

돼지동결정액 생산기술개발의 방향과 실제(I)



이 장 희 농학박사
(축산기술연구소 종축개발부)

1. 최근의 인공수정 및 동결정액제 조기술개발 동향

경제동물에 있어서 동결정액으로 이루어지는 인공수정은 축우산업에서 번식능력 및 생산성 향상에 끼친 영향은 매우 컸다. 오늘날과 같은 우수한 능력의 젖소 종모우가 선발되어 동결정액으로 인공수정할 수 있다는 사실은 종모우 각 개체별의 유전정보를 활용하여 축군 또는 개체의 개량목적에 부합되게 계획교배가 행해질 수 있기 때문이며 그 동안의 인공수정 및 동결정액제조 기술개발의 성과를 입증해 주는 대표적인 예의 하나이다.

현재까지 소에서만뿐만 아니라 경제동물(재래가축, 사슴, 개 및 각종 실험동물)의 동결정액의 수요가 증대되고 필요성이 확대되면서 동결정액의 제조기술은 유전자원의 보존 차원에서도 가치가 매우 높다. 최근에는 종전의 가축개량목적 이외에도 생물다양성협약('95.1.1.발효)에 의한 국가적 차원의 유전자원과 유전기술에 대한 권리규정 및 이익공유를 위한 유전자원의 보존이 매우 절박한 상태에 놓여 있다. 이러한 관점에서 앞으로 돼지에 있어서도 더 개선되어야 할 동결정액 제조기

술의 방향과 최근 급속도로 발전하고 있는 첨단 유전공학기술과의 관계를 살펴보는 것은 체외수정 및 수정란이식 등의 새로운 기술도입과 발전 및 방향전환에 도움이 될 것이다.

가. 동결정액의 제조기술개발 방향

소 및 돼지 동결정액의 제조와 보급이 '60년대 이후 여러방면으로 다양하게 연구되고 향상되어 왔으나, 그 이후로 현재까지는 큰 변화없이 제조 보급되고 있는 실정이다. 그러나 지금까지 우수한 종축으로부터 정액생산을 최대화할 수 있는 방안과 정액생산기관별로 동결보존액을 포함한 동결정액 제조방법이 특성있게 개선되어 왔으나 앞으로 첨단 유전공학과 결부된 동결정액제조기술의 개선이 더욱 요구되고 있으며 개선의 여지는 다음과 같다.

(1) 희석액의 주성분으로 쓰이는 우유와 난황이 계속 이용되어야 하는가에 대한 문제이다. 수정란 동결에 쓰이고 있는 합성배양액과 같은 형태의 동결정액 보존액을 개발하므로써 바이러스와 같은 병원체의 완전제거가 가능하기 때문이다.

(2) 동결보존액에 첨가되는 항생제의 내성 문제이다. 번식장애와 유산 등에 관련된 ureaplasma, mycoplasma, haemophilus 등에 대한 병원체의 완전제어가 불가능하므로써 새로운 항생제의 조합 즉 gentamycin, tylosin, lincospectin 등의 항생제 첨가가 권장되고 있으며 앞으로 이런 문제의 해결을 위해서 차후 특이적 병원체에 대한 단클론항체의 개발에 의한 차세대 항생제의 이용이 고려되고 있다.

