

Miniature Pig와 Duroc 종간의 동결-융해 후 정액 성상 비교

이용승 · 최원철 · 이승형¹ · 정희태² · 이상영³ · 양부근 · 박춘근[†]
강원대학교 동물생명과학대학

Changes of Frozen-Thawed Semen Characteristics in Miniature Pig and Duroc

Y. S. Lee, W. C. Choi, S. H. Lee¹, H. T. Cheong², S. Y. Lee³,
B. K. Yang and C. K. Park[†]

College of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

SUMMARY

The purpose of this study was undertaken to compare ability of frozen-thawed sperm characteristics between two strains (miniature pig and Duroc). The semen was collected by gloved-hand method into a pre-warmed (37°C) thermos bottle. The semen was diluted with same volume extender and added to LEY solution for freezing. The diluted semen was placed in 0.5 ml straws, and freezing was initiated by exposing the straws to liquid nitrogen (LN₂) vapours for 10 min before placing them into LN₂ for cryopreservation. The frozen-semen straw were thawed at 20, 37 and 50°C for 1 min, 45 sec and 10 sec within water-bath. The semen sample were evaluated at 0, 3, 6, 9, and 12 h after incubation at 37°C for analysis of sperm ability. Abnormality of spermatozoa in miniature pig was significantly ($p<0.05$) higher than that in Duroc at 0, 9 and 12 h of post-thawing incubation after frozen-thawing. The percentage of F-patterned spermatozoa in miniature pig was significantly ($p<0.05$) lower, while the percentage of AR (acrosome reacted spermatozoa) pattern was higher in the miniature than in the Duroc. On the other hand, there was no significant difference in the viability of spermatozoa thawed at different temperature (20°C and 37°C) between two species, but the viability in miniature pig was higher ($p<0.05$) than in Duroc when sperm was thawed at 50°C. In conclusion, this study suggest that suitable freezing method for miniature pig semen is required for increasing post-thawing viability and fertilization capacity.

(Key words : miniature pig, Duroc, frozen-thawing, sperm ability, CTC pattern)

서 론

21세기 생물의학 시대에 접어들면서 생의학 분야의 발전 그리고 유전 공학과 생명 공학 기술의

* This work was supported by the Research on the Production of Bio-Organs (No. 200503020302), Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

¹ 오카야마대학(Okayama University, Japan)

² 강원대학교 수의학부대학(School of Veterinary Medicine, Kangwon National University)

³ 경상남도 첨단양돈연구소(Gyeongnam Province Advanced Swine Research Institute)

[†] Correspondence : E-mail : parkck@kangwon.ac.kr

발전은 인간을 대신한 실험 동물의 이용이 급속한 증가를 가져왔다. 인간의 성장 호르몬 유전자를 지닌 슈퍼 생쥐(super mouse)의 생산(Brinster 등, 1982)을 시작으로 실험 동물을 이용한 신기술이 발달함에 따라 형질 전환 동물을 이용한 치료용 생체물질의 대량 생산, 유전자 치료, 줄기세포 배양기술 및 백신 개발에 의한 난치병 치료 그리고, 장기 이식용 동물의 생산 등에 대한 기술이 발전하였다(Grosveld와 kollias, 1992).

한편, 신기술에 의해 생산된 miniature pig는 해부, 생리학적으로 사람과 유사하여 바이오 의학 연구를 위한 실험 동물로서 연구되었다. 1950년대 미국에서 의학·생물학 연구자가 중심이 되어 miniature pig의 개발이 추진된 이래, 세계적으로 많은 연구에 의해 개량이 진행되어, 현재는 Yucatan Minipig(Colorado State University, 1960), Sinclair(Minnesota University, 1954), Gottingen Mini-pig(Gottingen University, 1960), Ohmini(Animal lab. in Japen, 1945)등 약 20계통 이상의 miniature pig가 연구에 이용되고 있다. miniature pig는 중추·신경계, 행동학, 피부, 치과, 소화기, 영양학, 순환기계, 면역학 및 각종 질병 모델 등의 영역에서 연구에 이용되고 있으며, 이종간의 장기 이식용으로 주목받고 있다. 이와 같이 miniature pig는 실험 동물로써만 아니라 장기 이식으로 인해 그 수요가 증가될 것으로 생각된다.

