

## 백한우의 성판별 정액을 이용한 수태율 추정에 관한 연구

김성우<sup>†</sup> · 최진석 · 최창용 · 김동교 · 고응규 · 소충실 · 성환후

농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터

## Studies on the Estimation of Pregnancy Rate of White *Hanwoo* (Albino Korean Native Cattle) with Sexed Semen

Sung Woo Kim<sup>†</sup>, Jinseok Choi, Changyoung Choe, Dongkyo Kim, Yeoung-Gyu Ko, Chungsil So and Hwan-Hoo Seong

Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

### ABSTRACT

The purpose of this study is to produce wanted sex progeny of genetically confined White *Hanwoo* (albinism) with preselected sex sperm. One bull of White *Hanwoo* was chosen for semen donor and X sperm was sorted by MoFlo XDP cell sorter. To compare the pregnancy and birth rates, KPN straw was used as control, total number of unsorted sperm was  $20 \times 10^6$ /straw. Sexed X frozen semen with  $2 \times 10^6$  cells or  $4 \times 10^6$  cells per straw were in seminated twice on *Hanwoo* heifers. The abnormality of the sexed X semen was  $24.9 \pm 7.31\%$  and distal reflex abnormality of mid piece was significantly ( $p < 0.05$ ) higher (11.7%) compared with that of KPN 768 (5.6%). There were no differences on the pregnancy and birth rates between  $2 \times 10^6$  cells or  $4 \times 10^6$  cells of X-sperm but KPN semen showed significant differences ( $p < 0.05$ ). The pregnancy rates of KPN 768,  $2 \times 10^6$  cells and  $4 \times 10^6$  cells X-sperm of White *Hanwoo* cattle were 85.0%, 26.3% and 50%. The birth rates were 80.0%, 15.8% and 21.4%, respectively. The female offspring rates of KPN 768,  $2 \times 10^6$  cells and  $4 \times 10^6$  cells X-sperm of White *Hanwoo* cattle were 43.8%, 100% and 100% ( $p < 0.05$ ). These results indicated that sex sorted White *Hanwoo* could be used for the production of wanted progeny with  $2 \times 10^6$  cells/straw for AI. To increase the efficiency of calf production, the sperm number of sex sorted semen will be optimized for sex selection of White *Hanwoo* progeny.

(Key words: Albino Korea native cattle, sexed semen, AI)

### 서 론

포유류에서 원하는 성을 가진 개체를 후대의 유전자원으로 생산하는 방법은 가장 효율적이고 계획적이면서 실질적인 방법으로 수행되어야 한다. 여기에는 2가지 방법이 존재하는데, 첫째, 발생 중인 배아의 성을 착상 전에 판별하는 방법과 둘째, 수정이 이루어지기 전 성을 결정하는 정자를 분리하여 이용하는 방법이다. 성판별 연구 방법은 기술적 차이에 따라 손상적인 방법과 비손상적인 방법으로 나누어 설명할 수 있는데, 손상적인 방법은 주로 착상 전 배아에서 세포 생검을 실시하고, 그 유전자를 추출하여 성 특이적 유전자가 존재하는가를 알아내는 기법이다. 예를 들면, 가장 널리 알려진 PCR 기법과 세포 내 핵의 DNA에 탐침자를 결합시키는 형광탐침 기법(FISH, fluorescence *in situ* hybridization) 그리고 수정란의

일부 영양막세포(trophoectoderm)을 떼어 내어 등온증폭반응(LAMP, loopmediated isothermal amplification)을 실시하는 방법 등으로 살펴볼 수 있다. 이러한 방법은 세포 생검이 반드시 필요하게 되고, 발생학적으로 가장 민감한 시기인 착상 전 배아에게 물리적 손상을 주어 발생하는 과정에 손상을 줄 수 있어 일반적인 수정란을 이식하는 것에 비하여 수태율과 출산율이 낮은 것으로 보고되었다(Shea, 1999; Li 등, 2007). 반면, 수정란에 손상을 주지 않고 원하는 성을 가진 개체를 확보하는 방법은 수정란의 성을 결정하는 정자를 미리 선별하거나 선택하는 방법인데, 정자에서 성에 따라 발현도가 차이가 나는 단백질을 탐색하여 면역학적 차이에 의하여 구별하는 방법(HY 항원 검출법, histocompatibility Y antigen detection)과 X 염색체가 Y 염색체보다 양적으로 더 많은 유전자를 가지고 있는 점에 착안하여 정자 DNA 함량을 형광시약으로 분

\* 본 연구는 농촌진흥청의 『최소가축 생식세포의 보존이용기술개발 세부과제(PJ00863201)』의 지원에 의하여 수행되었습니다.

