정란을 생산할 수 있을 것이다. 그러나 현재의 유세포분석기를 통한 성감별은 아직까지는 성분리과정에서 정자의 생존성의 저하에 따른 낮은 수태율과 높은 비용, 시간당 분리가능한 정자수가 적어 앞으로의 상업화에 더욱 개선이 필요한 상태이다.

#### 4. 성 분리된 정자의 경제성

현재 한우 송아지 암컷 280만원, 수컷 230만원 정도로 성별에 따라 50만원의 가격 차이가 발생한다. 현재의 가격 차이에서 원하는 성으로 산자를 얻는다면 어느 정도의 추가 비용으로 성감별된 정자를 활용하게 될까?

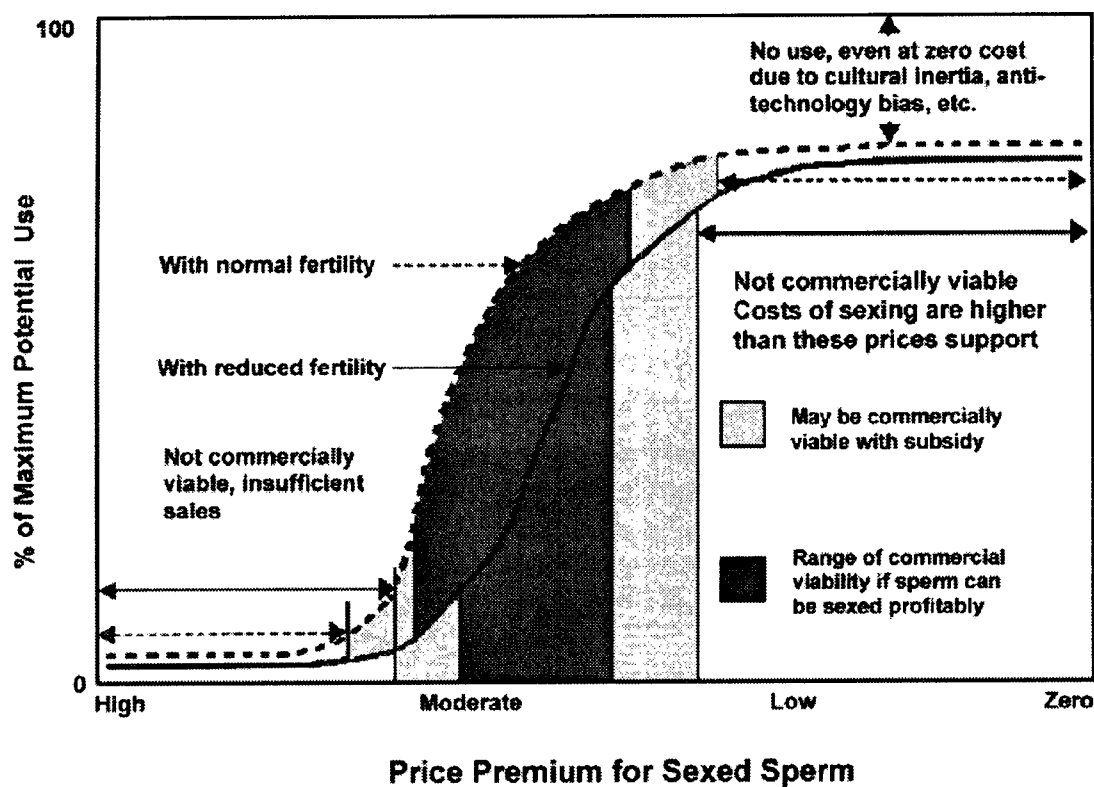
Seidel (2003)에 의하면 유세포분석기의 가격이 3만 달러 이상이며, 낮아진 수태율, 고가 장비의 비용, 숙련된 기술자의 인건비, 라이선스 비용과 로열티 등 지적 재산의 비용을 포함해서 양축가가 대가를 지불하고도 이익이 발생할 때 상업화가 가능할 것으로 보고 있다. 대부분의 경제성 분석에 의하면 성감별된 정액은 일반정액보다 스트로당 10~50달러의 추가 비용을 지불해야 할 것 같다. 그러나 종축이거나 형질전환 가축, 멸종위기의 동물로 원하는 성이 절실한 분야 등 적소에 응용하는 분야에서는 더 높은 가격의 성감별된 정액도 문제가 되지 않을 것이다.

성분리된 정자의 활용은 정자의 수태율 및 가격과 높은 의존성을 가진다. 정상적인 수태율인 경우와 낮은 수태율일 때에 따라 달라지는데, 성감별된 정자의 추가가격이 적으면 성감별 정자의 사용이 증가하고, 성감별된 정자의 추가가격이 증가하면 사용이 줄어들게 된다. 반면, 수태율이 정상적이면 사용되는 가격범위가 넓으나, 수태율이 낮다면 좁은 가격범위에서 사용이 가능할 것이다.

이들 성 분리된 정액은 다양한 범위에서 사용될 수 있는데, 인간의 성 연관 질병을 통제하는 용도나 가족의 성균형을 맞추는데 사용되거나, 축산에서 활용하거나, 동반동물 분야, 생명공학분야, 경마용 말이나 사슴의 녹용 생산, 멸종동물의 복원 등의 목적에 활용이 가능할 것이다.

#### 5. 맺음말

현재의 방법으로 생산된 성 분리된 정자는 아직까지는 불완전한 상태이다. 불완전한 부분은 낮은 수태율, 높은 비용, 90% 가량의 정확도 등이 될 것이다. 이러한 불완전한 부분이 줄어들면 상업화는 증가할 것이고, 하나의 성이 다른 성보다 상당히 높은 가치를 가진다면 좀더 널리 사용될 것이다.