현재 miniature pig는 대부분 자연 교미를 통하여 생산되고 있다. 그러나 자연 교미의 경우 개량을 위한 종모축의 확보와 산자 생산에 있어 어려움을 겪고 있다. 그러므로 miniature pig의 생산성 향상과 우량 종모축의 이용범위 확대 및 특정 경제 형질의 개선을 위해 인공 수정이 필요할 것으로 생각된다. 일반 돼지의 경우, 유전적으로 능력이 우수한 개체를 대량으로 생산하기 위해 인공 수정 보급률이 급증하고 있다. 또한 신선 정액을 이용한 인공 수정이 보편적으로 이용되고 있으나 체외에서 정액이 단기간 보존되는 한계성으로 인해 돼지 정액의 체외 보존의 한계성을 극복할 수 있는 정액의 동결보존방법과 원리가 보고되었다(Salamon과 Maxwell, 1995a,b; Watson, 1995, 1990; Hammerstedt와 Graham, 1992; Bwanga, 1991; Hofino와 Almlid, 1991; Hammer-

stedt 등, 1990; Wolf와 Patton, 1989). 돼지 정액은 내동성이 약하고(Polge, 1970), 동결 용해후의 침체 이상율이 높은 것으로 보고됐다(Potter, 1979). 그 원인으로 동결 과정 중 저온 충격으로 인하여 전해질 대사에 심각한 변화와 정자 막의 손상이 발생(Mazur, 1984)하여 정자의 운동성과 생존성을 크게 떨어뜨린다고 보고되었다. Holt 등(1992)은 용해 후 가온하는 동안 동해의 발현에 관한 증거들을 획득하였다. 이를 극복하기 위하여 동결 방법 및 동결 정액의 용해 과정 중 수태율과 생존성에 미치는 요인에 대한 연구들이 진행되어 좋은 결과를 얻었다(Bwanga, 1991; Fiser, 1991; Fiser와 Fairfull, 1990; Almlid와 Johnson, 1988). 이와 같은 연구 결과로 동결 정액을 이용한 인공 수정 기술은 신선 정액을 이용한 결과와 큰 차이 없이 비슷한 결과를 얻었다(Eriksson 등, 2002).

본 연구의 목적은 miniature pig의 생산성 향상을 위한 인공 수정 기술 개발의 일환으로 정액의 동결 보존 체계를 확립하기 위한 기초 자료를 확보하는데 있다. 이를 위해 이미 본 연구실에서 연구되어온 동결 방법 중 LEY(11% Lactose +egg yolk)를 이용한 간편 동결 방법(김 등, 2004)을 통하여 Duroc 종과 miniature pig의 동결한 정액을 동결 용해 후 정자의 생존율, 기형을 및 침체율 그리고 용해 온도에 따른 생존율 차이 등을 비교 분석하고자 한다.

재료 및 방법

1. 정액 채취

본 실험에 이용된 정액은 강원도 원주시 영서 AI center에서 종모돈(Duroc)의 시판용 정액과 강원대학교 목장에서 사육중인 2두의 miniature pig에서 개체당 주1회 음경 수압법으로 정액을 채취한 정액을 이용하였다. 두 품종의 정액은 1차 희석(Mulberry III; modified-Modena B)된 정액으로 3시간 이내에 실험에 사용하였다.

2. 동결액 준비

1차 동결액은 11% α -Lactose 용액 80 ml와 egg yolk 20 ml를 2시간동안 혼합하여 원심분리 (2000×g, 5℃, 30분)하여 상층액만을 사용하였다. 2차 동결액

은 1차 동결액에 1.5% Orvus Es Paste(OEP; Nova Chem., U.S.A)와 9% Glycerol을 첨가한 후 냉장 보관하여 실험에 사용하였다. 동결시 OEP와 Glycerol의 최종 농도는 각각 0.5%와 3%로 하였다.