<sup>†</sup> Correspondence : sungwoo@korea.kr

석하여 정자를 직접 분리하는 기법으로 설명할 수 있다. 비손상적 방법으로 조직적합성 Y 항원을 검출하는 방법은 1980년대 초부터 연구되었으나, 성비 조절에 대한 기능성 단백질 구조에 대한 해석과 논의가 다양하며, 원하는 성을 가진 후대생산율이 70~85% 정도로 상대적으로 낮은 편이다. 그러나 유세포 분리기(FACS, fluorescence activated cell sorter)를 활용한 DNA 정량기법은 지금까지 알려진 성 조절 후대생산율이 높아 그 성공률이 90% 이상으로 보고되고 있다. FACS로 정자를 분리하는 방법은 인공수정(AI, artificial insemination), 체외수정란 생산(IVFP, *in vitro* fertilized embryo production), 세포질 내 정자주입법(ICSI, intracytoplasmic sperm injection)과 과배란 처리에 의한 수정란이식(ET, embryo transfer) 등에 활용될 수 있어, 산업화에 성공한 기술로 평가 받고 있다. 이 기술의 장점은 고순도의 성분리 정자를 얻을 수 있어 원하는 성을 가진 후대생산성공률이 높으며, 품종에 상관없이 다양한 품종의 포유류 정자의 성을 탐지하고 분리할 수 있는 장점이 있다. 그러나 원정액에 대한 동결 정액의 생산 효율이 떨어지며, 비 분리 정자로 소실되어 버려지는 정자의 비율도 품종간에 따라 서로 차이가 많이 나는 단점이 있으며, 낮은 정자 농도에 의하여 체외수정 시에도 발생률이 낮고, 처녀우를 대상으로 주로 인공수정을 실시해야하는 단점이 보고되어 있다. 최근 이러한 유세포 분리 방법을 개선하여 단점이 극복된 기술이 소개되었는데, 이 기술은 수직으로 낙하하는 미세줄기에 레이저를 조사하고 정자가 함유된 미세소체를 분리하는 기술이 아니라, 수평으로 이동하는 미세 물줄기에서 정자를 분석하고 강한 에너지를 가진 레이저를 조사하여 원하지 않는 정자를 불활성화시키는 기술로 대체하였다. Microbix Biosystem Inc.에서 개발된 이 기술은 현재 산업화 연구를 진행하고 있으며, 물리적으로 세포를 직접 분리를 하지 않는 장점이 있어 정자의 성 분리의 속도가 빠르고, 처리할 수 있는 원 정액의 양이 상대적으로 많은 것이 기술의 주요점이다. 기술적으로 정자 DNA를 정량하는 방법도 기존의 방법과 상이한데, 정자 두부를 측면에서 형광을 쬐어 정량하는 대신 두부의 정면에서 형광도를 측정하여 이론적으로 판별의 성공률이 높으며 시간 당 생산하는 성판별 정자의 양이 많은 것으로 추정되었다. 이 기술은 LumiSort™라는 이름으로 특허권이 최근 확보되었으며, 미경산우뿐만 아니라 경산우에서도 인공수정을 적용할 수 있는 기술로 각광을 받고 있다. 국내에서는 (주)한국섹싱바이오텍(S사)에서 전자의 유세포 분리기술을 활용한 정액을 생산하고 있으며, 주로 젖소와 한우의 송아지 생산에 이용되고 있다. 소에 있어서 성판별 정액의 연구는 인공수정(Seidel와 Schenk, 2002)에서부터, 체외수정연구(Cran 등, 1994; Lu 등, 1999; Merton 1997), 난자생검법(OPU, ovum pick-up)을 통한 체외수정란 생산연구(Cebrian-Serrano 등, 2013)에 사용

