

ANIMAL

In vitro fertilization using sex-sorted boar sperm mediated by magnetic nanoparticles

Hakjae Chung¹, Sunyoung Baek¹, Soojin Sa¹, Youngshin Kim¹, Joonki Hong¹, Eunseok Cho¹, Jihwan Lee², Seungmin Ha², Jungho Son³, Seunghwan Lee⁴, Inchul Choi^{4*}, Kyungwoon Kim^{5*}

¹Swine Science Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Cheonan 31000, Korea

²Dairy Science Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Cheonan 31000, Korea

³Chungnam Techno Park, Cheonan 31035, Korea

⁴Division of Animal and Dairy Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam University, Daejeon 34134, Korea

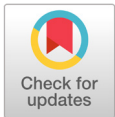
⁵Planning and Coordination Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Cheonan 31000, Korea

*Corresponding author: icchoi@cnu.ac.kr, kw72kim@korea.kr

Abstract

A wide range of techniques have been developed to separate X or Y- chromosome-bearing sperm. In particular, bovine semen sex-sorted by using flow cytometry based on differences in the amount of DNA between X and Y chromosome bearing sperm is used in dairy farms. The first piglets were produced using sex-sorted sperm 30 years ago. However, sexed sperm have not been commercially available in pigs because the flow cytometry technique is not capable of sorting the high number of sperm required for porcine artificial insemination (AI), and the prolonged exposure to an electrical field might damage to the DNA in sperm. The purpose of this study was to evaluate a boar sperm sorting method based on magnetic nanoparticles. A flow cytometer assay verified the efficacy of the magnetic nanoparticles (> 90% of sex-sorted sperm). In addition, a duplex polymerase chain reaction (PCR) assay using sex chromosome specific genes including *SRY* (sex-determining region Y; male), *ZFY* (zinc finger protein Y-linked; male), and *ZFX* (zinc finger protein X-linked; female) showed that *in vitro* fertilized porcine embryos by X and Y-chromosome bearing sperm were 100% female (40/40) and 72% female (35/48), respectively, at 8-cell or morula stages, suggesting that the sex-sorted sperm were fertile. In conclusion, our findings suggest that the sex-sorted method based on magnetic nanoparticles can be utilized for porcine sex-sorted AI.

Keywords: boar sperm, magnetic nanoparticles, PCR (polymerase chain reaction), sex-sorted sperm



OPEN ACCESS

Citation: Chung H, Baek S, Sa S, Kim Y, Hong J, Cho E, Lee J, Ha S, Son J, Lee S, Choi I, Kim K. 2020. *In vitro* fertilization using sex-sorted boar sperm mediated by magnetic nanoparticles. Korean Journal of Agricultural Science 47:979-985. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200081>

Received: September 25, 2020

Revised: November 10, 2020

Accepted: November 12, 2020

Copyright: © 2020 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

포유동물의 성은 정자가 가지고 있는 성염색체인 X 혹은 Y 염색체에 의해 결정된다. 따라서 정자 성 분리는 이들 성염색체가 가지고 있는 DNA 함량 혹은 성염색체 특이적으로 발현되는 단백질을 활용하고 있다(Katigbak et al., 2019). 최초의 성 분리 정자를 사용한 토끼가 1989년에 생산되었고 돼지에서는 1991년에 유세포기로 분리된 정자를 사용하여 산자를 생산하였다(Johnson, 1991). 특히, 돼지 농가는 성분리 정자의 활용은 다음과 같은 장점이 있다. 1) 빠른 성장률을 갖고 있는 암컷 돼지 생산은 경제적 이득이 있으며 2) 웅취 제거를 위한 외과적 거세를 하지 않아도 되어 동물 복지측면에서도 필요로 하고 있다(von Borell et al., 2009; Rath et al., 2015). 이러한 장점에도 불구하고 상업 및 윤리적 측면에서 성 분리된 정자의 사용은 돼지산업에서 아직 상용화 되고 있지 않고 있다. 이는 유세포 분리기(flow cytometer)를 사용할 때 정확한 분리를 위해 정자의 두부와 레이저의 방향의 일치가 이루어져야 하고 이에 따른 시간이 소요되는데 돼지정액의 양과 수는 소에 비해 많이 요구되어 분리시간이 길며 투과되는 레이저와 전기장에 의한 정자의 손상을 유발해 그 사용이 제한되고 있기 때문이다. 또한, 분리된 정자의 양은 일반적인 인공정자주입법 사용하는 양 보다 상대적으로 적은 양을 사용하며 적은 사용량을 극복하기 위해 정자를 심부에 주입하는 방법이 요구된다(Rath et al., 2015; Alkmin et al., 2016). 본 연구는 이러한 분리된 정자 사용의 한계를 해결하기 위해 다량의 정자를 빠른 속도로 손상 없이 분리 할 수 있는 마그네틱 비드를 사용하여 X-염색체 혹은 Y-염색체를 갖고 있는 정자를 분리하고 이를 이용하여 체외 수정된 돼지 배아와 PCR (polymerase chain reaction)기법을 활용하여 성 분리 정도를 검증하였다.