3. 정액 동결

운반된 희석 정액을 분당 0.17°C의 냉각 속도로 25°C에서 15°C까지 1시간동안 세포 동결기(FHK, Japan)로 냉각시킨 후 원심분리(400×g, 15°C, 10분)하여, 1차 동결액을 정자농도가 1×10^9 /ml가 되도록 첨가하였다. 1차 동결액 첨가 후 세포 동결기로 2시간동안 15°C에서 5°C까지 냉각시킨 후 2차 동결액을 1차 동결액 용량의 1/2을 첨가하여 0.5 ml straw를 제작하였다. 제작된 straw는 styrofoam box에 액체 질소가 6 cm 정도 담겨 있는 표면으로부터 10 cm위에서 10분간 정치 후 액체 질소내에 침적하여 보관하였다.

4. 동결 정액 융해

동결된 각 straw는 water bath를 이용하여 각각 20, 37 및 50°C에서 1분, 45초 및 10초 동안 융해하여 세척액{PBS +0.1% BSA(Albumin bovine serum, Sigma A-4503)}과 혼합 후 원심분리(400×g, 37°C, 10분)하여 상층액을 제거하여 BTS로 부유하였다. 동결 정액은 융해 직후(0 h)에서부터 3시간 간격으로 12시간 후까지 일반 성상 검사 (생존율, 기형을 및 침체를)를 실시하였다.

5. 일반 성상 검사

1) 생존율 검사(SYBR-14/PI Staining)

생존율 검사는 Maxwell과 Johnson(1997)의 Live/Dead™ sperm viability kit (Molecular Probes, USA)를 이용한 방법을 수정·보완하여 실시하였다. Live sperm과 dead sperm 사이의 DNA의 차이를 이용한 형광 염색방법을 이용하였으며 이때 live sperm은 녹색으로, dead sperm은 붉은색으로 염색되었다. 실험 과정은 100 μl의 정액에 1 ml의 HEPES(Sigma) +0.1% BSA와 5 μl의 SYBR-14 working stock(2 μl SYBR-14+198 μl DMSO)을 첨가하여 incubater(37°C)내에서 10분간 정치시켰다. 10분 후 5 μl의 PI(Pro-

pidium Iodide, Molecular Probes, USA, L-7011)를 첨가하여 incubater(37°C)상에서 10분간 정치 후 형광 현미경(400배)하에서 관찰하였다.

2) 기형을 검사(Rose Bengal Staining)

기형을 검사는 정액 100 μl에 1 ml의 saline+5% FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco, USA)를 첨가하여 원심분리(400×g, 10분)한 후 상층액을 제거하여, saline+5% FBS 200 μl로 부유하였다. 정자 부유액 100 μl을 side glass 위에 옮겨 도말하여, 실온에서 완전히 건조시킨 후 side glass 위에 Rose-Bengal 염색액 500 μl를 떨어뜨려 염색한 후 현미경(400배)하에서 기형 정자를 관찰하였다.

3) 침체를 검사(Chlortetracycline Assay; CTC Assay)

Wang 등(1995)과 Abeydeera 등(1997)의 방법을 수정·보완하여 침체를 검사하였다. 정자 부유액 100 μl에 2 μl의 Hoechst33258(Sigma, B-2883, USA)을 첨가하여 실온에서 3분간 정치 후 1 ml의 3% polyvinylpyrrolidone(PVP, ICN Biomedicals, USA)를 첨가시켜, 실온에서 원심분리(400×g, 5분)하여 상층액을 제거한 후 100 μl의 PBS로 부유시켰다. 부유된 정액에 동량의 CTC solution{(750 μM Chlor-tetracycline(Sigma, C-4881, USA)+5 mM cysteine+130mM NaCl+20 mM Tris(pH7.8)}을 첨가시키고, 실온에서 3분간 정치시켰다. 그 후 8 μl의 CTC fixative{12.5% (w/v) paraformaldehyde+0.5M Tris-HCl (pH7.4)}를 첨가하여 정자를 고정시켰다. 제작된 CTC sample 중 10 μl를 slide glass에 분주하여 5 μl의 DABCO와 혼합하여, 형광현미경(400배)하에서 정자 두부를 관찰하였다. Fig. 1은 CTC와 Hoechst 33258에 의해 염색된 정자의 모습을 형광현미경(400배)하에서 관찰된 정자의 모습으로, 염색된 정자 중 두부 전체가 황색 형광으로 염색된 것은 수정능 획득 및 침체 반응이 일어나지 않은 정자(F), 침체부위만 염색된 것은 수정능 획득이 일어난 정자(B), 두부가 거의 염색되지 않은 것은 침체 반응이 일어난 정자(AR)로 판정하였다.

