

체외수정을 위한 돼지정액의 동결과 포장

이 장 희

축산기술연구소

동결정액의 질은 인공수정이나 체외수정의 성공률에 큰 영향을 미친다. 동결처리동안 발생하는 정자의 손실에는 많은 요인이 작용한다. 동결융해후 포유동물정자의 생존성에 미치는 요인에는 동결보존액, 동결보호제, 냉각속도(시간) 및 포장방법 등이 있다. 최근 포유동물 정자의 동결보존액으로 난황무첨가 동결보존액(비-생체활성물질 첨가:식물성)이 개발되어지고 있으며, 돼지 정액의 동결보존액으로는 BF5 및 LYE(lactose egg yolk extender)가 주로 사용되어져 왔다. 정자의 동결보호제로서 Glycerol은 돼지를 포함한 많은 포유동물정자의 침투성 동해보호제로서 이용되어져 왔으나 낮은 농도에서도 유해성이 인정되고 있기 때문에(Gilmore 등, 1996; Arreseigor 등, 1998), 최근 glycerol보다 분자량이 낮은 침투성 또는 비침투성 동해보호제들이 수정란을 비롯한 다른 세포들의 동결보존에 이용되어지고 있다. 돼지정액에 있어서 냉각속도는 정자의 저온충격(cold shock)에 대한 특이성 때문에 많이 연구되어져 왔으나 저온충격의 온도영역은 연구자들마다 다소 차이가 있으며 예비동결방법도 다양하게 시도되어져 왔다. 또한 동결정액은 인공수정뿐만 아니라 체외수정, 수정란이식과 같은 자궁 또는 난관내 정액주입, 난소의 성숙난포내 정자주입(가설), 암수분리 및 동결된 정자의 난자내 미세주입 등에 광범위하게 이용될지 모른다. 더 나아가 이러한 분야에서 이용되어지는 정자의 수와 정액량은 점점 줄어들고 있는 추세이기 때문에 특히 정자자원의 보존과 이용의 효율을 제고시키기 위해서는 용도에 맞게 그 부피와 수를 최소화할 필요가 있다. 이러한 정자의 보존과 이용성 때문에 동결정액의 포장방법은 앰플, 펠렛, straw, 알루미늄 팩 및 캡슐 등의 포장형태로 다양하게 발전되어져 왔으며, 동결정자의 이용성을 높이기 위한 융해후 정자의 전처리에 대해서도 많은 방법들이 시도되어져 왔다. 특히 체외수정에 성공하기 위해서는 동결융해된 정액

으로부터 활력정자를 분리하는 것이 필수적이기 때문에 동결정액을 이용한 체외수정은 동결정액내에 포함된 정상물질, 동해보호제 및 난황을 제거하고 활력정자를 얻기 위하여 swimp-up, Percoll gradient 및 glass wool 등의 정자 분리기술이 이용되어져 왔다. 특히 Percoll gradient cnetrifugation(Percoll 중층 원심분리법)은 활력정자와 세균이 없는 정자를 동시에 얻기 위한 수단으로 이용되고 있으며(Grant,S.A., Parent et al., 1997), 최근 flow cytometric analysis(유동세포분석법)는 정자의 기능적 능력을 검사하기 위한 수단과 암수정자를 분리하기 위한 수단으로 이용되고 있다(Garner and Johnson, 1995). 한편 정자의 기능적 능력에 대해서는 활력, NAR (noamal apical ridge) 및 생존율을 조사하는 평가방법들이 이용되어지고 있으며, 최근에는 정자의 생존성을 검사하는 방법으로써 SYBR-14/PI 염색법에 의한 flow cytometric analysis가 이용되어지고 있다(Garner and Johnson, 1995).

그러므로 본 연구는 돼지정액의 동결에 있어서 동결보존액(BF5, LYE, Soejima 및 modified Soejima), 동해보호제(Glycerol, Ethylene glycol 및 Propylene glycol), 냉각속도(2, 4 및 8시간), 예비동결(Dry ice-Pellet, Dry ice-Straw 및 LN2-VAPOR) 및 포장방법(10, 50, 100, 250, 500, 2000 μ l 및 Discontinuous Percoll gradient packing)이 동결융해후 돼지정자의 기능적 능력에 미치는 영향을 조사하고 동결처리과정동안 처음(신선정액), 냉각, 예비동결 및 동결융해후의 각 단계에서 정자의 기능적 능력에 대한 평가방법들을 비교하여 체외수정뿐만 아니라 다양한 목적에 이용될 수 있는 동결정액생산 방법을 제시하고자 하였다.