Materials and Methods

정액 준비 및 성 분리

본 연구는 농촌진흥청 국립축산과학원의 동물 관리 및 절차에 따라 시행하였다(NIAS2019-378). 수압법을 이용하여 12 - 24개월 령의 두록(Duroc) 수돼지에서 정액을 채취하였으며 신선한 정액은 beltsville thawing solution (BTS) 로 1 : 1 (vol/vol) 희석하였다(Johnson et al., 1988; Baek et al., 2020). 마그네틱 비드를 활용한 성분리는 제조사의 실험법에 따라 시행하였다. 희석정액은 150 × g에서 1분간 원심분리를 실시한후 상등액만을 분리하여 마그네틱 비드(Noha Biotech Inc., Cheonan, Korea)를 첨가했다. 정자와 마그네틱 비드($3 \times 10^9 \cdot \text{mg}^{-1}$)는 1 : 1 비율이 되도록 했다. 희석정액-마그네틱 비드 혼합액은 35 - 37°C 에서 5분 간격으로 흔들어주며 20분간 반응시킨다. 약 10 - 15분 동안 혼합액을 자석에 놓아두어 철을 함유하고 있는 비드가 자석 쪽으로 수집되도록 한다. 마그네틱 비드가 없는 부분의 혼합액을 조심스럽게 다른 튜브로 옮기고 300 × g에서 5분간 원심분리를 실시해 성 분리된 정자를 얻는다. X-정자를 분리하기 위해 Y-정자와 결합하는 비드를 상용하였으며 Y-정자를 얻기 위해 X-정자와 특이적으로 결합하는 마그네틱 비드를 사용하였다.

유세포 분석을 이용한 성 분리 검사

정자 성 분리의 효율성 및 생존성은 유세포 분석을 이용하였다. 성별 및 대조군의 정자의 DNA 함량을 측정하기 위해 각각 $6 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 의 정자를 Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)로 염색($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)하기 위해 30분간 따뜻한 수조에서 두었다. 샘플별 100 μL 의 정자현탁액을 cytometer 튜브에 두었다. 각 데이터는 FACS Aria™ 세포 분리기(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)을 사용하였다. Hoechst 33342는 UV 레이저(350 nm)와 461 nm 파장의 형광으로 검출된 형광 신호를 사용하였다.

체외수정

난소는 지역 도축장에서 수집하여 25°C PBS (phosphate buffered saline)에 넣어 실험실로 운반하였다. 진경 3 - 8 mm의 난포로부터 COC (cumulus-oocyte complex)을 얻어 2.5 mM fructose, 0.4 mM L-cystein, 1 mM sodium pyruvate, 0.13 mM kanamycine, 10 ng·mL⁻¹ EGF (epidermal growth factor) 및 500 IU·mL⁻¹ gonadotropin 호르몬이 들어 있는 TCM-199 (tissue culture medium-199)에서 22 시간 동안 배양 한 후, COC를 3 회 세척하고 FSH (follicle stimulating hormone) 및 hCG (human chorionic gonadotropin)가 없는 IVM 배지에서 추가 22시간 동안 5% CO₂ 및 39°C 에서 배양했다. 성숙된 난자는 0.1% hyaluronidase 처리해 난구세포를 제거하고 극체가 방출된 난자(15 - 20개·drop⁻¹)는 5% CO₂ 하에서 39°C에서 각 45 μL mTBM (modified tris-buffered medium)에 놓았다. 성 분리된(X- 혹은 Y) 정자와 성 분리후 혼합한 정자는 PBS 로 원심분리 세척 후 mTBM에 정자 현탁액($1.5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)을 준비해 성숙된 난자와 6시간 배양 후 PZM-3 (porcine zygote medium-3) 배양액으로 옮겨 5% CO₂, 39°C에서 배양했다.

