



성분리 키트가 처리된 소정자를 이용한 체외수정란의 배양과 성분리 효율

허영태¹, 김동구², 엄상준^{1,*}

¹상지영서대학교 동물생명산업과, ²(주) 누리사이언스,

Analysis of sex ratio on bovine *in vitro* fertilized embryos using sex determination kit treated sperm

Young-Tae Heo¹, Dong-Gu Kim² and Sang-jun Uhm^{1,*}

¹Department of Animal Science and Biotechnology, Sangji Youngseo College, Wonju, Korea(26339)

²Nuri Science, 320 Ahasan-ro, Gwangjin-gu, Seoul, Korea(05053)

Abstract

It has been claimed that artificial insemination (AI) of cows with frozen-thawed semen treated with commercially produced kits, Wholemom (in favour of female gender) increases the birth chance of calves with desired sex ratio by approximately 85% without decrease of pregnancy rates. Hence, this study was conducted to investigate the efficacy of wholemom kits as combined with frozen-thawed bovine semen during *in vitro* fertilization on the *in vitro* fertilization and developmental efficiency and sex ratios such as some reproductive parameters in bovine. For this, 1,737 oocytes were *in vitro* fertilized and developed. Agglutination effects on bovine after treatment of Wholemom kit were observed by time passage and dose respectively. To determine sex of embryos, Bovine embryo Y-specific gene primers(ConEY) and Bovine specific universal primer(ConBV) were used as multiple PCR method. Fertilization rate of wholemom-treated group was significantly lower than its of control group[66.9% (1,156/1,737) in Wholemom-treated group; 75.0% (610/813) in control group]. However, developmental rate after fertilization of both wholemom-treated and control groups were not significantly different [26.1% (404/1,156) in Wholemom-treated group; 27.4% (224/610) in control group]. Sex ratio of *in vitro* fertilized embryo with frozen-thawed semen treated with wholemom kit was determined by multi PCR. Female ratio in wholemom-treated group [85.4% (173/201)] was significantly higher than its of control group [47.2% (66/141)]. In conclusion, wholemom treatments of semen used in the *in vitro* fertilization and development of bovine oocytes provided increase in female ratio with decrease of fertilization rate.

Received : 23 August 2018

Revised : 20 September 2018

Accepted : 27 September 2018

Key Words : bovine, developmental rate, sex ratio, wholemom

† Correspondence: Sang-jun Uhm (ORCID: 0000-0002-9573-2831)

Phone: +82-33-730-0828, Fax: +82-33-730-0785

E-mail: sjuhm@sy.ac.kr

서론

수정란의 인위적인 성 조절은 축산산업 및 생식 생명 공학 분야에서 수세기동안 연구되었던 분야이다 (Turk 등, 2015). 축산에서 성의 선택적 결정은 경제적이 이점이 매우 커서, 낙농에서는 유제품 및 후대 생산에 직결되는 암컷이, 고기 생산에는 사료효율이 높은 수컷이 선호된다. 특히, 유전적 가치가 높은 개체의 경우 수컷 산자의 가치가 암컷보다 더 높다. 포유류의 성 결정은 난자에 수정되는 정자의 X 또는 Y 염색체 여부에 따라 결정이 되며, (Seidel과 Johnson, 1999). 태아의 성별을 결정하는 최적의 방법은 수정하기 전 정자를 X와 Y 염색체별로 분리하고 이를 이용하여 수정하는 것이다 (Seidel, 1999). 성조절 목적의 정자분리를 위하여 다양한 연구가 시도되어졌는데, 정자의 질량 및 운동성, 운동양상, 표면 변화, 체적 차이, 원심분리에 의한 분포 및 면역학적인 방법등의 다양한 기술들을 사용하여 X 및 Y 정자 분리가 시도되었다 (Barlow와 Vosa, 1970; Ericsson 등, 1973, Prasad 등, 2010; Jain 등, 2011). 그러나, 현재까지 산업적 이용이 가능한 수준의 X 및 Y 정자의 분리는 극히 제한적인 실정이다.