6. 통계처리(Statistical Analysis)

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS@8.1 package/

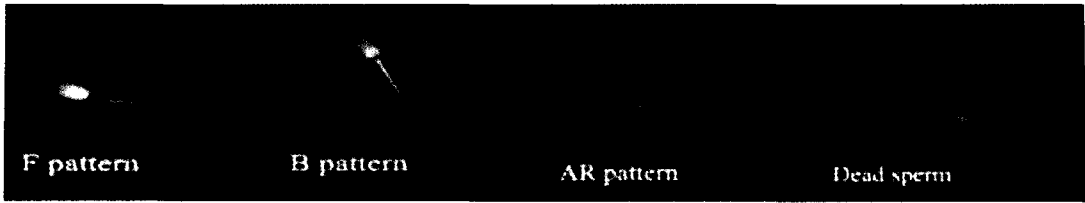


Fig. 1. CTC fluorescence assay of boar spermatozoa and dead spermatozoa dyed by Hoechst 33258 staining. F : an uncapacitated spermatozoa, B : a capacitated spermatozoa, AR : an acrosome-reacted spermatozoa.

PC를 이용하여 최소 유의차 검정(Least Significant Different test; LSD test)과 General linear model(GLM)을 적용하여 Duncan의 Multiple Range Test에 의하여 유의차($p < 0.05$)를 검정하였다.

결 과

1. 생존 정자율

Miniature pig와 Duroc 종 정액의 동결 용해 후 정자 성상 변화를 비교한 결과에서 용해 온도에 따른 생존율 변화를 Fig. 2에 나타냈다. 용해 후 생존율은 miniature pig가 Duroc 종에 비해 용해 온도에 관계없이 높게 나타났으며, 특히 50℃에서 유의적($p < 0.05$)으로 높은 생존율을 보였다. 또한 두 종간 용해 온도에 따른 생존율은 Duroc의 경우 37℃에서

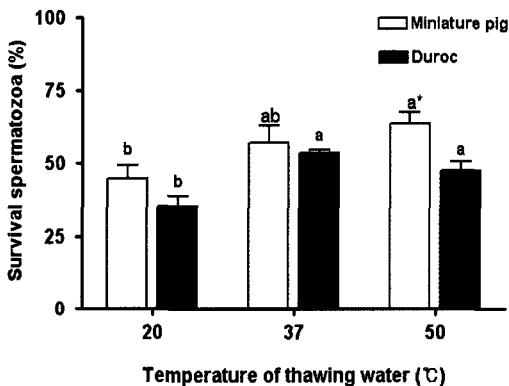


Fig. 2. Effect of thawing temperature on survival ability of frozen-thawed boar spermatozoa. ^{a,b} : Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p < 0.05$). ['] : Significantly difference between two species in same treatment groups ($p < 0.05$).

높은 생존율을 보였으며, miniature pig의 경우 50℃에서 높은 생존율을 나타냈다. 한편 용해 후 배양 시간에 따른 생존율 변화는 Fig. 3에서 나타냈다. 유의적 차이는 없었지만 용해 직후의 생존율에서 miniature pig는 63.8±6.2%, Duroc종은 53.4±1.9%, 12시간 후 miniature pig는 29±3.3%, Duroc종은 28.9±4.7%로 miniature pig에서 높은 생존율을 나타냈다.