되어져 왔고, 토끼(Johnson 등, 1989), 돼지(Rath, 2003), 양(Catt 등, 1996), 개(Oi 등, 2013)과 심지어 돌고래 (O'Brien와 Robeck, 2006)와 같은 야생동물에 대한 정액 성판별 연구가 널리 진행되어 왔다. 그러나 국내에서는 후보씨 수소와 같은 종축으로 암컷의 능력을 검정하는 후대검증용 암컷 생산을 위한 성 조절 연구가 일부 진행 중에 있으며, 유전자원 확보를 위한 희소한우 정자의 성판별 연구에 대한 체계적인 보고가 아직 없으며, 앞으로 많은 연구가 필요하다고 판단된다.

백한우는 우리나라 전통 한우로 모색이 황색으로 고정된 황우 집단에서 피부와 털의 착색도를 결정하는 유전자인 TYR 유전자의 돌연변이의 출현으로 발생하는 무색조증을 가진 변이체이다. 이러한 변이를 가진 유전적 돌연변이체는 다양한 야생동물에서 가축과 인간에게 나타나며, 희소 개체로 간주되어 모색의 특이성 연구에 소중한 재료가 될 수 있으며, 희소 개체로 증식하여 육종 소재로 개발될 가치가 있는 계통으로 판단된다. 본 연구에서는 가축유전자원시험장이 발굴하고 보존하고 있는 백한우에서 효율적인 후대생산을 위하여 실험을 실시하였다. 백한우 수소의 정액을 채취하고, S사의 성분리 기술로 생산된 성판별 동결정액을 인공수정에 활용하였다. 원정액과 성판별된 동결정액의 특성을 비교하여 정자의 활력도와 기형율을 비교하였으며, 인공수정을 통한 후대 생산의 효율성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시축

국립축산과학원 가축유전자원센터에서 유전자원으로 보존하고 있는 백한우 종축에서 정기적으로 채정이 가능한 백한우 W004 1두의 정액을 본 실험에 사용하였다.

### 2. 정액채취와 희석

정액채취는 인공질법으로 정액을 채취하였다. 채취된 정액은 32~34℃ 보온병에 담아 10분 이내로 실험실로 운반하였다. 운반된 정액은 동결 전 기형율을 관찰하기 위하여 글리세롤과 난황이 포함되어 있지 않은 Tris-Citrate-diluent로 1:4로 희석하였다. 희석된 정액을 약 4~6 µl 용량을 가온된 슬라이드 글라스 끝부분에 점적하고, 다른 슬라이드를 경사면에 접촉시켜 도말을 실시하였다. 희석되지 않은 원 정액을 S사에서 제공하는 성 분리용 전용 희석액 10배 농축액과 1:9의 비율로 희석하여 16~17℃ 보온병에 흔들림 없이 보관하였고 4시간 이내에 성 분리 전용 FACS가 있는 S사의 실험실로 이송하였다.

### 3. 성판별 정액의 제조

백한우 원정액은 S사가 보유한 MoFlo XDP cell sorter로 분

리를 실시하였으며, 본 실험에 공시된 정자는 스트로 당  $2 \times 10^6$  개와  $4 \times 10^6$ 개의 동결 정액 스트로를 제조하였다. 성 분리 방법은 Garner(2006)의 방법을 응용하였으며, Johnson의 특허(1991)에 기술된 방법에 의거 성분리를 실시하였다.

4. 정자의 형태학적 검사

신선정자와 성분리된 동결정자는 Diff Quik 염색 시약(Dade Behring Inc. USA)을 활용하여 염색하였다. 도말된 슬라이드는 37°C로 가온된 슬라이드 건조대에서 공기 중에 노출시켜 건조시켰으며, 완전히 건조 후, Diff Quik 고정제에 10~20초 노출시키고, Eosin 염색 용액과 Thiazin 염색 용액에 연속적으로 동일한 시간으로 노출시켜 염색한 후 증류수에 5초 동안 노출하여 과도한 염색을 제거하였다. 염색된 시료는 상온에 보관하였으며,  $\times 100$  오일 렌즈를 이용하여 형태적 이상을 가진 정자와 정상적인 형태를 가진 정자를 한 시료 당 전체 정자가 200개 이상이 되도록 최소 4군데 이상에서 관찰하였다. 균일한 결과가 얻을 수 있도록 훈련된 2~3명의 연구자가 동일한 시료를 관찰하고 비교하였으며 균일하고 반복성 있는 실험을 유지하였다. 백한우의 정자는 Barth와 Oko(1989)의 방법에 의하여 비정상성이 분류되었다.