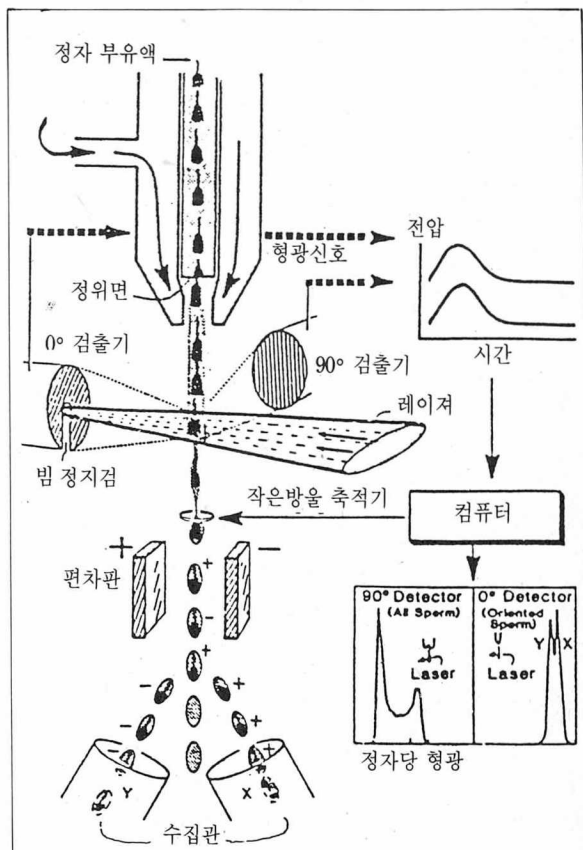
(3) Glycerol 무첨가 및 대체 동해방지제의 개발이다. 수정란동결에 이용되는 침투성(glycerol, DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, acetamide 및 각종 알콜) 및 비침투성 동해방지제(sucrose, glucose, lactose, trehalose, raffinose 등의 당류, polyvinylpyrrolidone, propylene glycol 및 고분자단백물질 등)의 적절한 이용으로 무해하고 간편한 동결보호제의 첨가 기술이 개발되어야 한다.

(4) 동결정액의 스트로우내 분주봉인 방법의 개선이다. 한개의 스트로우내에 동결정액만 포장하는 형태를 2부분으로 구분, 즉 농축된 동결정액과 용해액 또는 동결정자와 정자수정능획득 유기물질을 공유케 함으로서 용해후 주입직전 또는 주입과 동시에 한 과정으로 최적 수정조건을 제공하여 수태율을 향상시킬 수 있는 기술이 개발되어야 한다.

나. 동결정액과 관련된 첨단기술

(1) 정자의 sexing(성판정)

포유동물의 성결정은 수정시에 이뤄지며 성염색체가 XX인 수정란은 암컷, XY인 것은 수컷으로 발생하게 된다. 이러한 성결정원리에 근거하여 수정이 이뤄지기 전에 X와 Y염색체를 갖는 정자를 분리이용함으로써 신생자의 성비를 변화시키려는 노력이 벌써 오래전부터 시도되어 왔으나 아직까지 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있다. 그러나 소를 중심으로 하여 수정란이식기



〈그림 1〉 세포분석기의 구조와 정자분리 원리

술의 산업화가 실현되고 아울러 최근 분자유전학과 유전공학기술의 성과가 수정란이식기술에 도입됨에 따라 수정란의 성판별에 대한 관심이 학계와 산업계에서 모두 고조되어 왔으며 그동안의 연구 결과도 매우 고무적이다. 지금까지 X, Y 정자의 분리와 수정란의 성판별에 여러가지 방법들이 시도되어 왔으나 여기서는 그 중에서도 산업화의 가능성이 있고 더욱 개발이 활발해지고 있는 몇가지 방법만을 선정하여 소개토록 한다.

(가) 세포분석기(flow cytometry)의 이용

값비싼 기기를 이용해야 하는 단점은 있으나 X, Y정자의 정확한 구분 및 분리능력과 분리속도가 매우 우수한 방법의 하나이다. 포유류의 X, Y 정자속에 있는 DNA 함량의 상대적 차이가 3.0-7.7%로 극히 작지만 DNA특이적 형광염색을 통해서 〈그림 1〉에서와 같은 원리에 의해 정자의

〈표 1〉 가축정액에서 정자분리의 정확도

축	종	XY정자, DNA차이	Y 분리구 Y 정자(%)	X 분리구 X 정자(%)
돼	지	3.7	91	83
	소	3.9	93	92
토	끼	3.0	84	88

구분과 분리가 가능하다. X, Y 정자의 DNA 함량 측정은 형광강도에 따라 X, Y 정자의 분리수집으로 정자가 강한 전장(electrostatic field)을 통과할 때 이뤄지게 된다.