2. 기형 정자율

Miniature pig와 Duroc종간의 동결 용해 후 기형율 변화에 대한 결과는 Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 miniature pig가 Duroc종에 비해 동결 전-후 높은 기형율을 보였으며, 용해 직후, 9 및 12시간에서 유의적 차이($p < 0.05$)를 나타냈다. 배양 시간에 따른 기형율의 변화에서 miniature pig는 유의적 차이를 보이지 않았으나, Duroc종 정자의 기형율은 유의적($p < 0.05$) 차이를 보이며 증가하였다.

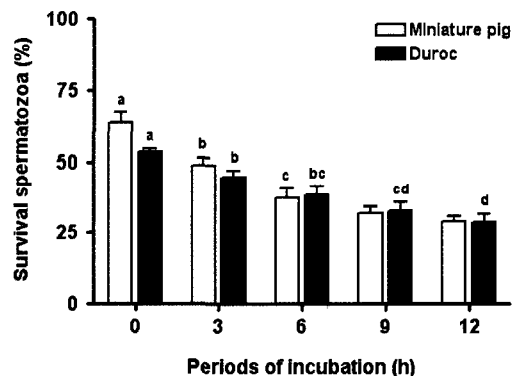


Fig. 3. Changes of survival ability by incubation periods in frozen-thawed boar spermatozoa. ^{a~d} : Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p < 0.05$).

3. 첨체반응과 수정능 획득 정자

Miniature pig와 Duroc 종간의 동결 용해 후 각각의 CTC pattern의 결과를 Fig. 5~7에 나타냈다. 수정능 획득이 일어나지 않은 F pattern은 동결 전 miniature pig와 Duroc 종에서 $55.0 \pm 3.8\%$ 와 $55.9 \pm 1.5\%$ 로 유의적인 차이를 보이지 않았으나 동결 용해 후 $24.1 \pm 2.8\%$ 와 $37.9 \pm 1.1\%$ 로 Duroc 종이 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나타났으며, 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여 12시간째에서는 $11.8 \pm 0.9\%$ 와 $18.1 \pm 4.1\%$ 로 나

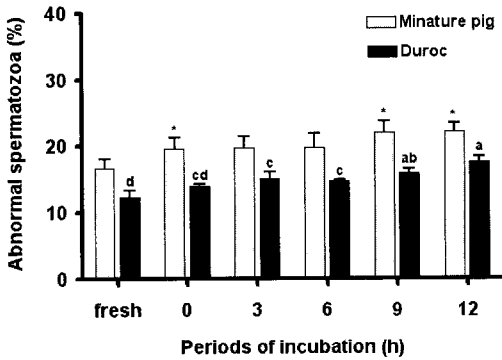


Fig. 4. Change of abnormal rates for a periods of incubation of frozen-thawed boar spermatozoa. ^{a~d} : Different letter indicate a significant difference. * : Significantly difference between two species in same group ($p < 0.05$).

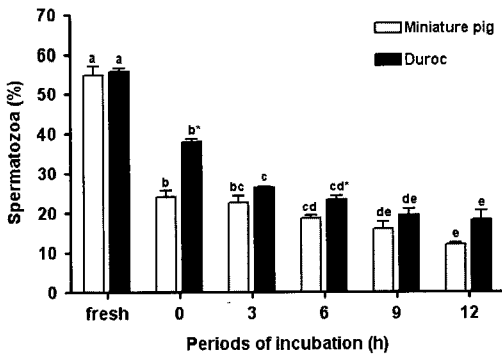


Fig. 5. Change of F pattern rates during the various incubation periods in frozen-thawed boar spermatozoa. ^{a~e} : Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p < 0.05$). * : Significantly difference between two species in same treatment groups ($p < 0.05$).