5. 발정동기화, 인공수정 및 임신감정

시험축으로 처녀우를 준비하고 발정 동기화를 위하여 progesterone을 분비하는 CIDER-plus(Inter-Ag, New Zealand)를 질 내에 삽입하였다. 처리 후 7일째 PGF<sub>2</sub>α (Lutalyse™, PharmaciaCo., Belgium)를 오전 25 mg 근육주사하고, CIDER를 제거하였다. 2일후 발정을 관찰하였으며, GnRH(Fertagyl™, Intervet, Holland) 100 µg을 근육주사한 후, 오후에 1차 인공수정을 실시하고, 그 다음날 오전에 2차 인공수정을 실시하였다. 임신판정은 마지막 인공수정 후 120일째에 초음파검진과 직장검사법을 병행하여 실시하였다.

6. 통계처리

통계분석은 엑셀을 활용하여  $\chi^2$  검증(Fisher's exact test)을 실시하였다.

결 과

1. 백한우 개체의 원 정액 성상과 기형을

가축유전자원센터에서 보유하고 있는 백우 종축에서 성분리용으로 선정된 개체의 원정액의 기본 자료를 조사하였다. Table 1에서는 백한우 W004 개체의 원정액의 사출량, 농도, 운동성, 활력도 및 기형율을 조사하였다. 백한우 W004의 평균 사출정액량은  $6.0 \pm 1.38$  ml로 관찰되었고, 평균 농도는  $255 \pm 75.39 \times 10^6$ /ml로 비교적 농후한 정액을 생산하였다. 사출 정액의 생존성은  $92.4 \pm 4.56\%$ 로 관찰되었으며, Diff Quik 염색 후 정자를 관찰하였을 때,  $24.6 \pm 5.03\%$ 의 기형율로 조사되었다. Fig. 1에서는 백한우의 정상적 정자 형태(Fig. 1a)와 기형 형태를 가진 정자의 일부(Fig. 1b)를 관찰할 수 있다. 백한우 정자의 형태학적 기형 분류를 현미경으로 검사하여 나타내면 Table 2와 같다. 정상적인 정자는  $75.1 \pm 1.14\%$ 로 관찰되었으며, 기형



Fig. 1. The sperm morphology of White Hanwoo cattle (W004) by Diff-Quik staining. The spermatozoa of albino Korean native cattle showed higher abnormality with a standard bright filed microscope, which include normal (a) and abnormal (b) sperm. Measuring bar is 20 µm.

Table 1. Semen characteristics of White Hanwoo W004

Bull No.	n	Volume (ml)	Concentration ( $\times 10^6$ /ml)	Viability (%)	Activity	Abnormality (%)
W004	1	6.5	290	95	++++	28
	2	4.3	331	93	+++	30
	3	5.7	150	97	++++	25
	4	8.0	302	92	+++	23
	5	5.4	205	85	++++	17
Mean		$6.0 \pm 1.38$	$255.6 \pm 75.39$	$92.4 \pm 4.56$		$24.6 \pm 5.03$

Table 2. Sperm abnormalities of White Hanwoo W004 semen

Normal (%)	Abnormal (%)	Head defects (%)					Midpiece defects (%)				Tail defects (%)	
		Dh	Dss	Nv	Ad	Ect	DMR	B	Dp	ect	Bt	Co
75.1±1.14	24.9±7.31	1.5	1.8	0	0.7	0	11.7	1.6	4.3	0.5	0.2	2.7

The spermatozoa of Albino Korean native cattle showed various sperm abnormality (Dh: detached head, Dss: head-size defects, Nv: nuclear vacuoles, Ad: acrosome defect, DMR: distal midpiece reflex, B: bowed midpiece, Dp: proximal or distal droplet, Bt: bent tail, Co: coiled tail).