PCR을 활용한 성 분리 확인

체외 수정된 8세포기 - 상실배에 도달한 돼지 수정란은 100 μL 의 lysis buffer (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid [pH 8], 1% LiDS, and 5 mM dithiothreitol [DTT]) 녹인후에 액체질소로 급속 동결 후 -80°C에 개별 저장했다. Genomic DNA을 추출하기 위해 2.5배의 냉각된 100% 에탄올을 넣고 혼합후 -20°C에서 1시간 처리한후 18,000 × g 이상에서 15 분간 원심분리한후 상층액을 제거후 상온에서 건조시켜 DNA을 얻고 PCR 반응을 위해 DNase/RNase 가 없는 물에 녹여 사용했다(Huffman et al., 2012). X-정자, Y-정자, X/Y-정자를 사용해 수정된 배아에서 추출한 genomic DNA는 ZFX/Y와 SRY 특이적 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 사용한 프라이머의 시퀀스는 다음과 같다. ZFX/Y (forward: 5'-ATAATCACA TGG AGA GCC ACAAGC-3'; reverse: 5'-T GCA CTT CTT TGG TAT CTG AGA AAG T-3'), SRYB (sex determining region Y-B forward: 5'-TGA ACG CTT TCA TTG TGT GGT C-3'; reverse: 5'-GCC AGT AGT CTC TGT GCC TCC T-3'). 증폭된 PCR 산물은 2% 아가로스 젤에서 분리한후 EtBr 로 염색해서 UV광에서 관찰하였다.

Results and Discussion

나노 입자를 활용한 돼지 정자의 성분리

성 분리 정자의 활용가치와 요구가 증가함에 따라 다양한 방법을 활용한 정자 분리 방법이 소개되고 있다. 나노 입자를 활용한 돼지 정자의 성분리의 효율 및 정확성을 검증하기 위해 유 세포기를 사용하였다(Feugang, 2017). 최근 한 연구에 따르면 마그네틱 나노입자를 활용하여 당나귀의 정자를 성분리는 90% 이상으로 보고되고 있다(Domínguez et al., 2018). 본 연구는 정액의 액이 상대적으로 많은 돼지에서 동일한 방법으로 수행 하였다(Górski et al., 2017). 성분리되지 않은 정액에서는 X-정자가 50%, Y-정자가 49.9%로 1 : 1 비율이 반면 X-정자를 분리한 튜브에서는 90.1%, Y-정자로 분리한 튜브에서는 93%가 각각 분리 되었다(Fig. 1). 따라서, 마그네틱 나노 입자를 활용한 돼지 정자의 성분리는 기존 방법 및 축종과 유사한 수준으로 가능함을 보여준다(Rath et al., 2013).

