

동결융해 돼지정자의 수정능에 대한 Glass Wool여과법과 Swim-up법에 의한 정자 선별의 효과

박수봉 · 고대환* · 정진관
축산시험장

Effect of Sperm Selection by Glass Wool Filtration and Swim-up on the Fertilizing Capacity of Frozen-thawed Boar Sperm

S.B. Park, D.H. Ko* and J.K. Jung
Livestock Experimental Station, RDA

SUMMARY

Glass wool filtration and swim-up method resulted in increasing to 58.3% and 62.7% of the progressive motility in frozen-thawed boar sperm, compared to 34.2% in the untreated sperm. Glass wool filtration tended to be more successful than swim-up method for the survival after incubation of 38.5°C for 3h. Sperm recovered by both the swim-up method and the glass wool filtration method were tested in an *in vitro* fertilization to determine which of the two techniques would yield sperm with high fertilizing capacity. The results indicated that there was a significantly ($p < 0.05$) higher percentage of oocytes fertilized by sperm selected by glass wool filtration method than that by the swim-up method.

(Key words : boar sperm, glass wool filtration, swim-up, fertilizing capacity, motility)

서 론

돼지의 정자는 온도쇼크에 약하며 특히 동결 보존 후에 수정율이 현저하게 저하된다(Johson 등, 1981). 동결융해된 돼지정자는 배양시 짧은 생존시간을 가지고 있고 이 시간은 수정을 위한 충분한 시간이 되지 못할 수 있다. 그러나 동결정자는 같은 특성을 가진 정자들의 장기간 이용을 가능하게 해주며 특히 체외수정의 이용에 있어 효율성을 증진시켜준다. 그러므로 최근 돼지 동결정자를 이용한 체외수정계 확립을 위한 연구가 시도되어졌으나 (Nagai, 1988; Park 등, 1980) 소와 같은 좋은 수정

율을 얻지 못하고 있다.

체외수정의 적정조건 검토를 위해서는 좋은 질의 정자를 확보하는 것이 우선된다. 그러나 돼지의 경우 동결 융해후 정자의 정상성 유지는 30%정도에 불과하다 (Kato 등, 1980) 그러므로 좋은 질의 정자를 선별할 수 있는 방법의 도입은 체외수정율을 높일 수 있는 가능성이 있다. 생존 정자를 분리하기 위한 방법들은 다양하게 연구되어 왔고 이미 소에서 swim-up방법 (Parrish 등, 1986)과 percoll원심분리법 (Utsumi 등, 1988)은 일반화 되어졌으며 상기방법외에 glass wool여과법 (Jeyendran 등, 1986; Rhemrev 등, 1989; Katayama 등, 1990),

*상지병설전문대학(Sangji Junior College)

이 논문은 1991년도 동물자원연구센터 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

albumin층 통과법 (Perrone와 Testrat, 1985)과 glass bead여과법 (Lechtzin 등, 1990) 등이 이용되고 있다. 본 연구에서는 돼지동결융해정자에 대한 glass wool여과법과 swim-up방법의 효율성 비교와 분리법에 의해 얻어진 정자의 수정능에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

1. 정자의 준비와 처리

돼지정자는 수압법에 의해 이중거여를 통과시켜 채취되었으며 고농도 정자를 분획채취하였다. 동결을 위해 정자는 상온에서 2h 정치시켜 20℃까지 서서히 온도를 하강시킨 후 정장을 제거하기 위해 300g에서 20분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 정자는 m-BF5 희석액 (Soejima 등, 1983)으로 10×10^8 /ml 농도로 부유시킨 후 냉상고에 넣어 2h에 걸쳐 5℃까지 냉각시켰다. 그 정자는 2% glycerol을 함유한 m-BF5 희석액으로 5×10^8 /ml 농도로 희석한 후 Nagase와 Niwa (1964) 방법에 준하여 dry ice 위에서 0.3ml의 펠렛으로 동결시키고 액체 질소 등에 보존하였다.

동결정액을 용해하기 위해 Park (1989)의 방법에 따라 5개의 pellet을 액체질소통에서 꺼내어 스틸로폴 박스에서 3분간 방치한 후 37℃로 데워진 1.5ml BST (Pursel과 Johnson, 1975)가 들어 있는 10ml 시험관에 넣어 용해시키고 10분간 상온에 방치한 후 500g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 정자들을 BO액 (Brackett와 Oliphant, 1975)으로 부유시키고 300g에서 10분간 원심분리하여 2회 반복 세정하였다. Swim-up방법에 의해 정자를 분리하기 위해 상기방법에 의해 세정후 시험관 밑바닥에 모여진 정자위에 1ml의 BO액을 조심스럽게 얹히고 38.5℃ 5% CO₂ 배양기에서 1h 배양하였다. 배양후 운동성 정자가 부유된 상등액을 0.6ml 정도 하층부의 정자와 섞이지 않게 조심스럽게 분리하였다. Glass wool여과법에 의해 정자를 분리하기 위해 glass wool column은 50mg의 glass wool을 1ml 1회용 주사기의 1.5cm까지 채워넣은 후 초순수로 계속 세정하여 유리조각을 제거한 후 건조시키고 EO gas로 멸균하여 준비하였다. 상기 방법으로 세정된 정자는 BO액으로 2×10^8 /ml 농

도로 부유시키고 2ml의 정액을 조심스럽게 glass wool column에 넣고 정치하여 여과시켰다.