정자의 비율은 24.9 ± 7.31%로서 비교적 높은 기형율을 가졌으며, 이는 개체의 특징으로 판단되었다(Barth와 Oko, 1989). 백한우 정자의 두부기형(head defects)은 4.0%로 두부 탈락(Dh) 1.5%, 두부크기 이상(Dss) 1.8%, 첨체이상(Ad) 0.7%로 관찰되었고, 중편부 기형(midpiece defects)은 18.1%로 중편부 반전(DMR) 11.7%, 휘어진 중편부(B) 1.6%, 세포소적(Dp) 4.3% 및 기타(중편부 찢림, 꺾임 및 미토콘드리아 불균일) 0.5%로 관찰되었으며, 미부의 기형(tail defects)은 2.6%로 관찰되었고, 꼬리부 꺾임(Bt) 0.2%와 꼬리 말림(Co) 2.7%로 관찰되었다.

## 2. 백한우 X 정자의 생존성, 정자농도 및 성분리 효율도

성분리된 백한우 X 정액은 0.25 ml 스트로에 2 × 10<sup>6</sup>개 정자수를, 0.5 ml 스트로에 4 × 10<sup>6</sup>개의 정자수가 되도록 조절되었고, 동일한 배치의 원정액으로 제조된 성분리 정자를 이용하여 인공수정에 이용하였다. 성분리 정자의 총 용량은 희석 후 정액동결 테스트에서 생존율을 검사하였으며, 스트로에 담은 희석 정액의 용량을 조정하여 최종 스트로 당 전체 정자수를 계산하였다(Table 3). 성분리된 정자의 효율은 MoFlo XDP cell sorter로 성분리된 정자를 다시 검사하였을 때, 92.3%의 성비로 관찰되었다.

## 3. 백우 성관별 정액의 인공수정 후 수태율과 출산율

성 관별된 X 동결 정액을 일반 한우에 인공수정을 실시하였을 때 Table 4에서 임신율, 출산율, 송아지의 암컷 출현율을 조사하였다. 대조군으로 일반 보증씨수수(KPN 768) 정액을 활용하였을 때, 태아 120일령 시 임신율은 85.0%로 관찰된 반면, 2

Table 3. The properties of X-sperm sorted from White Hanwoo W004 semen

Type of straw	Estimated No. of total sperm	Viability (%)	Sperm con. (×10 <sup>6</sup> /ml)
0.25	2×10 <sup>6</sup>	85.3 ± 4.96 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>
0.5	4×10 <sup>6</sup>	82.1 ± 8.72 <sup>a</sup>	8.75 <sup>b</sup>

All values are statistically significant ( $p < 0.01$ ).

Table 4. The results of artificial insemination of X sperm sorted from White Hanwoo W004 semen

Treatment	n	Pregnancy at 120 days (%)	Birth (%)	Female (%)
Control (KPN 768)	20	17 (85.0) <sup>a</sup>	16 (80.0) <sup>a</sup>	7 (43.8) <sup>a</sup>
2×10 <sup>6</sup> X-sperm	19	5 (26.3) <sup>b</sup>	3 (15.8) <sup>b</sup>	3 (100) <sup>b</sup>
4×10 <sup>6</sup> X-sperm	14	7 (50.0) <sup>b</sup>	3 (21.4) <sup>b</sup>	3 (100) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Means with different superscripts were significantly different ( $p < 0.05$ ).

× 10<sup>6</sup>개의 백한우 X-정자를 이용한 실험군에서는 25.3%, 4 × 10<sup>6</sup>개의 백한우 X-정자를 이용한 실험군에서는 50.0%의 임신율을 관찰하였다. 출산율은 일반 한우에서는 80.0%, 2 × 10<sup>6</sup>개 정자 처리 인공수정군은 15.8%, 4 × 10<sup>6</sup>개 정자처리 인공수정군은 21.4%로 관찰되었으며, 백한우 정자 수에 따른 통계적 유의적 차이는 없는 것으로 관찰되었다( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