〈표 1〉은 이 기기에 의한 정자분리의 정확도를 나타낸 바 토끼의 경우 X, Y 정자분리후 암컷에 외과적으로 주입한 실험에서 암컷 94%, 수컷 81%의 성별판정 정확도를 얻을 수 있었다. 앞으로 이 기기의 이용은 암수정자의 분리에 의한 수정란생산에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

(나) Percoll밀도균배법의 이용

성염색체의 형태(크기, 용적), 밀도, 전기적 하전, 운동속도 등이 X, Y정자간에 차이가 있다는 근거에 기초하여 X, Y정자를 물리적 방법으로 〈그림 2〉와 같이 분리하게 된다. 여러단계의 percoll밀도를 정하고 그 위에 정자부유액을 넣은 다음 원심분리후 상층부위에서 Y정자를, 하층부위에서 X정자를 얻게 된다. 이 방법에서 소의 경우에는 X 또는 Y정자를 75% 얻을 수 있었으며, 체외수정방법으로 생산된 수정란의 성판정에서는

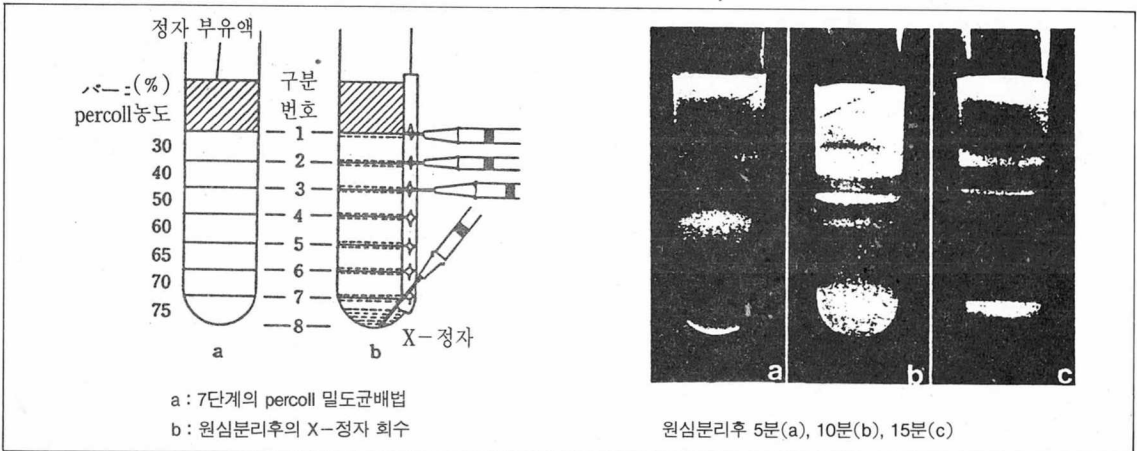
75%가 수컷, 92%가 암컷인 것으로 확인된 바 있다.

(다) 조직적합성 H-Y 항원법 이용

용축의 비장을 적출하여 m-PBS로 3회 정도 세척한후 균질기로 균질화하여 7,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 다시 1,500rpm에서 10분간 재원심분리하여 침전된 비장세포를 $10^7 - 10^8$ cell/ml의 농도로 조정하여 동량의 FIA(Freund's Incomplete Adjuvant : Gibco)와 혼합하여 주1회 6주 동안 5-10ml씩 동종자성에 근육주사하여 H-Y항체가 생성되도록 한다. H-Y항체 생성여부 및 역가를 검사한 다음 다량채혈에 의한 면역항혈청을 생산하고 생산된 H-Y항혈청과 보체(토끼혈청)를 함유한 배양액에 정자사멸물이 60% 이상인 것만을 H-Y항혈청으로 이용하며 이때 살아있는 정자는 자성정자로 간주한다.

(2) 체외수정 및 정자의 미세주입

체외수정은 자연배란된 또는 인위적으로 성숙된 난자와 정자(신선, 동결 또는 정소상체미부정자)를 체외 또는 체내에서 수정능획득을 유도하여 시험관내에서 수정시키는 것을 말하며 정자의 미세주입에 의한 수정은 미세조작기와 미세주입기를 이용하여 1~2마리의 정자를 난자의 위난강 혹은 세포질내에 주입시키는 기술을 말한다.