세정된 정자와 상기방법에 의해 처리된 정자는 BO액으로 1×10^7 /ml 농도로 조정된 후 20분과 3시간 동안 38.5℃ CO₂ 배양기에서 배양시킨 후 정자 운동성을 검사하고 수정에 공시하였다.

2. 난자의 준비

도살장에서 채취된 난소에서 난포란의 성숙 배양을 Park 등 (1990)의 방법에 준하여 준비되었다. 성숙배양액은 TCM199 (Sigma Chem. Co)에 FBS (fetal bovine serum, Sigma Chem. Co)를 10% 첨가하고 10μg/ml LH (Sigma Chem. Co Eguine) 0.2Au/ml FSH (Toshiba Pharma. Co, Japan) 1μg/ml, Estradiol-17β (Sigma Chem. Co) 11mg/100ml sodium pyruvate, 6.3mg/100ml penicillin G와 5mg/100ml Streptomycin sulfate가 첨가되었다.

여과 멸균된 2ml의 성숙배양액을 35mm petridish에 넣고 2ml의 멸균 파라핀 오일로 피복하여 38.5℃ 5% CO₂ 배양기에서 평형시켰다. 1×10^6 /ml 농도의 과립박세포와 함께 petridish당 40개의 난포란을 42h 동안 상기 배양 조건에서 배양한 후 수정에 공시하였다. 정자를 20분간 배양기 내에서 배양하는 동안 성숙배양된 난포란을 세정하고 50μl의 수정배양액에 10~15개씩 넣었다. 이때 난구세포의 팽화상태가 좋지 않거나 이미 나와된 난자는 제거되었다.

3. 수정 및 판정

상기 방법에 의해 준비된 정자는 1×10^7 /ml 농도로 BO액으로 조정하여 20분간 38.5℃ 5% CO₂ 배양기에서 전배양시키고 난포란을 넣어둔 50μl의 4mM caffeine이 함유된 BO액 소적에 50μl의 정자부유액을 주입하여 수정시의 정자농도는 5×10^6 /ml로 되었다. 수정후 15~18h 후에 난포란은 Park 등 (1990)의 방법에 따라 고정, 염색, 관찰하여 수정율을 평가하였다.

결과 및 고찰

돼지정자의 동결융해후 정상적인 운동성을 가진

Table 1. Sperm characteristics after swim-up and glass wool filtration of frozen-thawed boar sperm

Characteristic	Untreated sperm	Swim-up	Glass wool filtration
Cone ($\times 10^7$ /ml)	—	2.4	6.2
Progressive A	34.2 ^a	58.3 ^b	62.7 ^b
Motility B	11.2 ^a	28.4 ^b	42.6 ^c

abc Percentages bearing different superscripts among treatments are different ($P < 0.05$)

n=5 in all treatments

A:observed after incubation at 38.5°C for 20min.

B:observed after incubation at 38.5°C for 3h

정자의 비율은 상당히 낮다. 그래서 운동성이 좋은 정자만을 회수하기 위한 다양한 방법중 swim-up 방법과 glass wool 여과 방법에 의해 얻어진 정자 부유액의 농도는 각각 2.4와 6.2×10^7 /ml 농도로서 glass wool 여과 방법에 의해 더 많은 정자가 회수되었다. 활발한 전진 운동을 보여주는 정자의 비율은 58.3%와 62.7%로서 무처리 34.2%에 비해 유의적으로 ($P < 0.05$) 증진됨을 보여주었다. 흥미로운 것은 정자처리 후 3h 동안 배양후 관찰된 전진운동상의 정자비율은 각각 11.2, 28.4와 42.6%로서 glass wool 여과방법에 의해 얻어진 정자군에서 운동성이 가장 높게 지속된다. 이러한 이유로서는 swim-up 방법에 의해 얻어진 정자는 1h 정도의 배양과정 중에서 이미 수정능 획득이 상당히 진전되어 첨체반응이 그후의 배양시간동안에 많이 일어나기 때문에 생존 시간이 짧아지는 것으로 사료된다.