타났다(Fig. 5). 한편, 동결 용해 후 배양시간에 따른 B pattern의 변화는 용해 직후 두 종간에서 유의적인 차이를 보였으나($p < 0.05$), 다른 시간대에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 배양시간에 따른 miniature pig와 Duroc 종의 B pattern의 변화는 동결 전 $31.1 \pm 0.9\%$ 와 $30.4 \pm 1.0\%$ 에서 동결 용해 후 $54.7 \pm 2.3\%$ 와 $46.4 \pm 1.0\%$ 로 유의적($p < 0.05$)으로 증가하였으며, 이후 50% 내외를 유지하였다. 한편, 첨체 반

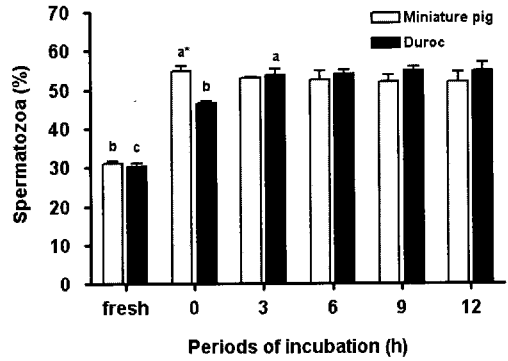


Fig. 6. Change of B pattern rates during the various incubation periods in frozen-thawed boar spermatozoa. ^{a~c} : Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p < 0.05$). * : Significantly difference between two species in same treatment groups ($p < 0.05$).

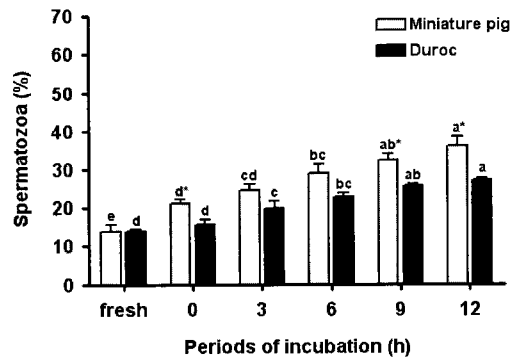


Fig. 7. Change of AR pattern rates during the various incubation periods in frozen-thawed boar spermatozoa. ^{a~d} : Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p < 0.05$). * : Significantly difference between two species in same treatment groups ($p < 0.05$).

응을 나타내는 AR pattern 변화의 결과는 Fig. 7에 나타났다. 동결 전 두 종의 AR pattern은 $13.9 \pm 3.0\%$ 와 $13.8 \pm 0.8\%$ 로 유의적 차이는 나타내지 않았으나, 동결 용해 직후 $21.1 \pm 1.6\%$ 및 $15.5 \pm 2.2\%$ 로 miniature pig가 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나타났으며, 시간이 경과함에 따라 두 종 모두다 점차 증가하여 12시간째에서는 $36.0 \pm 4.0\%$ 와 $27.1 \pm 1.0\%$ 를 나타냈다.

고 찰

돼지 정액은 다른 가축에 비해 사출된 정액량이 많으나 내동성이 약하고, 소나 말과 같은 다른 가축에서 관찰된 것보다 온도의 저하에 내성이 약하다(Maxwell과 Johnson, 1997). 정액 동결 시 가장 중요한 문제점은 동해로부터 정자세포를 보호하는 것이다. 그러나 돼지의 경우, 냉동성이 약해 동결 용해 후 생존율이 낮은 편이다. 정자 동해의 원인의 하나로 정자 원형질막의 특이한 지질배열이 알려져 있다(Lin 등, 1993). 정자 원형질막 지질은 물리적인 반응시기에 의한 온도 변화에 반응하는데 비록 액체와 겔 층의 지질 단계는 생리적 온도와 공존할지라도, 온도의 저하는 액체에서 겔로 변화될 때 영향을 미치며, 이때 스테롤의 존재는 변화기를 억제하는 것으로 판단되어진다(review, Holt, 2000). 정자는 특히 $17 \sim 36^\circ\text{C}$ 온도 범위에서 지질의 변화를 겪으며(Drobnis 등, 1993; Park과 Lynch, 1992; Crow 등, 1989; Holt와 North, 1986, 1984), 저온 충격은 지질 단계 변화에 따른 영향이 원인으로 Drobnis 등(1993)에 의해 증명되었다. 또 하나의 동해 원인은 동결 과정상에서의 냉각 속도에 따른 전해질 대사의 급격한 변동과 빙정 형성으로 인한 세포막 붕괴와 세포질 손실에 있다(Watson, 1990; Mazur, 1984; 1970). 동결 과정에서 생존한 정자 중 일부에서도 원형질막의 손상, 운동성 감소 및 수정 능력 상실 등이 관찰된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 냉각, 동결 속도 및 동결액 성분에 관한 여러 가지 연구가 진행되고 있다.