이중 대표적인 방법으로는 X와Y 염색체 정자의 질량차를 감지하여 분리하는 flow cytometric sorting이 있는데, 85-90%의 성공률로 X와Y 정자를 분리 할 수 있으며, 이렇게 분리된 정자를 이용하여 체외수정, 체외배양 배아의 생산이 가능하다 (Parati 등, 2006; Prasad 등, 2010). 그러나, 이 방법의 단점으로는 X와Y 정자의 분리과정 중 고속이동에 의한 정자 손상은 필연적이며, DNA가 염색된 정자를 이용하여 수정을 하였을 때 야기되는 배아의 발달률 및 사망률 증가가 문제시 된다. 또한, 고가의 장비, 전문적인 유지와 고가의 작동비용으로 인하여 현장에서 사용하기에 많은 제약이 따른다 (Seidel 2007). 최근, X 및 Y 정자를 면역학적 기법을 이용하여 분리하려는 시도들이 연구되고 있으며, 이와 관련된 제품들이 보고되고 있다 (Turk 등, 2015). 그러나, 아직까지 충분한 임상과 신뢰도가 높은 연구 결과의 보고는 매우 제한적이기 때문에 이와 관련된 연구는 더 필요한 상태이다. 따라서, 본 연구는 정자에서 Y 유전자 유래 특이 표면 단백질에 반응하는 항체를 기반으로 국내에서 제작된 정자의 성분리 제품인 (주) 누리사이언스의 Wholemom 제품을 소의 동결정액에 처리하여 체외수정을 하였을 때 배발달에 미치는 영향과 성 결정 비율에 대하여 조사하고자 수행되었다.

재료 및 방법

소 미성숙난자의 회수 및 체외성숙 유도

선행연구(Ko 등, 2012)와 동일한 방법으로 도축장에서 암소의 난소를 회수한 후 36℃ 생리식염수에 침지하여 연구실로 이송하였으며, 이송된 난소는 36℃ 생리식염수로 2회 세척 후 난소의 2-5 mm 크기의 가시난포를 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡인하여 미성숙 난자를 확보하였다. 미성숙난자가 포함된 난포액을 15 ml 원심분리관에 분주하고 10분간 정치시켰으며, 원심분리관 하단의 침전물만을 회수하여 60 페트리디쉬에 0.1% BSA (Bovine serum albumin)(Sigma-Aldrich)가 포함된 TL-HEPES (Tyrode's Lactate 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)(Sigma-Aldrich) 배양액을 첨가 후 실체현미경 하에서 난자를 수집하였다. 난자 선별의 기준은 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 골라서 본 연구에 공시하였다. 난포란의 체외성숙을 위해 10% FBS (Fetal Bovine Serum)(HyClone), 5 µg/ml의 Folltropin(Sigma-Aldrich), 1 µg/ml estradiol 17-(Sigma-Aldrich)가 첨가된 TCM-199 배양액을 사용하였으며, 난포란은 4-well dish에서 배양되었는데, 각 well에 300 µl의 체외성숙 배양액을 투여하고 well당 미성숙 난소를 10개씩 배치하고 mineral oil로 well을 도포하였다. Incubator는 5% CO₂, 36.5℃의 조건으로 조절하여 24시간동안 체외성숙을 유도하였다.

정자의 성분리 제품처리 및 소 성숙난자의 체외수정과 배발달 유도

소의 성조절을 위하여 소 체외성숙란에 Wholemom제품이 처리된 소의 동결 정액을 이용하여 체외수정을 실시하였다. 소정자는 한우 씨수소 (KPN) 동결정액을 사용하였는데, 용해된 정액은 BO-IVF media (IVF bioscience)와 혼합하여 원심분리 후 하층에 위치한 농축정자를 수집하는 방법으로 세척하였다. 대조군으로써 사용된 체외수정란의 발달 유도는 제품이 처리되지 않은 동결-용해 정자를 Fert-TALP(Fertilization Tyrode's albumin lactate pyruvate)(Sigma-Aldrich) 배양액에 침지되어있는 체외성숙된 난자에 1×10⁶/ml 농도의 정자가 포함된 Fert-TALP media를 50µl 투여후 18시간동안 공배양을 함으로써 체외수정을 유도하였다. 실험군인 성분리 제품이 처리된 정자를 이용한 체외수정란의 배양은 다음과 같은 과정으로 수행되었다. 1×10⁶/ml 농도의 세척된 정자가 함유된 50µl의 Fert-TALP media에 상업적으로 판매되는 성분리 키트인 wholemom을 1, 10, 20, 100µl 씩 공배양하여 정자의 응집현상을 관찰하였고,