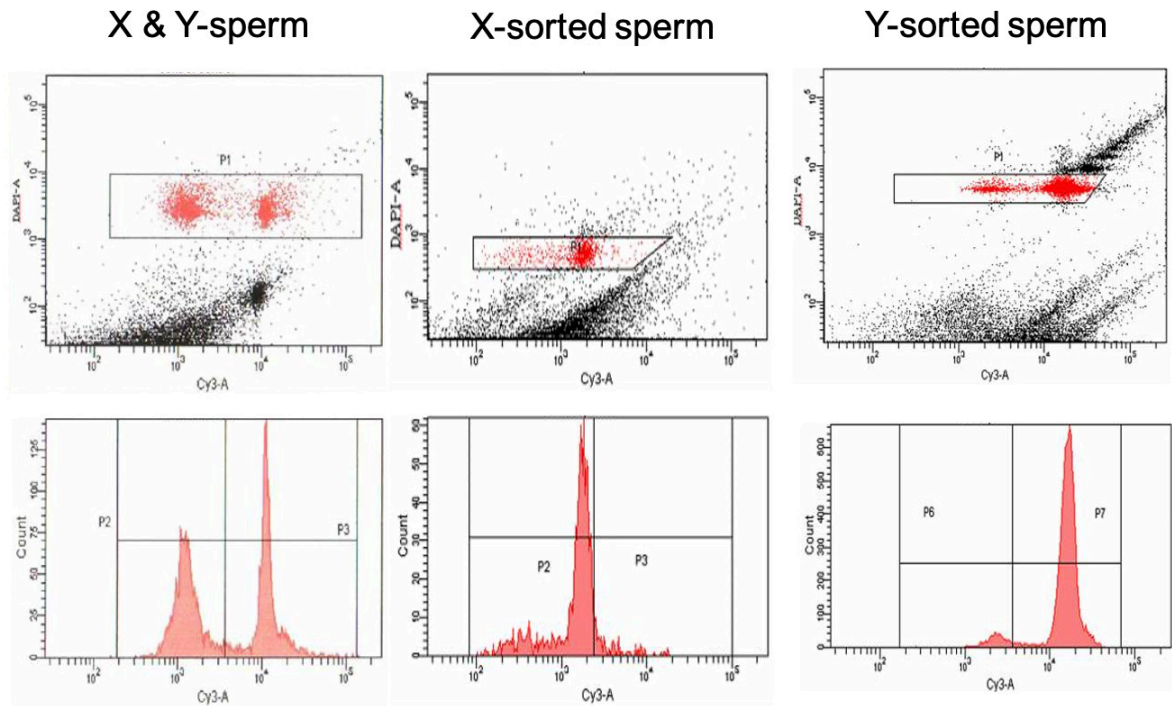


Fig. 1. Efficiency of sex-sorting by magnetic nanoparticles. The images show population of both X and Y chromosome bearing sperm, X-chromosome bearing sperm, and Y-chromosome bearing sperm. The accuracy of sorting was analyzed by the flow cytometer. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Cy3, cyanine 3.

인공수정란의 성분리

Duplex PCR 기법을 활용한 정자의 성 분리 실험은 기존 연구방법을 참조하여 실시하였다(Pomp et al., 1995). *ZFX*와 *ZFY* 유전자를 이용하였는데 이들 유전자 증폭에 사용한 프라이머는 동일한 유전자로 각각 X-염색체와 Y-염색체에 존재하고 있다. 따라서 성 분리와 관계없이 증폭이 가능하다. 또한, Y-염색체에 특이적으로 존재하는 *SRY* 유전자를 증폭하였다. 이들 프라이머 두 세트를 동시에 이용하여 PCR를 수행하면 암컷 배아는 단일 밴드 (*ZFX/Y*)만 증폭된다. 반면에 수컷 배아는 두 밴드(*ZFX*와 *SRY*)가 검출된다. 본 실험 결과 성 분리가된 X-정자로 인공수정할 때 100% (40/40) 성 분리가 되었으며 Y-정자로 수정시킨 배아는 72% (35/48)가 분리되었다. 대조군으로 쓰인 성 분리 미 정자로 수정시킨 배아는 51% 수컷(24/47), 49% 암컷(23/47)이었다(Fig. 2). Duplex PCR을 사용한 성 분리 검사 실험에는 돼지 배아는 8-세포기 및 상실배를 사용하였다. 돼지의 배우체 유전자는 4 세포기 이후에 활성화되고 많은 수의 체외배양 배아는 배반포까지 발달하지 않기 때문에 최대한 많은 수의 배아확보와 수정 후 발달을 검사하기 위해 이들 발달단계를 이용하였다(Cao et al., 2014; Kim et al., 2016; Lin et al., 2017; Fang et al., 2018). 본 실험 결과는 나노 입자를 사용해 분리한 정자가 성공적으로 수정되어 배아 발달을 할 수 있음을 보여주었다.