Jeong 등(1999)은 5 ml straw의 경우 20°C , 37°C 및 50°C 에서 동결 정액을 용해하였을 때 생존율은 각각 14.9%, 7.5% 및 26.8%로 50°C 에서 1분간 용해한 것이 가장 높은 것으로 보고했다. 또한 Ahmad(1984)

는 75°C 에서 9초간 용해한 정자가 운동성과 생존율이 가장 좋다고 보고하였다. Fiser 등(1986)도 높은 온도에서 용해한 정자의 생존율이 가장 높다고 보고 하였다. 그러나 김 등(2005)은 37°C 에서 45초간 용해한 동결 정액이 높은 생존율을 보였다고 보고 하였다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 용해 온도에 따른 생존율에서 일반 돼지인 Duroc 종의 결과와 차이를 보였다. 생존율의 경우 Duroc의 경우 김 등 (2005)이 보고한 37°C 에서 45초간 용해한 동결 정액이 $53.4 \pm 1.9\%$ 로 가장 높은 생존율을 보였으나, 본 연구의 경우 miniature pig의 정액을 높은 온도에서 용해한 동결 정자가 높은 생존율을 보인 결과와 비슷하게 50°C 에서 10초간 용해한 동결 정액이 $63.8 \pm 6.2\%$ 로 높은 생존율을 나타냈다(Fig. 2).

정자의 기형에는 여러 가지가 있으며 또한 복잡한 원인에 의하여 발생된다. 일반적으로 인공 수정에 이용되는 정액은 형태학적으로 비정상 정자가 낮은 범위에 있는 정액이 선택된다. 통계적으로 기형정자는 수정과 관련이 있으나 기형율이 20% 이상일 경우 수정율이 저하된다는 보고도 있다(Pursel 등, 1972). Fig. 4에서 나타난 바와 같이 동결 전에 비해 동결 용해 후 기형율이 증가하였다. 그러나 이후 Duroc종의 경우 12시간까지 20% 이하의 기형율을 보이고 있으나 miniature pig의 경우 동결 용해 후 Duroc보다 높은 기형율로 20% 내외를 나타냈다.

정액의 동결 보존 과정에서 정자는 원형질막의 손상으로 인해 세포막의 침투성 및 세포질의 형태적 변화를 가져오며, 세포막의 침투성이 증가하고 세포막의 변성을 가져온다. 이와 같은 세포의 변성은 침체에 이상을 유발시켜 용해 후 생존율과 수정율이 감소하게 된다(Neild 등, 2003). 수정능 획득과 침체 반응은 정자-난자의 수정에 있어 중요한 기능을 한다. 수정 능력을 획득하는 동안 정자 세포막 특성의 변화, 효소 활성화 및 운동성은 난자내 침투 능력을 원활하게 하고 수정을 위해 침체 반응을 야기시키는 작용을 한다. 침체 반응은 투명대 단백질인 ZP3와 정자의 상호작용 중에 일어나며, 침체 효소와 특정 성분이 유출되면서 난자와 정자의 융합이 이루어지면서 수정이 된다. Gillan 등(1997)에 의하면 신선 정자에 비해 동결 용해 과정을 거친 정자의 경우 B pattern과 AR pattern이 증가한다고 보고