체외수정은 $1 \times 10^6/ml$ 농도의 세척된 정자가 함유된 $50 \mu l$ 의 Fert-TALP media에 $20 \mu l$ 의 wholemom이 처리된 정자 suspension $50 \mu l$ 를 체외성숙된 난자와 공배양하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 0.3% fatty acid free BSA가 첨가된 CR I aa의 배양액에서 72시간 동안 배양시켰으며, 난할이 이루어진 수정란만을 선별하여 10% FBS가 첨가된 CR I aa 에서 배반포기까지 체외발달을 시켰다. 체외배양동안 배양기의 조건은 5% CO₂, 36.5°C이다.

수정란의 성판별 검증

Wholemom 키트가 처리된 정자를 이용하여 생산된 체외수정란의 성 판별은 PCR로 확인하였다. 성판별을 위하여 X 염색체 특이 primer, Y 염색체 특이 primer가 동시에 처리되는 multiplex PCR을 실시하였다. Primer에 대하여 간략히 설명하자면, Rattanasuk 등 (2011)의 선행연구에서 작성한 Y염색체 검출용 Bovine embryo Y-specific gene primers(ConEY)와 Bovine specific universal primer 인 ConBV 들을 동일하게 사용하였다. 이들 primer sequence는 Table 1과 같다. 각각의 실험군에서 배반포난은 무작위로 선별되었으며, 현미경하에서 물리적으로 투명대를 제거하여 배반포난 1개씩 $2 \mu l$ 의 3차중류수와 함께 PCR tube에 넣었다. 배반포난이 들어있는 PCR tube는 액체질소와 36°C의 water bath에 3회씩 번갈아가며 침지시켜 세포막 및 세포질의 물리적 파괴를 유도하였다. 이후, 각각의 배반포난이 들어있는 PCR tube에 $23 \mu l$ 의 PCR mixture를 투입하여 PCR을 수행하였다. Multiple PCR에서 사용된 polymerase로는 high phusion taq (New england biolab.)을 사용하였으며, 98 C° 40초, 52C° 40초, 72C° 40초로 총 40 cycle을 반응시켰다. 수행된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동을 하여 X 염색체(216bp), Y 염색체(181bp) 특이 primer에 의하여 생산된 band를 확인하여 판별하였다. Multiple PCR의 control로는 암소, 수소의 혈액에서 유래된 genomic DNA를 사용하였다.

Table 1. Primers used for sex determination of bovine embryos

Name of primer	Primer sequence	Specificity	Size of amplicon	References
ConBV	5'-TGGAAGCAAAGAACCCCGCT -3'	Bovine specific product	216 bp	Plucienniczak et al., 1982. Machaty et al., 1993.
	5'-TCGTCAGAAACCGCACACTG-3'			
ConEY	5'-GATCACTATACATACACCACT-3'	Male specific product	181 bp	Plucienniczak et al., 1982.
	5'-GCTATGACACAAATTCTG-3'			

통계처리

본 연구는 9-27개의 체외미성숙난을 총 실험 결과의 처리군 간의 유의성 검정을 위한 통계처리를 위해서는 SAS program의 Chi-square를 실시하였으며, 유의성 은 P<0.05 이하만을 인정하였다.