Seidel Jr. (2003), Anim Reprod Sci 79:145-156.

Assumptions for cost analysis (Table 2) to produce 2-week-old calves by inseminating virgin heifers with sexed sperm

1. No estrus synchronization will be conducted: estrus detection rate is 70% and there will be 7% embryonic death between days 21 and 60 post-AI for control semen and 9% for sexed sperm [12], with the net result of an average of 33 days between repeat AI for controls and 34 days for sexed sperm. Possibly this slight, non-statistically significant increase in embryonic death with sexed sperm is not real, but it is the best estimate available.
2. Costs per AI for: unsexed semen, labor for estrus detection and sorting animals and AI, facilities, and AI supplies are US\$ 30.
3. Pregnancy rate at 2 months post-AI for heifers will average 60% for unsexed semen and 54% for sexed sperm (or 40% for unsexed semen and 36% for sexed sperm), i.e. the sexed sperm pregnancy rate is 90% of unsexed semen. Abortion rates after 2 months will be similar for sexed and unsexed sperm.
4. 2% of heifers will be sterile, so they will be sold for beef if not pregnant after 5-6 attempts at AI.
5. 2% of bred heifers will abort between 2 and 8 months of gestation, 1% will die, 1% will calve prematurely. 10% (7% female; 13% male of those pregnant at 2 months) will have dead calves at or within 24 h of birth, or calves will die by 2 weeks of age, resulting in 86 healthy 2-week-old calves per 100 heifers pregnant at 2 months post-AI (84 calves per 100 initial heifers; 87% for female and 81% for male calves).
6. Costs of feed, care, capital, etc. are US\$ 2 per day per yearling heifer.
7. Extra costs for sexed sperm, and extra costs of feed due to lower pregnancy rates with sexed sperm will require using this capital for about 1 year between when these costs are incurred and sexed calves are produced. The cost of this capital is assumed to be 8%.
8. Accuracy of sexing is 90%; natural sex ratio is 51% males.
9. Bull calves are worth US\$ 80; heifer calves are worth US\$ 180, 280 or 380.

What can one afford to pay extra, per dose of sexed sperm, when heifer calves are worth US\$ 100–300 more than bull calves? (other assumptions in Table 1)

	High pregnancy rate		Low pregnancy rate			
	60% (unsexed)	54% (sexed)	40% (unsexed)	36% (sexed)		
1. No. of AI needed to get 98% pregnant <sup>a</sup>	163	182	247	274		
2. Extra costs of sexed sperm program due to extra AI <sup>b</sup>	19 AI × US\$ 30 = US\$ 570		27 AI × US\$ 30 = US\$ 810			
3. Extra costs of sexed sperm program due to extra feed (33 days vs. 34 days between AI) <sup>c</sup>	19 × 34 days × US\$ 2 + 163 × 1 day × US\$ 2 = US\$ 1618		27 × 34 days × US\$ 2 + 247 × 1 day × US\$ 2 = US\$ 2330			
4. No. of heifer calves born (of 94) <sup>d</sup>	46.1	84.6	46.1	84.6		
5. No. of heifer calves at 2 weeks <sup>e</sup>	42.6	78.3	42.6	78.3		
6. No. of extra heifers with sexed sperm <sup>f</sup>		35.7		35.7		
7. No. of heifers at 2 weeks <sup>g</sup>	41.3	8.1	41.3	8.1		
8. Extra cost of sexed sperm program other than a premium for sexed sperm (+18% capital costs) <sup>h</sup>		US\$ 2363		US\$ 3391		
9. Above cost/extra heifer <sup>i</sup>		US\$ 66.19		US\$ 94.99		
10. Doses of sexed semen purchased/extra heifer <sup>j</sup>		5.10		7.68		
	Break-even costs in US\$ of sexed sperm (C = US\$ 80)					
	C = US\$ 180	US\$ 280	US\$ 380	US\$ 180	US\$ 280	US\$ 380
11. Increased value of calf crop due to sexed sperm <sup>k</sup>	3770	7340	10973	3770	7340	10973
12. Increased value minus extra cost <sup>l</sup>	1407	4977	8610	379	3949	7582
13. Break-even value for extra cost/dose of sexed sperm (+18% capital cost) <sup>m</sup>	7.11	25.16	43.52	1.27	13.26	25.46

Seidel Jr. (2003), *Theriogenology* 59:585-598.

## 참고문헌

- Andersson M, Taponen J, Kommeri M and Dalbom M. 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reprod. Dom. Anim.*, 41:95-97.
- Campos-Chillon LF and de la Torre JF. 2003. Effect of concentration of sexed bovine sperm sorted at 40 and 50 psi on developmental capacity of *in vitro* produced embryos. *Theriogenology*, 59:506.
- Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, 65:943-957.
- Lu LII, Gran DG and Seidel Jr. GE. 1999. *In vitro* fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, 52:1393-1405.
- Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, de Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM and O'Brien JK. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim. Reprod. Sci.*, 82:79-95.
- Rens W, Yang F, Welch G, Revell S, O'Brien PCM, Solanky N, Johnson LA and Ferguson Smith MA. 2001. An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. *Reproduction*, 121:541-546.
- Seidel Jr. GE. 2003. Sexing mammalian sperm-intertwining of commerce, technology and biology. *Anim. Reprod. Sci.*, 79:145-156.
- Seidel Jr. GE. 2003. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology*, 59:585-598.
- Suh TK, Schenk JL and Seidel Jr. GE. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*, 64:1035-1048.

- Tubman LM, Brink Z, Suh TK and Seidel Jr. GE. 2004. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J. Anim. Sci.*, 82:1029-1036.
- Wheeler MB, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, VanEtten T, Malusky S and Beebe DJ. 2006. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. *Theriogenology*, 65:219-227.