돼지정액의 동결보존액으로서 BF5, LYE, Soejima 및 modified Soejima를 사용하였을 때 modified Soejima보존액(44.5 ± 6.4)이 다른 보존액보다 동결융해후 활력이 높았으며, 이들 동결보존액으로부터 동결처리과정동안 NAR율을 조사한 결과 정자의 손실은 예비동결 단계에서 가장 높게 나타났으며 동결융해후 NAR율은 modified Soejima보존액에서 42.8%로서 다른 보존액보다높게 나타났다. BF5와 M-Soejima보존액으로 동결처리하는 동안 Dry ice-Pellet, Dry ice-Straw 및 LN2 vapor-Straw방법으로 예비동결하였을 때 LN2 vapor-Straw 예비동결방법이 동결융해후 45.0 %의 활력을 나타내어 BF5보존액의 다른 예비동결방법보다 동결성적이 좋았다. M-Soejima보존액의 2차 희

석액에 Glycerol(Gly, 4%), Ethylene glycol(EG, 0.2M), Propylene glycol(PG, 0.2M), Gly(2%)+EG(0.1M) 및 Gly(2%)+PG(0.1M)를 첨가하였을 때 동결융해 후 활력 및 NAR율은 Gly+PG의 혼합첨가시(31.3% / 39.5%)가 다른 첨가구보다 다소 높았으며 생존율은 Gly+EG첨가구가 21.2%로 다른 첨가구보다 다소 높았다. 한편 M-Soejima보존액의 2차 희석액에 Caffeine(2mM), Heparin(100 ul/ml) 및 Caffeine +Heparin를 첨가하였을 때 동결융해후 활력은 Caffeine첨가구가 61.7%로 가장 높은 활력을 나타내었으며 단독 혹은 혼합첨가가 대조구(무첨가)보다 높은 활력을 나타내었다. M-Soejima보존액으로 동결처리할 때 냉각과 2차 희석까지 소요되는 시간을 2, 4 및 8시간으로 처리한 결과 동

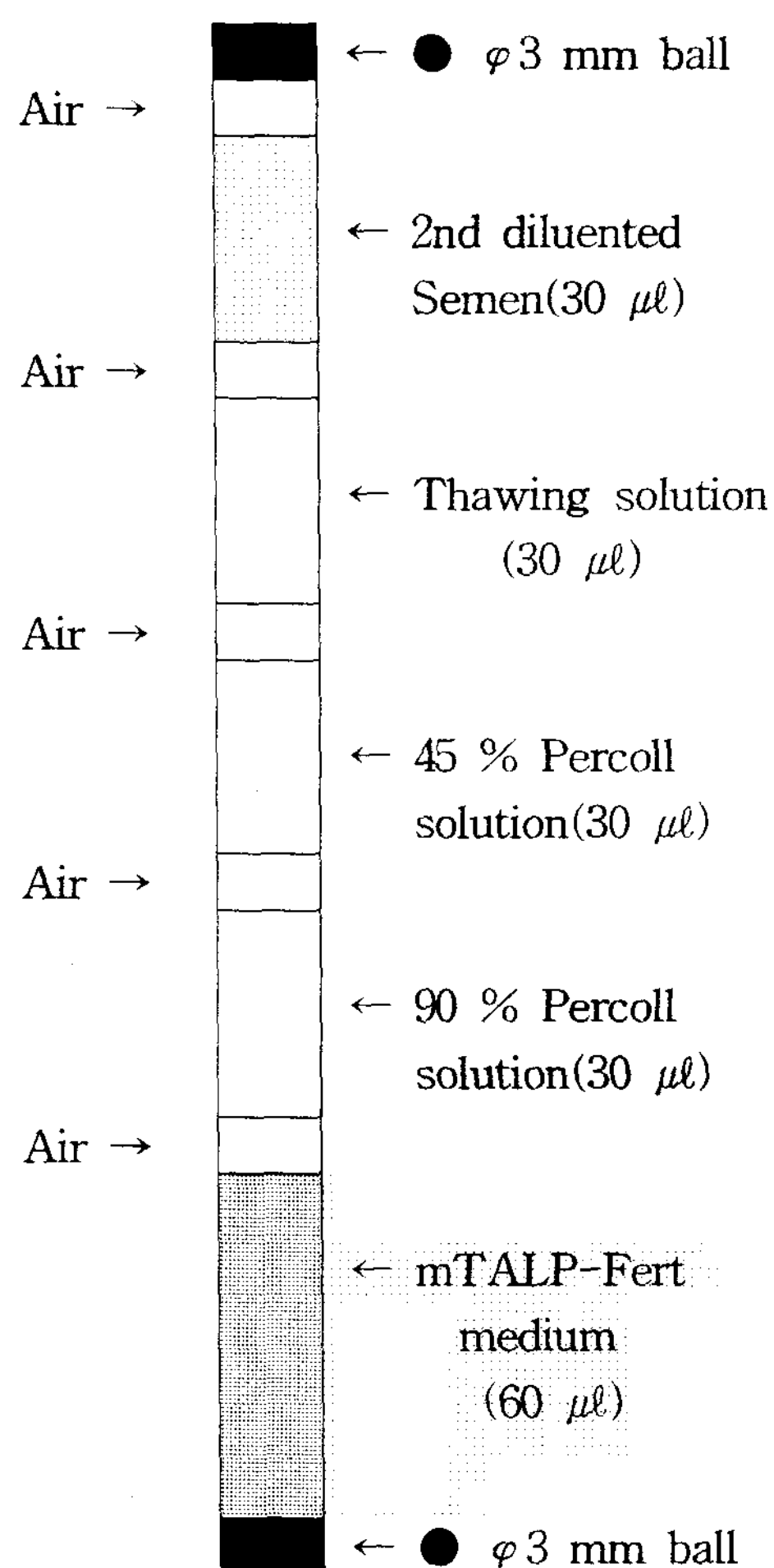


Fig. 1. Percoll gradient packing of straw for collection of motile sperm and minimize bacterial contamination after freezing-thawing of boar semen.