결과

Wholemom 처리후의 정자 응집현상

Wholemom 처리가 정자에 어떤 외형적 영향을 미치는지 관찰하였다. 체외수정 전 동결정액을 용해 및 세척 하였으며, Wholemom과 정액을 공배양하였다. Wholemom과 정자를 공배양한 후, 1분, 5분, 10분, 20분째에 관찰하였으며, 정자의 응집현상은 Figure 1과 같다. Wholemom과 공배양된 정자는 처리후 1분에는 응집현상이 일어나지 않았으나 (Figure 1-Aa), 처리후 5분부터 응집이 시작되었다 (Figure 1-Ab). Figure 1-Ad에서 보는바와 같이 20분 이상 처리하였을 때 최고조의 응집현상이 나타났고, 처리후 1시간 이후부터는 응집되었던 정자가 산개되었다. 또한, 정자와 공배양된 Wholemom의 양에 따른 응집현상을 조사하였다. Figure 1-Ba와 b에서 보는바와 같이 $1 \times 10^6/ml$ 농도의 정자가 포함된 Fert-TALP media $300 \mu l$ 에 Wholemom을 $1 \mu l$, $10 \mu l$ 투여하였을때는 정자에서 현미경으로 관찰 가능한 외형적 응집 변화가 보이지 않았다. 그러나, Wholemom을 $20 \mu l$ 또는 $100 \mu l$ 투여하였을때 관찰 가능한 수준의 정자 응집현상을 보였다 (Figure 1-Bc,d).

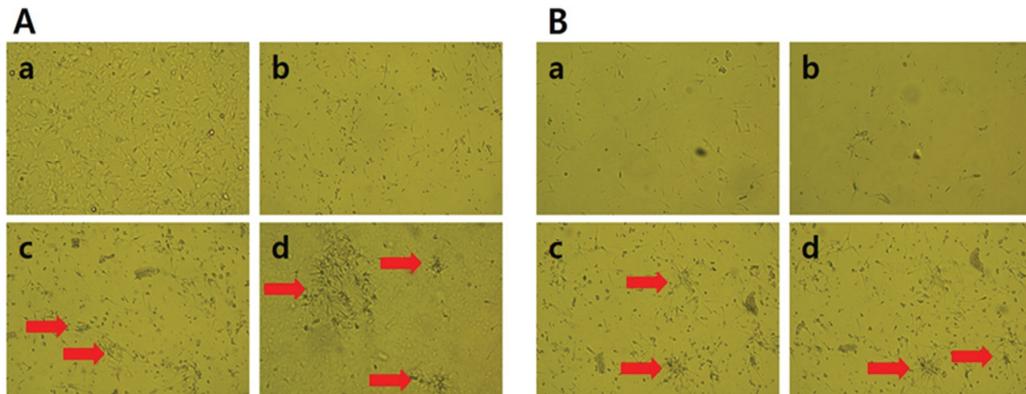


Figure 1. Feature of sperm agglutination. Agglutinations of frozen-thawed bovine sperm treated with Wholemom kit were observed. (A) Sperm suspensions of bovine were mixed with Wholemom after 1 minute(a); magnification: × 100, 5 minutes (b); magnification: × 100, 20 minutes (c); magnification: × 100 and 1 hour (d); magnification: × 200. (B) Sperm suspensions of bovine were mixed with 1 μl (a), 10 μl (b), 20 μl (c) and 100 μl(d) of Wholemom after 20 minutes; magnification: × 100. Arrow indicates agglutinated sperm.

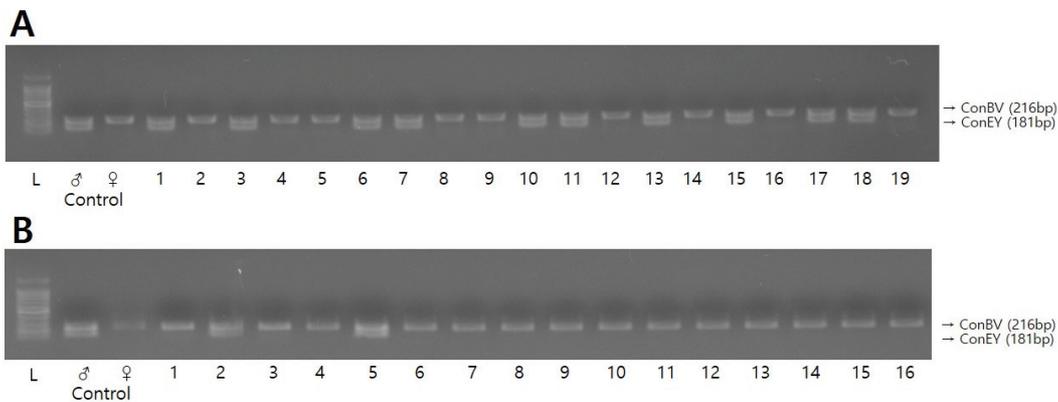


Figure 2. Multiplex PCR analysis of sex on IVF blastocysts. DNA isolated from blastocysts and 2 sets of primers (Bovine embryo Y-specific gene primers; ConEY and Bovine specific universal primer; ConBV) were used. (A) Blastocysts derived from normal conditioned IVF. Samples are Judged as males (1, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 15, 17 and 18) and females (2, 4, 5, 8, 9, 12, 14, 16 and 19). (B) Blastocysts derived from IVF with Wholemom-treated sperm. Samples are Judged as males (2, 5) and females (1, 3, 4, 6-16). L: 100bp ladder, ♂: DNA from male blood, ♀: DNA from female blood.

