

돼지 성 분리 정자로 생산된 체외 수정란의 품질

정학재*, 최혜린**, 현상환**, 진현주*, 사수진*, 백선영*, 김영신*, 조은석*, 홍준기*

*농촌진흥청 국립축산과학원 양돈과

**충북대학교 수의과대학

e-mail:hakjaena@korea.kr

In vitro quality of porcine embryos in vitro produced with sex-sorted boar sperm

Hak Jae Chung*, Hye Rin Choi**, Sang Hwan Hyu**, Hyun Ju Jin*, Su Jin Sa*,
Sun Young Baek*, Young Shin Kim*, Eun Seuk Cho*, Joon Ki Hong*

*Swine Science Division, National Institute of Animal Science, Rural Development
Administration

**Chungbuk National University, College of Veterinary Medicine

요약

암태지의 성 선택적 대량 생산을 목적으로 정자의 X- 또는 Y-염색체를 분리하기 위한 다양한 방법들이 적용되고 있다. 본 연구에서는 nanoparticle을 이용하여 정자의 성 분리를 실시하였으며, 성 분리된 정자를 이용한 체외 수정란의 발육 및 자연 세포사를 분석하였다. 정자 성 분리를 위해 magnetic bead에 Y-chromosome 특이적 물질을 binding시켜, Y-정자를 magnetic bead와 함께 강한 자성을 이용해서 분리하였다. 정자의 분리 효율은 Y-정자에서 약 85%로 나타났다. 성 분리된 정자를 이용해서 성숙 난자(M-II stage)에 체외 수정을 실시한 결과, 초기 배 발달율 (일반 정자: 약 52.8 %, 성 분리 정자: 64.4 %)이 나타났다. 배반 포 발달율은 약 30.5 %를 나타냈다. 또한, 발육된 배반 포에서의 총 세포수를 관찰한 결과에서 평균 84 ± 5.1 의 세포들이 관찰되었다. 수정란 생존 가능성을 위한 자연 세포사(apoptosis) 분석(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling: TUNEL)에서는 일반 정자 그룹과 성 분리 정자 그룹에서 각각 유의적 차이가 없는 결과가 나타났다. 본 연구 결과에서는 nanoparticle을 이용해서 성 분리된 정자는 수정율과 수정란 발육 및 세포사에 나쁜 영향으로 작용하지 않는 것으로 나타났다. 결론적으로 nanoparticle을 이용한 돼지 정자 성 분리는 암태지 생산을 위한 새로운 기술로 적용 가능한 것을 시사했다. 본 연구 결과를 기초로 성 분리 정자의 동결 및 융해 후 정자 활력에 관련된 연구를 진행 예정으로 있다.

색인어 : 돼지, Nanoparticle, 정자 성 분리, 수정란 발달, 세포사(Apoptosis)

서론

돼지 번식에 있어서 성 선택적 자돈의 생산은 여러 장점이 있으며, 우선 개량의 가속화를 위해 암태지 생산 효율을 증진시키고, 또한 수돼지 생산을 감소시켜 거세로 인한 동물복지 및 옹취 저감을 위한 수술적 경제 손실에 대한 감소 효과를 얻을 수 있다[1, 2]. 그러나 이러한 장점에도 불구하고 돼지에서는 아직 성 선택적 자돈 생산 방법에 구체적 대안은 없는 실정이다. 한편, 젖소에서는 정자의 DNA 함량 차이에 따른 유세

포 분리를 이용한 방법으로 정자 성 분리에 이용되고 있다[3]. 돼지의 정자를 인공수정에 작용할 때 다량을 정자를 필요로 하며, 유세포 분리를 이용한 돼지 성 분리 정자는 효율성면에서 문제점을 갖고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 새롭게 고안된 돼지 정자 성 분리 방법으로는 nanoparticle을 이용한 정자 성 분리 기술이 모색되고 있다[4, 5]. 최근 우리 연구팀은 nanoparticle을 이용한 정자 성 분리 실험에서, 약 70% 이상의 X-정자를 분리 효율 개선의 결과를 발표했다[6]. 정자 성 분리 효율의 개선에 따른 정자 활력 및 생존성에 관련된 연구들은 진행된 바가 전무하며, 성 분리 정자를 이용한 수정란 발육과 생존 가

능성과 관련된 증거는 아직 밝혀진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 nanoparticle을 이용해서 성 분리된 돼지 정자의 수정란 생산 능력과 수정란 생존 가능성을 고찰하기 위해 자연 세포사에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

정액준비 및 성 분리

본 연구는 국립축산과학원 동물 실험 윤리 규정에 준해 수행되었다(NIAS2019-378). 연구에 사용된 동물은 생후 12-24개월령 두록(Duroc) 수퇘지였으며, 일반적으로 알려져 있는 수압법을 통해 신선한 정액을 채취한 후, beltsville thawing solution(BTS)와 1:1(vol/vol)로 희석에 의해 정액을 준비하였다. 희석 정액은 150 x g에서 1분간 원심 처리에 의해 정자 운동성을 저하시켜 마그네틱 비드(Noha Biotech Inc., Korea)를 $3 \times 10^9 \cdot \text{mg}^{-1}$ 의 비율로 첨가하고, Y-정자와 마그네틱 비드에 binding시켜 강한 자석으로 끌어당겨, X-정자 수집을 실행하였다.