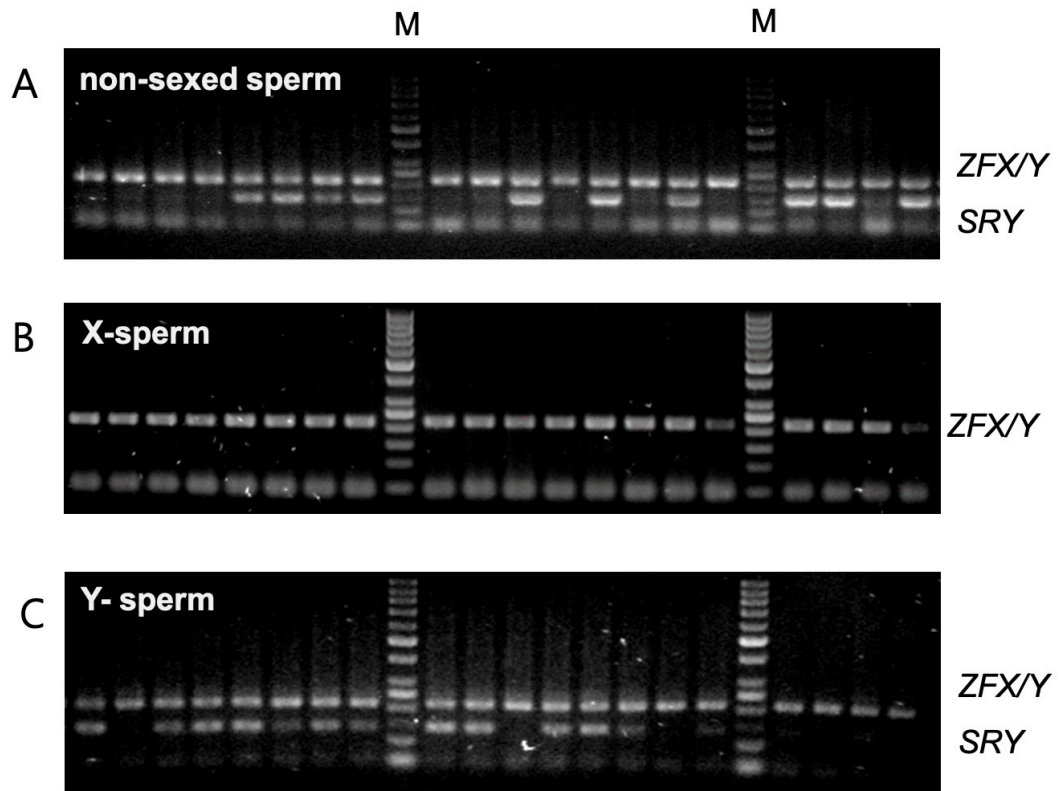


Fig. 2. Sex determination of porcine 8-cell/morula embryos. (A) Embryos fertilized by non-sexed sperm. (B) Embryos fertilized by X-chromosome bearing sperm. (C) Embryos fertilized by Y-chromosome bearing sperm. *ZFX/Y*, zinc finger protein X/Y-linked; *SRY*, sex-determining region Y; M, 100 bp marker.

Conclusion

마그네틱 입자를 활용한 정자 성 분리 기술은 기존 방법과 유사한 수준으로 정자의 성분리를 가능하게 했다. 특히, 고가의 유세포 분석 장비(flow cytometer) 없이 다량의 돼지 정자의 성 분리를 가능하게 했으면 인공수정을 통해 성 분리 효율을 검증하였으며 배아도 정상적으로 발달함을 보여주었다.

Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01359301)의 지원에 의해 수행되었습니다.