Wholemom 처리 정자에 의한 체외수정 및 배발달율

Wholemom이 처리된 정자를 이용하여 소 체외수정란을 체외수정 후 배양하였으며, 체외수정 후 분할률과 배발달률을 조사하였다. 그 결과 Table 2에서 보듯이와 같이 Wholemom을 처리하지 않은 정자를 이용하여 체외수정란 대조군은 분할률이 75.0%로 Wholemom만 처리된 정자를 이용하여 체외수정란 경우는 분할율 (66.9%)보다 유의차 있게 높았다. 그러나, 배반포로의 발달율(배반포 난/분할란)은 대조군의 경우 27.4%이며, Wholemom처리된 정자를 이용한 발달율 경우는 26.1%로써 통계적 유의차 없이 동일한 수준으로 체외발달하는 것을 확인하였다(Table 2).

Table 2. Developmental rate of *in vitro* fertilized bovine oocytes using wholemom-treated sperm

Treatment	No. of IVF oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocysts	Ratio of blastocysts in IVF oocytes
Control	813	610 (75.0%) ^a	224	27.4% ^a
Wholemom-treated	1,737	1,156 (66.9%) ^b	404	26.1% ^a

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

Wholemom처리 정자 유래 체외발달난의 성비 조사

본 연구에서는 대조군에서 일반 배반포란 141개, Wholemom 처리정자 유래 배반포란 201개의 생물학적 성을 PCR로 확인하였다 (Table 3). Table 3에서 보는바와 같이 암/수소 유래 genomic DNA에서 암컷은 bovine specific gene만 검출된 216bp의 PCR 산물만이 검출되었으며, 수컷의 경우 bovine specific gene과 bovine male specific product인 181bp의 산물이 동시에 검출되었다. 이러한 결과를 바탕으로 각각의 배반포란에서 검출된 PCR산물의 양상을 반영하여 성을 판별하였다. 이러한 검사 결과는 Table 3에 정리하였으며, control의 경우 총 141개의 배반포란에서 암컷 66개(47.2%), 수컷 75개(52.8%)의 성비를 확인하였다. Wholemom 처리정자 유래 배반포란 201개중에서는 암컷 173(85.4%), 수컷 28(14.6%)의 성비를 관찰하여, Wholemom 처리가 수정란의 성비를 유의차 있게 인위적으로 조절이 가능한 것을 관찰하였다.

Table 3. Sex ratio in *in vitro* fertilized bovine blastocysts using wholemom-treated sperm. Wholemom-treated males show significantly lower number of blastocysts than Wholemom-treated Female (Independent t-test, $P < 0.05$)