성 관별된 정자를 활용하는 것은 원하는 성을 가진 유전자원을 생산할 수 있어 유전자원의 복원과 활용을 극대화 할 수 있는 방법으로 추정되며, 유전자원의 보존에 필요한 기술로 알려져 있다. 본 연구에서는 가축유전자원센터가 보유 중인 백한우 종축으로 정액을 성분리하고, 원하는 후대를 생산할 수 있는 능력을 검증하고자 연구를 진행하였다. 백한우는 돌연변이에 의하여 생산된 개체로, 현재 채정 가능한 수컷 개체 확보를 위한 증식이 진행 중이며, 본 연구에 이용된 개체는 1두로 제한되었다. 백한우 정액의 성상은 비교적 농후한 정액을 생산하였으나, 정자의 기형율은 채정이 반복됨에 따라 변이가 17~30%로 관찰되었으며(Table 1), 염색에 의한 판정에 따르면 평균 24.9%로 높게 나타났다. 이러한 기형정자는 원심분리를 통하여 제거되지 않으며, 본 실험에서도 성분리 이후에 균일하게 나타나는 것으로 관찰되었다(unreported data). 백한우

정자 기형에서 중편부의 반전현상(DMR, distal midpiece reflex)은 11.7%로 높게 나타났으며, 이는 대조군으로 사용한 정액인 KPN 768의 DMR인 5.6%에 비하여 유의적으로 높은 수준으로 관찰되었다(unreported data). 소 정자의 DMR은 정소의 온도조절 능력이 방해를 받았거나, 낮은 응성 호르몬 수준에 의하여 발생할 수 있고, 이는 유전적 요인에 의하여 발생할 수 있을 가능성이 높은 현상으로 보고(Barth와 Oko, 1986)되었기에 추후 연구를 통하여 더 많은 개체와 시료를 관찰해야 할 것으로 판단된다. 백한우의 성 관별된 X-정자를 활용한 후대 생산에서 암컷 송아지의 출현율은 100%로 관찰되었으며 (Table 4), 인공수정에 이용된 정자의 농도가 높아질수록 임신율과 출산율은 증가되는 경향을 보였으나, 통계적 유의차는 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 기존의 연구와 비슷한 결과임을 알 수 있는데, Seidel 등(1999)의 연구에 따르면  $1 \times 10^6$ 개의 성관별 정자를 앵거스 처녀우에 인공수정하였을 때 51%의 임신율을 얻었으며, 이 수치는 오히려  $5 \times 10^6$ 개 성관별 정자를 활용한 수치인 30%보다 더 높은 것으로 보고하였다. 또한 홀스타인 젖소의 처녀우에 대한 정자수 활용에 대한 연구 결과도  $1 \times 10^6$ 개의 성관별 정자와  $3 \times 10^6$ 개의 성관별 정자의 임신율은 67%와 50%로 낮은 정자수의 임신율이 높게 관찰되었으며, 통계적 유의적 차이는 없다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 백우 성관별 정액을 활용한 송아지 출산율은 각각 15.8%와 21.4%로 성적 자체가 낮은 것으로 관찰되었으며, 기존의 방법으로 성관별 동결정액을 활용하였을 때, 출산율이 40% 내외로 간주할 때 직접 비교는 불가능하나, 타 연구자와 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. 이에 대한 원인은 종축 개체에 의한 차이가 더욱 클 것으로 추정되지만 보다 정확한 판정을 위하여 더 많은 백한우 수컷의 성분리 정자가 검증되어야 함을 알 수 있다. 특히 본 연구에 이용된 백한우 수컷 정자의 기형율은 변이가 상당하며, 성관별 처리를 거친 정자에서도 동일한 기형율이 지속적으로 나타나는 것으로 보아, 성관별 정자의 효율성을 떨어뜨리는 요인으로 추정할 수 있다. 본 연구에서는 백한우의 X-동결 정액을 활용한 인공수정으로 건강한 6두의 후대 암 송아지를 얻을 수 있었으며, 모두 원하는 성을 가진 것으로 관찰되었다.