Table 2에는 운동성이 좋은 정자의 분리회수후 체외수정에 공시하여 정자의 수정능력을 비교해 보았을 때 비처리구에 비해 swim-up 방법과 glass wool 여과방법에 의해 얻어진 정자군에서 각각 41%와 72%의 수정율을 보여준다. 이러한 결과는 glass wool 여과방법이 swim-up 방법보다 더 많은 수의 운동성 정자를 얻을 수 있고 더 좋은 수정능력을 가지고 있음을 나타내준다. Glass wool 여과 방

법이 어떤 기전에 의해 정자를 선별할 수 있는지 알 수 없다. 그러나 사람 정자에 있어서 glass wool 여과방법에 의해 얻어진 정자는 dye exclusion 검정 (Jeyndran 등, 1986)과 전자 현미경적 (Jeyndran 등, 1987) 관찰에 의해 정상적인 세포막을 가지고 있었다. 또한 신선사출 정자보다 사람의 동결융해 정자에서 아주 좋은 효과를 얻을 수 있었다 (Rhemrev 등, 1989). Glass wool 여과방법은 10분 이내에 완료될 수 있기 때문에 1h 정도의 시간을 요하는 swim-up 방법보다 더 빨리 처리될 수 있다는 장점을 갖고 있다.

본 연구에서 얻은 결과는 glass wool 여과방법에 의해 얻어진 수정율은 소와 같이 체외수정에 있어서 동결융해 정자의 이용을 가능하게 해주어서 실험방법의 간편화에 따른 돼지 체외수정의 가장 큰 문제점으로 지적되고 있는 polysperm block 기전에 관한 기초 연구에 크게 기여하리라 믿는다.

결론

Glass wool 여과법과 swim-up 방법에 의해 얻어진 정자의 전진운동성 정자의 비율은 각각 58.3과 62.7%로서 비처리구의 34.2%에 비해 상당히 증가되었고 38.5°C에서 3시간 배양후의 정자의 생존율

Table 2. Effect of sperm selection the *in vitro* fertilization by frozen-thawed boar sperm

	No. of oocytes examined	No(%) of oocytes fertilized
Untreated sperm	204	50 (24) ^a
Swim-up sperm	189	78 (41) ^b
Glass wool filtrated sperm	192	138 (72) ^c

abc Percentages bearing different superscripts among treatments are different ($P < 0.05$)

은 glass wool 여과법으로 얻어진 정자에서 swim-up 방법의 것보다 더 좋았다. Swim-up 방법과 glass wool 여과법에 의해 분리된 정자를 제외수정에 방사하여 어느쪽이 더 좋은 수정능을 가진 정자를 얻을 수 있는가 김정해 보았을때 glass wool 여과법에 의해 얻어지는 정자가 더 높은 수정능을 가지고 있다는 ($p < 0.05$) 결과를 얻었다.

참고문헌

- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12:260-274.
- Jeyendran RS, Perez-pelacez M and Crabo BG, 1986. Concentration of viable spermatozoa for artificial insemination. Fertil. steril. 45:132-134.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Al-Hason S and Diedrich K. 1987. Separation of viable spermatozoa by standardized glass wool column. In: "Advances in fertility and strility Series, *In vitro* fertilization". (S. Ratnam, E.S. Teoh and C. Ng, eds) Carnforth, Lancs, U.K, The Parthenon Publishing Group. pp.49~72.
- Johnson LA, Aalbers JG, Willems CMT and Sybesma W. 1981. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. J. Anim. Sci. 52:1130~1136.
- Katayama KP, Ed Stehlik BS, and Jeyendran RS. 1989. *In vitro* Fertilization outcome: glass wool-filtered sperm versus swim-up sperm Fertil. Steril. 52(4):670~672.
- Kato S, Miyano T, Nanjo I, Yasui T and Kanda S. 1990. Effect of concentration of sodium laurylsulfate on motility and acrosome morphology of frozen boar spermatozoa. Jap. J. Anim. Reprod. 36(1):26~30.
- Lechtzin N, Garside W, Wileman G and Hillman N. 1990. The ability of glass-bead column-filtered mouse spermatozoa to fertilize homologous eggs *in vitro*. J. IVF&ET. 7(2):86~88.
- Nagai T, Takahashi T, Masada H, Shioya Y, Kawayama M, Fakashima M, Iwashaki S and Hanada A. 1988. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J. Reprod. Fert. 84:585-591.
- Nagase H and Niwa T. 1964. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. Proc. Vth Int. Congr. Anim. Reprod. Trento, III, 410.
- Park SB. 1989. Studies on fertilization *in vitro* in the pig Ph. D Thesis, Kyoto Univ., Kyoto.
- Park SB, Park HK and Iritani A. 1990 Porcine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. 5th AAAP Anim. Sci. congress, Proc. Vol. 3:289.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Libfried-Ruttledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First HL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 25 (4):591-600.
- Perrone, D and Testart J. 1985. Use of bovine serum albumin to improve sperm selection for human *in vitro* fertilization. Fertil. steril. 44(6):839~841.