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

고찰

인위적인 가축의 성 결정은 동물 산업 및 생식생물학적 기술 발달에 대한 이익이 지대하여 정자의 성 분리에 대한 연구는 오랜기간 진행되어 왔다. X 및 Y 정자를 분리하기 위하여 수많은 방법들이 시도되어 졌는데, 대부분의 정자 분리 방법들은 기술이 안정적이지 못하고 재현성 부족의 문제가 지속적으로 제시되었다. 정자의 성분리에 대한 여러 기술들 중 현재까지 FACS는 성에 따라 포유류 정자를 분리 할 수 있는 가장 신뢰성 있는 방법이다. 그러나, FACS에 의한 정자 분리는 비용과 정자 손상의 측면에서 문제가 있어 여전히 대중화 되지 않고 있다. 따라서, 정자를 성에 따라 분류하는 방법중 경제적이고 편리하며 비침습적인 대안으로 면역학적 방법이 제시되고 있다. 면역학적으로 정자를 분류하는 기본 원리는 다음과 같다. X와 Y 정자 사이에는 genomic DNA가 다르며, 이러한 DNA 차이가 단백질의 발현이 다르기 때문에, X와 Y 정자의 표면에 존재하는 다양한 단백질의 차이를 면역학적으로 선별하는 것이 가능하다는 가설을 선행연구에서 제시하였다 (Seidel, 과 Johnson 1999). 이러한 원리를 바탕으로 수십년간 면역학적 방법으로 정자를 성분리하려는 시도는 매우 많았으나, 결과에 있어 성분리의 유의차가 없거나, 성공률이 안정적으로 재현되지 않았다 (Hendriksen, 1999; Hendriksen 등, 1996). 그러나, 최근에 들어 X 및 Y 정자에 특이적인 세포 표면 항원의 발굴이 활발하게 이루어지고 있으며, 특히, H-Y 항원에서 양성 특이 단백질은 X 정자와 Y 정자를 구별 할 수 있는 가능한 방법으로 다른 연구자들에 의해 주목 받고 있다 (Sang 등, 2011). H-Y 항원에 대하여 간략히 설명한다면, H-Y 항원은 적혈구와 조혈 전구 세포를 제외한 포유류 수컷의 대부분의 세포와 조직에서 발견이 된다. 따라서, 표면에서 H-Y 항원이 발현되는 세포는 Y 염색체의 발현이기 때문에, 이것을 이용하여 X 정자와 Y 정자를 분리하는데 사용될 수 있다. 몇몇 연구자들은 Y-sperm에 대한 항 H-Y 항체의 특이적 결합을 보고하였으며, Ali 등 (1990) 은 단일클론 항체를 이용하여 X 정자를 동정하고 분리 하였다. 비록, 이에 대하여 여러 상충적인 의견들이 존재하지만, 성분리를 위한 면역학적 연구들이 다수 진행되고 있다(Espinosa-Cervantes 과 Cordova-Izquierdo, 2013).

최근 Chen (2014) 등은 X와 Y 정자 표면에 관여하는 DNA중에서 31개의 유전자가 다르며, 이 중 27개가 X 정자에서, 4개는 Y 정자에서 up-regulation 하는 것을 보고하였다. 또한, 이러한 다른 유전자들은 X와 Y정자 간의 표면에 다른 단백질의 발현을 유도하기 때문에 X 또는 Y 특이 표면 단백질에 반응하는 항체를 개발하여 이용할 수 있다. 이러한 항체는 magnetic bead, affinity chromatography, FACS등에 응용하여 성분리 비율을 높일 수 있다 (De Canio 등 2014).

최근, 프로테오믹스를 이용한 X / Y 정자의 차이를 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Baker, 2012). 가장 주목할만한 선행연구에 따르면, X / Y 정자에서 차별적으로 발현되는 17 개의 단백질을 발견했으며, 편모의 세포 골격 구조, 당분해 효소단백질과 관련이 있는 15 개의 단백질은 X 정자에서, 2 개는 Y 정자에서 up-regulation이 되는것을 발표하였다. 또 다른 연구에서는 42 개의 중요한 단백질이 소의 X와 Y 정자에서 차별적으로 발현되었다. 그 중 16 가지는 에너지 대사, 세포 골격 구조, 스트레스 저항성과 관련이

있으며, 이러한 단백질의 발현은 정자 기능, 외형의 결정, 정자와 난모세포 사이의 상호 작용, 배아의 발달에 영향을 줄 수 있기에 (Li 등 2016; Byrne 등 2012). X 및 Y정자를 분류하는 잠정적인 분자 마커로 제시되었다.