Authors Information

Hakjae Chung, <https://orcid.org/0000-0002-3127-5192>

Sunyoung Baek, <https://orcid.org/0000-0001-5130-2269>

Soojin Sa, <https://orcid.org/0000-0002-2634-5109>

Youngshin Kim, <https://orcid.org/000-0001-5466-8813>

Joonki Hong, <https://orcid.org/0000-0001-8272-1263>

Eunseok Cho, <https://orcid.org/0000-0001-5223-099X>

Jihwan Lee, <https://orcid.org/0000-0002-0040-3104>

Seungmin Ha, <https://orcid.org/0000-0002-5152-1979>

Jungho Son, <https://orcid.org/0000-0002-4001-4701>

Seunghwan Lee, <https://orcid.org/0000-0003-1508-4887>

Inchul Choi, <https://orcid.org/0000-0001-5011-2658>

Kyungwoon Kim, <https://orcid.org/0000-0003-0225-9684>

References

- Alkmin DV, Parrilla I, Tarantini T, del Olmo D, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. 2016. Seminal plasma affects sperm sex sorting in boars. *Reproduction, Fertility and Development* 28:556-564.
- Baek SY, Chug HJ, Hong JK, Cho ES, Choi I. 2020. Pentoxifylline treatment of frozen pig sperm affects sperm motility and fetal numbers. *Korean Journal of Agricultural Science* 47:657-665. [in Korean]
- Cao S, Han J, Wu J, Li Q, Liu S, Zhang W, Pei Y, Ruan X, Liu Z, Wang X, Lim B, Li N. 2014. Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of the pig embryo as revealed by deep sequencing. *BMC Genomics* 15:4.
- Domínguez E, Moreno-Irusta A, Castex HR, Bragulat AF, Ugaz C, Clemente H, Giojalas L, Losinno L. 2018. Sperm sexing mediated by magnetic nanoparticles in donkeys, a preliminary *in vitro* study. *Journal of Equine Veterinary Science* 65:123-127.
- Fang X, Qamar AY, Yoon KY, Cho J. 2018. Improved preimplantation development of porcine cloned embryos by flavone supplement as antioxidant. *Journal of Embryo Transfer* 33:255-264.
- Feugang JM. 2017. Novel agents for sperm purification, sorting, and imaging. *Molecular Reproduction and Development* 84:832-841.

- Górski K, Kondracki S, Wysokińska A. 2017. Ejaculate traits and sperm morphology depending on ejaculate volume in Duroc boars. *Journal of Veterinary Research* 61:121-125.
- Huffman SR, Almamun M, Rivera RM. 2012. Isolation of RNA and DNA from single preimplantation embryos and a small number of Mammalian oocytes for imprinting studies. *Methods in molecular biology* 925:201-209.
- Johnson LA. 1991. Sex preselection in swine: Altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 26:309-314.
- Johnson LA, Aalbers JG, Grooten HG. 1988. Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen sorted in beltsville TS (BTS), modified modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Reproduction in Domestic Animals* 23:49-55.
- Katigbak RD, Turchini GM, de Graaf SP, Kong L, Dumée LF. 2019. Review on sperm sorting technologies and sperm properties toward new separation methods via the interface of biochemistry and material science. *Advanced Biosystems* 3:1900079.
- Kim DH, Chun JL, Lee JH, Kim KJ, Kim EY, Lee BM, Zhuang L, Kim MK. 2016. Follistatins have potential functional role in Porcine Embryogenesis. *Korean Journal of Agricultural Science* 43:52-60. [in Korean]
- Lin T, Lee JE, Kang JW, Kim SY, Jin DI. 2017. The influence and role of melatonin on *in vitro* oocyte maturation and embryonic development in pig and cattle. *Korean Journal of Agricultural Science* 44:309-317. [in Korean]
- Pomp D, Good BA, Geisert RD, Corbin CJ, Conley AJ. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *Journal of animal science* 73:1408-1415.
- Rath D, Barcikowski S, de Graaf S, Garrels W, Grossfeld R, Klein S, Knabe W, Knorr C, Kues W, Meyer H, Michl J, Moench-Tegeder G, Rehbock C, Taylor U, Washausen S. 2013. Sex selection of sperm in farm animals: Status report and developmental prospects. *Reproduction* 145:R15-R30.
- Rath D, Tiedemann D, Gamrad L, Johnson L, Klein S, Kues W, Mancini R, Rehbock C, Taylor U, Barcikowski S. 2015. Sex-sorted boar sperm – an update on related production methods. *Reproduction in Domestic Animals* 50:56-60.
- von Borell E, Baumgartner J, Giersing M, Jäggin N, Prunier A, Tuytens FAM, Edwards SA. 2009. Animal welfare implications of surgical castration and its alternatives in pigs. *Animal* 3:1488-1496.