결융해후 활력 및 생존율은 처리간에 큰 차이가 없었으나 NAR율은 처리시간이 길어질 수록 다소 높은 경향을 나타내었다. 5개체의 종모돈으로부터 정액을 채취하여 동결처리과정동안 활력, NAR율 및 flow cytometry에 의한 생존성을 검사하여 비교해본 결과 저액처리의 처음단계인 신선정자의 경우에는 첨체이상유무에 대한 NAR율의 평가가 활력평가나 flow cytometry에 의한 생존성 평가보다 다소 높게 평가되는 경향이었으며 예비동결 및 동결융해후의 평가에서는 flow cytometry에 의한 생존성 평가가 활력이나 NAR율의 평가보다 낮게 평가되는 경향이였다. M-Soejima보존액으로 처리된 돼지정액을 10, 50, 100, 250, 500, 2000 μ l로 포장하여 동결하였을 때 융해후 활력은 0.5 ml straw(500 ul)에서 44.0%로 다른 포장용기보다 다소 높았으나 NAR율이나 생존율에서는 큰 차이가 없었다. 동결정액을 straw내에서 직접 융해하기 위해서 정액과 융해액을 1:1 및 1:50 비율로 분리 포장하여 동결하였을 때 1:1 분리포장이 1:50 비율의 분리포장보다 더 높은 활력, NAR율 및 생존을 나타냈으며 융해액으로 Androhep, BTS, M-Soejima 및 mTALP-Fert배양액을 사용한 결과 M-Soejima융해액이 다른 융해액보다 높은 활력, NAR율 및 생존율을 나타내었다. 또한 M-Soejima융해액으로 straw내에서 직접 융해되는 동결처리는 38°C에서 20초간 융해후 융해액과 희석하는 대조구보다도 높은 활력과 생존율을 얻었다. 돼지정자의 동결융해후 원심분리에 의하여 직접 활력정자를 얻기 위하여 Fig. 1과 같이 Percoll gradient 중층으로 포장하여 동결융해후 300 x g에서 원심분리 하였을 때 Fraction 4에서 70.0%의 활력정자를 회수하였으며, 이 부분의 상대적 정자농도는 1.7×10^7 cell이었다. 그러나 동결하지 않은 Percoll gradient 중층 포장의 경우에는 Fraction 5에서 가장 높은 활력정자(90.0%)와 상대적 농도(4.9×10^7 cell)를 얻었다.

Percoll gradient 중층으로 포장된 동결정액을 300×g 및 600×g에서 원심분리하였을 때 600×g의 경우에는 Fraction 3과 5에서 가장 높은 활력정자(40.0%)를 얻었으며 가장 높은 정자의 상대적 농도는 Fraction 5(3.0×10^7 cell, 동결된 총정자수의 33.3%)에서 얻었다. 또한 bacteria-free 정자와 활력정자를 동시에 얻기 위해서는 300×g의 경우에는 Fraction 4에서, 600×g의 경우에는 Fraction 5에서 양질의 정자를 회수할 수 있었다(Table 1).

이러한 결과는 체외수정, 미세정자주입 및 어떤 특정 목적을 위해 반복 사

용할 경우 적은량의 동결정액 포장기술의 새로운 영역을 시사해 주며, 동결정액의 이용성을 더욱 확대시킬 수 있을 것으로 사료된다. 한편 M-Soejima보존액은 동결보존액뿐만 아니라 용해액(난황 무첨가)으로서도 이용될 수 있음을 제시하였으며, 정액의 동결보존액에 이용되는 동해보호제의 새로운 첨가방법을 제시해 준다.

Table 1. Effect of centrifugal force on motility(%), relative concentration, and infection of spermatozoa after thawing of boar semen frozen with Percoll Gradient packing

Layer of straw* (Fraction)	300×g		600×g		Degree of pollution	
	Motility	Relativ conc.(%)	Motility	Relativ conc.(%)	300×g	600×g
1	10	0.3(2.8)	5.0	0.1(1.1)	Dirty	Some dirty
2	30	0.5(5.6)	20.0	0.2(2.2)	Very dirty	Dirty
3	50	1.5(16.7)	40.0	1.0(11.1)	Some dirty	Some clear
4	70	1.7(18.9)	25.0	1.7(18.9)	Some clear	Very clear
5	10	3.5(38.9)	40.0	3.0(33.3)	Very clear	Clear
6	0	1.5(16.7)	10.0	2.5(27.8)	Clear	Some dirty