제품을 개발한 업체의 설명(<http://www.nurisci.com/>)에 따르면, Wholemom은 위에서 제시한 프로테오믹스 결과를 기반으로한 면역학적 기법으로 제작된 항체제품이며 Y정자 특이 단백질에만 반응하는 항체로써, Y정자들간의 응집반응을 유도하여 X 정자에만 독립적인 운동성이 부여되고, 이로 인하여 X 정자의 수정확률을 향상시켜, 결국 암컷의 성비가 유의차 있게 높도록 하는 것이다. 이를 위하여 (i) Wholemom제품을 처리한 소 동결 - 용해 정액은 Y 정자특이 단백질에 반응하는 항체의 작용으로 Y정자의 응집현상을 유도하기에 총 정자수, 정자 운동성, 수태율의 변화가 없으며, (ii) 현장 조건에서 사용이 매우 쉽고, (iii) 비용이 FACS등의 기존 방법보다 상대적으로 매우 저렴하고(1회 처리당 50,000원), (iv) 동결 - 해동 된 소 정액을 Wholemom으로 처리하면 암소 생산 확률이 85% 이상이라고 밝혔다. 본 연구에서 Wholemom제품을 사용한 결과를 요약한다면, (i) Wholemom제품이 정자를 사멸시키지는 않기 때문에 총 정자수에는 영향을 미치지 못하였으나, 시간 경과 및 제품 투여량에 따라 확인 가능한 정자 응집 반응을 유도하는 것을 관찰하였다 (Figure 1). 따라서, 응집된 정자들로 인하여 총 정자의 운동성은 낮아졌다. 또한, 동일 조건에서 체외수정을 유도하였을 때, Wholemom제품 처리가 유의차 있게 수정율을 낮추는 효과를 주었다 (Table 2). 체외수정에 있어 정자의 운동성, 수정가능한 정자의 수 모두 체외수정율의 중요한 요인인데, 선행연구에서도 수정가능한 정자의 수가 감소하는것만으로도 체외수정율을 낮추는 현상이 야기되는 것을 보고하였다(Pang 등, 2003). 따라서, Wholemom의 응집유도반응으로 인하여 총정자중 약 반 정도의 활동성을 제한하기 때문에 수정 가능한 정자의 숫자를 현저히 낮추어 수정률을 낮추는 것으로 사료된다. , Wholemom의 처리시 정자 응집(ii) 제품과 정액의 단순 혼합 방식으로 정자의 응집반응을 유도하기 때문에 사용법이 용이하며, (iii) 상대적으로 저렴한 비용이다. 또한, (iv) Wholemom제품을 사용하였을 경우 PCR을 이용한 성비 확인결과 암/수성비는 85.4:14.6 %의 비율로 유의차 있게 차이가 있었으며, 업체에서 밝힌 85% 이상의 암소 선택 성비 확률과 유사하였다. 비록, 본 연구가 제한적인 *in vitro* 환경에서만 수행이 되었고, 산업 현장조건에서의 연구가 수행되지 않아 제품의 성능을 단정짓기는 어렵다. 따라서, 향후 추가적으로 Wholemom제품 처리가 산업 현장에서 적용되었을때의 임신율, 암/수송아지 성비, 유산, 낙태 및 임신 기간등의 조사가 필요하다고 여겨진다. 또한, 성비에 대한 수소 개체적 특이성을 최소화하기 위하여 수소 개체당 정액을 구분하여 Wholemom제품을 처리하는 실험도 요구된다.

결론

본 연구에서는 면역학적 기반으로 제작된 소 정자 성분리용 키트를 동결-용해 소정액에 처리하였을시 정자의 응집현상을 관찰하였으며, 성분리 키트가 처리된 소정액을 이용하여 소의 미성숙란에 체외수정을 하였을시 난자의 발달과 성분리비를 multi PCR 방법으로 조사하였다.

동결-용해 소정액에 소정자 성분리제품인 Wholemom kit를 처리하였을시, 처리 5분후부터 응집현상이 시작되어 20분부터 최고수준의 정자 응집현상이 일어났으며, 1×10^6 /ml 농도의 정자가 포함된 Fert-TALP media 300 μ l 에 Wholemom kit를 20 μ l 이상 처리 하였을 때 관찰 가능한 수준의 정자 응집현상을 보였다.

소 난자의 체외수정시 대조군은 분할률이 75.0%로 Wholemom이 처리된 정자를 이용하여 체외수정한 66.9%보다 높았다. 그러나, 배반포로의 발달율(배반포난/분할난)은 대조군(27.4%)과 Wholemom처리군(26.1%) 사이에 유의차 없이 동일한 수준이었다.