〈그림 2〉 percoll 밀도균배 원심분리법에 의한 XY 정자분리

<표 2> 돼지에 있어서 동결정액 생산에 필요한 기구 및 장비

구 분	품 명	용 도	보조 기구 또는 장비	비 고
정액채취용	의빈대, 인공질 정액수집용기	정액채취 정액수용	인공질, 포피소독액 위생복, 위생장갑 등	- 정액채취실에서 실시
정액검사용	현미경 슬라이드가온판 혈구계산판	정액성상 검사 정자활력유지 정자농도검사	슬라이드글라스, 카버글라스, 마이크로피펫, 광전비색계, 소독액 백금이, Hot-block	- 오염정도, 기형을 고려 - 직진정자수 고려
정액회석용	비이커, 시험관 회석용 피펫 항온수조 천평 pH meter 교반기	정액혼합용 정액온도 유지 시료 정량 산도 측정 정자/시료혼합	자동회석기, 크린벤치 B.O.D. 배양기 메스실린더 간이 pH meter Vortex mixer, 진탕기	- 정액 및 회석액을 반드시 등온에서 혼합 - 회석액의 pH - 정자/시료 균질
소독용	자불소독기	기구/초자소독	고압 또는 E.O 가스멸균기, 알콜소독분무기	- 경우에 따라 살균, 멸균선택
냉각	냉장고(5℃)	시료 냉각	비이커, 온도계, 자동세포동결기	- 냉각시간 고려 - 자동동결
포장	스트로우, 연속주입기	정액수용 용기 주입 및 봉입	자동포장기, 자동분주기 라벨기 등	- 정액에 개체 표시 - 정자수 고려
동결 및 보관	액체질소통 냉장고(5℃)	정액보관 온도유지	B.O.D. 배양기, 항온수조	- 예비동결 교반

* 동결보존액 제조시 : 천평, 교반기, 삼각플라스크, 메스실린더, 비이커, pH meter, 기타 관련 기기의 약세사리 및 관련시약

이와같이 체외수정 또는 미세주입에 의한 수정은 정자의 가치가 지난 날 정자로 이루어진 정액개념의 수정을 정자도 한마리 한마리의 개체단위중심의 중요성이 부각된 셈이다. 최근에는 정자보다도 더 낮은 단위의 정자핵만으로도 수정과 수태가 가능해짐으로서 정자의 활용범위는 더욱 넓어졌으며 동결정액 제조기술도 정자개체단위의 운용과 같이 더 세분화될 전망이다.

2. 동결정액제조법

가축개량의 수단뿐만 아니라 유전자원의 보존차원에서도 가축 및 경제동물의 동결정액은 그 가치가 매우 높다. 최근 유전공학에서도 분자생물학적 수준의 유전자분석과 보존이 가능하나 가축의 번식효율을 높이기 위하여는 정자, 난자 및 수정란차원의 보존이 더 절실하다. 그러나 아직까지의 산업적 경제적 효과는 정자의 보존 및 이용측면이 더 효과적이다. 최근 유전공학분야중에서도 반복적인 정자준비에 있어서는 동결정자의 편리함이 높게 인식되어 다양한 동물에서의

동결정액이 개발되고 있다.

일반적으로 세포동결시 초저온하에서도 세포를 생존시키기 위하여는 영하 이하의 유해한 온도역(-15~-25℃)을 어떻게 잘 통과하여 안전한 초저온에 도달시키느냐가 중요한 과제인바 용액중에 부유하고 있는 정자와 같은 세포의 동결은 먼저 세포 주위용액의 동결로 시작되어 용질의 농축과 삼투압, pH 및 세포의 탈수현상 등의 변화를 거친다. 그 후 세포내 수분이 동결되는 동안에는 세포내 원형질의 콜로이드상태의 변화에 따라 동결후 생존성에 차이가 발생한다. 이때 영향하는 요인으로는 동결속도, 세포막의 투과성 및 보존액을 구성하는 용질을 들 수 있다. 그러므로 이러한 요인들을 적절히 조절하여 동결전과 거의 같은 수준의 생존성을 보장할 수 있는 것이다.

가. 동결정액제조시 이용되는 기구 및 시약

(1) 기구 및 장비

동결정액제조시 갖추어야할 기구 및 장비는 <표 2>에서 나타낸 바와 같다. <다음호 계속>