성 분리 정자 분석

성 분리 정자의 효율 및 생존성은 유세포 분리기에 의해서 분석하였으며, 성 분리 정자는 39°C water-bath에서 30분간 incubation시킨 후, Hoechst 33342로 염색하였다. 각각의 정자 시료 50 μL 를 cytometer tube에 넣고 FACS Aria™ 세포 분리기(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용해서 분리되었다(그림 1. 성 분리 정자의 효율 및 생존성 분석 결과)[6]. 형광 검출에 사용된 UV 레이저 파장은 350~460 nm의 형광 신호가 적용되었다.

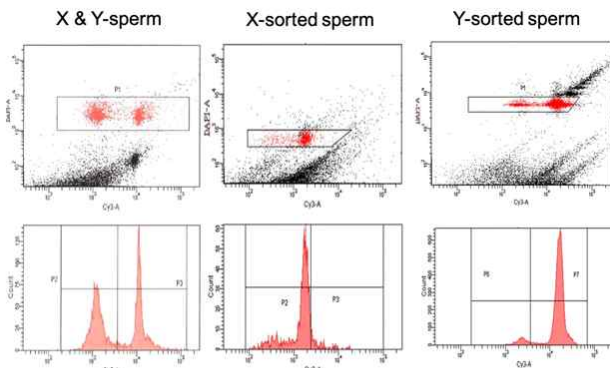


Fig. 1. Efficiency of sex-sorting by magnetic nanoparticles. The images show population of both X and Y chromosome bearing sperm. X-chromosome bearing sperm, and Y-chromosome bearing sperm. The accuracy of sorting was analyzed by the flow cytometer. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Cy3, cyanine 3.

체외수정 및 배양

성 분리 정자의 체외수정을 위해 돼지 난소를 인근 지역 도축장의 협조로 35°C (Phosphate buffered saline: PBS)에서 회수·운반하였다. 난소로부터 COC (cumulus-oocyte complex)를 채취, 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 3회 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 분리 후 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°C 에서 배양했다. 체외수정에 의해 얻어진 수정란은 난구세포를 제거한 후 체외 배양액으로 3회 세척하여 체외 배양액 50 μL 에 30개씩 넣어 38.5°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 수정란의 관찰은 배양 2일째에 난할율을 확인하였으며, 배양 6일째 배반포 형성을 관찰하였다.

세포사 분석(TUNEL Assay)

TUNEL kit는 In Situ Cell Death Detection Kit(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하였으며, 혼합은 1:9의 비율로 희석하였다. 체외수정 후 배양 7일째 생산된 배반포를 0.1% polyvinylpyrrolidone(PVP)이 첨가된 PBS 용액으로 3회 세척한 후 4% formaldehyde가 첨가된 PBS 용액에 침지시켜 4°C에서 1시간 고정시켰다. 고정된 배반포를 PVP-PBS 용액으로 3회 세척하여 0.1% Triton X-100이 첨가된 PBS 용액에 다시 침지시켜 4°C에서 30분간 냉장 보관한다. 그리고 PVP-PBS 용액으로 3회 세척하여 TUNEL kit를 혼합한 용액에 침지시켜 38.5°C, 5%, CO₂ 배양기에서 1시간 배양 후 PVP-PBS 용액으로 3회 세척한 후 DAPI가 첨가된 10 μL mounting medium으로 고정된 배반포를 옮겨

형광현미경(Olympus, Japan)으로 배반포의 전체 세포수와 세포 사멸 수를 조사하였다.

통계 분석

본 연구에서 수행된 실험은 적어도 3회 이상은 반복되었다. 모든 데이터는 means $\pm$ SD 값으로 나타냈고, 수정란 발달율과 세포수 및 세포사의 데이터는 one-way ANOVA 및 Student's T-test 분석에 의해 유의차 검증을 적용하였다. 유의차는 $p < 0.05$ 수준에서 인정되었다.