Multi PCR 방법으로 체외배양 배반포란의 비를 확인하였다. 대조군에서 배양된 141개의 배반포란에서 암:수 성비는 47.2:52.8%였으나, Wholemom 처리정자 유래 배반포란의 암:수 성비는 85.4:14.6% 였다. 따라서, 소 정자에 Wholemom의 처리는 수정란의 성비를 유의차 있게 인위적으로 조절하는 것을 관찰하였다.

ACKNOWLEDGEMENT

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원(기술사업화지원사업)의 지원을 받아 연구되었음(No. 817024-03-2-HD020).

REFERENCES

- Ali JI, Eldridge FE, Koo GC and Schanbacher BD. 1990. Enrichment of bovine X-and Y-chromosome-bearing sperm with monoclonal HY antibody-fluorescence-activated cell sorter. *Arch. Androl.* 24:235-245.
- Baker MA. 2011. The 'omics' revolution and our understanding of sperm cell biology. *Asian J. Androl.* 13:6-10.
- Barlow P and Vosa CG. 1970. The V-chromosome in human sperm. *Nature* 226:961-962.
- Byrne K, Leahy T, McCulloch R, Colgrave ML and Holland MK. 2012. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics* 12:3559-3579.
- Chen X, Yue Y, He Y, Zhu H, Hao H, Zhao X, Qin T and Wang D. 2014. Identification and characterization of genes differentially expressed in X and Y sperm using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Mol. Reprod. Dev.* 81:908-917.
- De Canio M, Soggiu A, Piras C, Bonizzi L, Galli A, Urbani A and Roncada P. 2014. Differential protein profile in sexed bovine semen: Shotgun proteomics investigation. *Mol. Biosyst.* 10:1264-1271.
- Ericsson RJ, Langevin CN and Nishino M. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 246:421-424.
- Espinosa-Cervantes R and Cordova-Izquierdo A. 2013. Sexing sperm of domestic animals. *Trop. Anim. Health Prod.* 45:1-8.
- Hendriksen PJ, Welch GR, Grootegoed JA, van der Lende T and Johnson LA. 1996. Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X-and Y-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. *Mol. Reprod. Dev.* 45:342-350.
- Hendriksen PJ. 1999. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? *Theriogenology* 52:1295-1307
- Jain A, Yathish HM, Jain T and Sharma A. 2011. Efficient production of sexed semen by Flow Cytometry: A Review. *Agri-cultural Review* 32:36-45.
- Ko DH, Uhm SJ, Yang JS, Lee SM, Joe SY, Heo YT, Xu YN, Koo BC, Cheong KS, Kim KJ, Kim JT and Kim NH. 2012. Production of Transgenic Cattle by Non-surgical Embryo Transfer. *Journal of Embryo Transfer* 28:169-175.
- Li CJ, Wang D and Zhou X. 2016. Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 173:1-7.
- Machaty Z, Paldi A, Csaki T, Varga Z, Kiss I, Barandi Z and Vajta G. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 98:467-470.
- Parati K, Bongioni G, Aleandri R and Galli A. 2006. Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology* 66:2202-2209.
- Plucienniczak A, Skowronski J and Jaworski J. 1982. Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences. *J. Mol. Biol.* 158:293-304.
- Prasad S, Rangasamy S and Satheshkumar S. 2010. Sex preselection in domestic animals—Current status and future prospects. *Veterinary World* 3:346-348.
- Rattanasuk S, Parnpai R and Ketudat-Cairns M. 2011. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. *J. Reprod. Dev.* 57:539-42.
- Sang L, Yang WC, Han L, Liang AX, Hua GH, Xiong JJ, Huo LJ and Yang LG. 2011. An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm. *J. Dairy Sci.* 94:2060-2070.
- Seidel GE and Johnson LA. 1999. Sexing mammalian sperm—overview. *Theriogenology* 52:1267-1272.
- Seidel GE. 1999. Sexing mammalian sperm and embryos state of the art. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:475-485.
- Seidel GE. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68:443-446.
- Turk G, Yulsel M, Sonmez M, Gur S, Ozer Kaya S and Demirci E. 2015. Effects of semen sexing kits (Heiferplus™ and Bullplus™) supplemented to frozen-thawed bull semen on pregnancy rates, foetal sex ratios and selected reproductive parameters in cows. *Veterinari Medicina* 60:309-313.