## 적 요

본 연구는 백한우 개체 1두에서 성관별된 정자를 제조하고 원하는 성을 가진 후대를 생산하고자 인공수정을 실시하였다. 채정이 가능한 백한우 종모우 1두를 선발하고, 정자 성분리 전용 유세포 분리기인 MoFlo XDP기기로 성분리 동결정액을 생산하였다. 성분리 X 정자의 농도에 따른 임신율과 출산율을 비교하기 위하여 대조군으로서 KPN 768정액을 이용하였

으며 그 총 정자수는  $20 \times 10^6$ 로 추정되었다. 실험군으로서 성관별된 백한우 X 정자를 이용하였으며, 정자수  $2 \times 10^6$ /straw와  $4 \times 10^6$ /straw를 처녀우 한우에 2회 인공수정하였다. 백한우의 정액 기형도는  $24.9 \pm 7.31\%$ 로 관찰되었으며, 중편부 반전 정자기형이 약간 높은 정자로 검사되었다(11.7%). 성관별된 백한우 X-정자수가  $2 \times 10^6$ /straw와  $4 \times 10^6$ /straw를 인공 수정할 때 실험군에서 임신율의 차이는 없었으며, 보증씨수수 정자를 이용한 대조군의 경우, 임신율이 유의적으로 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). 대조군 KPN 768와 실험군  $2 \times 10^6$ /straw 정자와  $4 \times 10^6$ /straw 정자 처리군에서 임신율은 각각 85.0%, 26.3% 및 50%로 관찰되었다. 산자 생산율은 각각 80.0%, 15.8% 및 21.4%로 관찰되었고, 암컷 출현율은 각각 43.8%, 100% 및 100%로 조사되었다. 이러한 결과는 백한우 성 관별된 정자로 원하는 성을 가진 후대 생산이 가능함을 보여주고 있으며, 성 관별된 정자를 활용하여 원하는 성을 가진 백한우 후대를 생산하는데 최적화된 정자수의 대한 기본 자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

- Barth AD and Oko R. 1989. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press, Ames.
- Catt SL, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WMC and Evans G. 1996. Birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. Vet. Rec. 139:494-5.
- Cran DG, Cochrane DJ, Johnson LA, Wei H, Lu KH and Polge EJC. 1994. Separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm by flow cytometry for use in IVF. Theriogenology 41:183 (abstract).
- Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. Theriogenology 65:943-957.
- Johnson LA. 1991. Method to preselect the sex of offspring. United States Patent #5. 135:759.
- Johnson LA, Flook JP and Hawk HW. 1989. Sex preselection in rabbits: Live births from X- and Y-sperm separated by DNA and cell sorting. Biol. Reprod. 41:199-203.
- Li S, Yu W, Fu J, Bai Y, Jin F and Shangguan B. 2007. Factors influencing pregnancy rates following transfer of bovine *in vivo* embryos biopsied for sex determination. Reprod. Fert. and Devel. 19:297.
- Lu KH, Cran DG and Seidel Jr GE. 1999. *In vitro* fertilization with flow cytometrically sorted bovine sperm. Theriogenology 52:1393-405.

- McNutt TL and Johnson LA. 1996. Flow cytometric sorting of sperm: Influence on fertilization and embryo/fetal development in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.* 43:261-267.
- Merton JS, Haring RM, Stap J, Hoebe RA and Aten JA. 1997. Effect of flow cytometrically sorted frozen/thawed semen on success rate of *in vitro* bovine embryo production. *Theriogenology* 47:295 (abstract).
- O'Brien JK and Robeck TR. 2006. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 18:319-329.
- Oi M, Yamada K, Hayakawa H and Suzuki H. 2013. Sexing of dog sperm by fluorescence *in situ* hybridization. *J. Reprod. Dev.* 59:92-96.
- Schenk JL, Suh TK, Cran DG and Seidel Jr GE. 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52:1375-1391.
- Cebrian-Serrano A, Silvestre MA, Ruiz S and Rath D. 2013. Effect of sex-sorted sperm on development and quality of *in vitro*-produced bovine embryos derived from ovum pick up oocytes. *Anim. Sci. Pap. and Rep.* 31: 111-122.
- Rath D, Ruiz S and Sieg B. 2003. Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flowcytometrically sexed boar semen. *Vet. Rec.* 152: 400-401.
- Seidel Jr GE and Schenk JL. 2002. Field trials with sexed bovine semen. In: *Proceedings of the 19th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction*. pp 64-69.
- Seidel Jr GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD and Cran DG. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52: 1407-1420.
- Shea BF. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: A six-year retrospective study. *Theriogenology* 51: 841-854.

---

Received March 20, 2015, Revised March 25, 2015, Accepted March 26, 2015