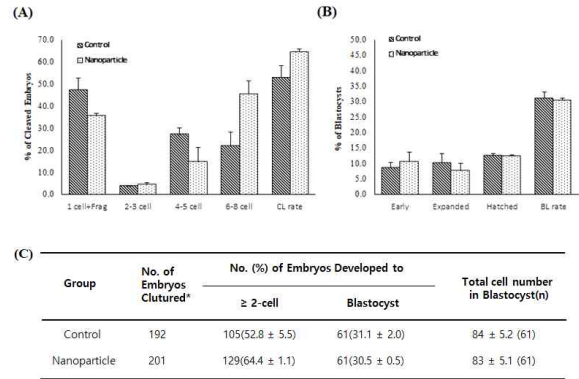
결과

양돈 산업의 경제성 가치는 개량 및 웅취 저감 측면에서의 성 선택적 생산이 요구되고 있다. 정자의 성 분리를 적용한 다양한 방법들은 지속적으로 연구되고 있으며, nanoparticle을 이용한 정자의 성 분리 효율은 약 85% 수준을 나타내고 있다 (Fig. 1). 최근 연구에서 nanoparticle을 이용한 당나귀 정자의 성 분리 효율은 약 90% 이상을 보고한 바가 있으며[7], 우리들이 진행한 돼지의 정자 성 분리 효율과 매우 유사한 결과를 나타내고 있다. 이렇게 nanoparticle을 이용한 경우 정자는 효율적으로 성 분리가 가능한 것으로 증명되었다. 이러한 결과를 기초로 하여 성 분리된 정자를 수정란 생산을 적용할 경우, 배 발달 과정에서의 효율성을 고찰하고자 체외수정 및 배 발달 과정에서의 생존성 분석을 수행하였다.

Nanoparticle을 사용해서 체외 숙성 난자(Metaphase II: M-II)를 이용해서 체외수정을 유도했을 경우 일반 정자의 체외 수정율과 유사한 난할율(48.7 ± 3.7)과 배반포 발달율(83 ± 5.1)로 나타났다(Fig. 2 and Table 1).

성 분리 정자를 이용해서 체외에서 생산된 배 반포에서 생존 가능성 고찰을 위해 실시한 세포수 및 세포사(apoptosis) 분석 결과에서는 blastocyst formation은 정상적인 발육 양상을 보였으며, 세포수에서도 일반 정자(대조군)으로 생산된 배 반포와의 비교에서 유의적 차이는 나타나지 않았다. 또한, 배 반포의 생존성과 관련된 세포사 분석(TUNEL)에서는 대조군의 배 반포와 성 분리 정자를 이용한 배 반포를 비교했을 때, 유의적 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과들을 근

Fig. 2 and Table 1. Effects of Nanoparticle on developmental ability of porcine embryos in vitro



*: Three times replicated

n: The number of blastocysts examined

Data are means $\pm$ SD.

Values with different superscript letters within a column not significantly differs ($p < 0.05$).

거들은 돼지에서 nanoparticle을 이용한 성 분리 정자는 수정란 발달과 세포 사에 영향을 미치지 않았다. 최근, 정자의 질적 개선에 있어서 nanoparticle이 효과적으로 작용한다고 보고되어지고 있다 [8].

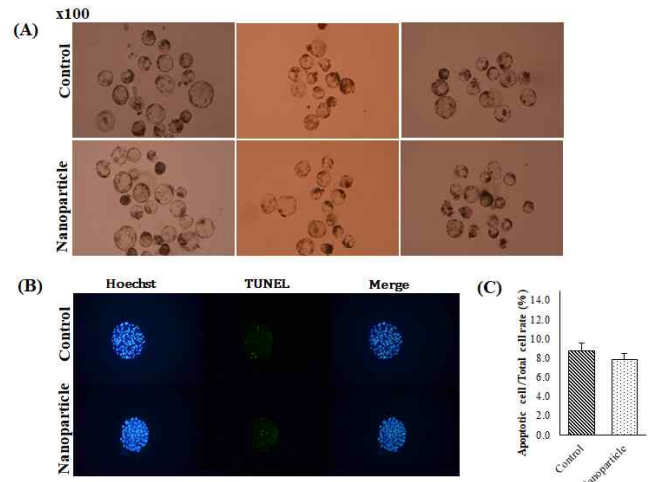


Fig. 3. Immunofluorescent image of porcine blastocysts undergoing apoptosis in vitro.

(A) Blastocyst formation of nanoparticle. (B) TUNEL reaction. All magnifications = X 100.

본 연구 결과를 근거로 하여, 향후 nanoparticle에 의해 성 분리된 정자에 대한 동결 정액 생산에 관련된 연구를 진행할 계획에 있다.

참고문헌

- [1] von Borell et al., "Animal welfare implications of surgical castration and its alternatives in pigs". Animals, Vol.3, pp.1488-96, 2009.
- [2] Rath et al., "Sex-sorted boar sperm - an update on related production methods". Reproduction in Domestic Animals, Vol.50, pp.56-60, 2015.
- [3] Rath D, Johnson LA. "Application and commercialization of flow cytometrically

- sex-sorted semen". *Reproduction in Domestic Animals*, Vol. 43, suppl, pp. 338-46, 2008.
- [4] Rath et al., "Sex sorted boar sperm-An update on related production methods". *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 50. suppl. pp. 56-60, 2015.
- [5] Feugang et al., "Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility". *Theriogenology*, Vol. 137, pp. 75-81, 2019.
- [6] Chung et al., "In vitro fertilization using sex-sorted boar sperm mediated by magnetic nanoparticles". *Korean Journal of Agricultural Science*, Vol.47, pp.979-85, 2020.
- [7] Domínguez et al., "Sperm sexing mediated by magnetic nanoparticles in donkeys, a preliminary in vitro study". *Journal of Equine Veterinary Science*, Vol.65, pp.123-127, 2018.
- [8] Feugang et al., "Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility". *Theriogenology*. Vol.137, pp. 75-81, 2019.