하였다. 본 연구의 결과(Fig. 5~7)에서 보여주듯 동결 전에 비해 동결 후 B pattern과 AR pattern의 정자가 증가하였으며, 두 종간의 B pattern에서 유의적($p<0.05$)인 차이는 없었으나 수정 능력이 상실되는 시기인 AR pattern의 경우 miniature pig에서 높게 나타났다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 동결 용해 후 정자의 기형율과 CTC의 AR pattern에서 miniature pig가 Duroc종에 비해 유의적으로 높게 나타나 Duroc종에 비해 수정 능력과 연관이 되는 침체 상태와 기형율에 대한 평가에서 그 능력이 떨어지는 것으로 판단되어지며, 반면 생존율에 있어서는 miniature pig가 Duroc종에 비해 높은 생존율을 보임으로써 내동성이 높은 것으로 판단되지만 향후 이와 관련된 추가적인 연구를 통하여 miniature pig에 적당한 동결 체계를 확립하는데 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 미니 돼지와 일반 돼지(Duroc)의 동결 용해 후 정자의 수정 능력을 비교하여 동결 보존 체계의 기틀을 확립하고자 하였다. 정액 제조는 수압법으로 정액 채취하여 1차 희석하였다. 동결은 LEY (1차; 11% α -lactose+egg yolk, 2차; 1차 동결액+glycerol+OEP) 동결액을 이용하여 동결을 실시하여 동결 보존하였다. 동결 정액의 용해는 0.5 ml straw를 각각 20, 37 및 50°C water bath에서 1분, 40초 및 10초간 용해하여 세척 과정 후 BTS 5 ml를 첨가하여 37°C에서 배양하였다. 정자 정상 검사로는 기형율(Rose Bengal staining), 침체율(Chlortetracycline staining) 및 생존율(SYBR-14/PI staining)등을 배양 후 0, 3, 6, 9 및 12시간에서 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 정자의 보존 시간에 따른 기형율은 동결 용해 직후 miniature pig가 19.5±1.7%로 Duroc의 13.9±0.3%에 비해 유의적으로 높았다($p<0.05$). 침체 검사에서 수정능 획득이 일어나지 않은 F pattern은 동결 용해 후 miniature pig와 Duroc종 정액이 24.1±2.8%와 37.9±1.1%로 Duroc종에서 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났으며, 동결 용해 후 miniature pig와 Duroc종의 AR pattern은 21.1±

1.6% 및 15.5± 2.2%로 miniature pig가 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. 용해 온도별 생존율에서는 20과 37°C에서는 두 종간에서 유의적 차이는 없었으나, 50°C에서는 miniature pig가 63.8±3.6%로 47.4±3.2%인 Duroc 종에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났다. 본연구의 결과로부터 침체율과 기형율에 대한 연구를 보완함으로써 miniature pig 정액의 안정적인 동결 체계를 확립할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

- Abeydeera LR, Funahashi H, Kim NH and Day BN. 1997. Chlortetracycline fluorescence patterns and *in vitro* fertilization of frozen thawed boar spermatozoa incubated under various bicarbonate concentrations. *Zygote*, 5:117-125.
- Ahmad K. 1984. Effect of thaw rates on survival of buffalo spermatozoa frozen straws. *J. Dairy. Sci.*, 67:1535-1538.
- Almlid T and Johnson LA. 1988. Effect of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post thaw viability of boar spermatozoa frozen in straw. *J. Anim. Sci.*, 66: 2899-2905.
- Brinster RL, Chen HY, Warren R, Sarthy A and Palmiter RD. 1982. Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs. *Nature*, 296(5852):39-42.
- Bwanga CO. 1991. Cryopreservation of boar semen: 1. A literature-review. *Acta. Vet. Scand.*, 32:431-453.
- Carb B and Einarsson S. 1971. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta. Vet. Scand.*, 12:125-127.
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, Anchordoguy TJ and Drobnis E. 1989. Lipid phase transitions measured in intact cell with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 26:76-84.
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW and Crow JH. 1993. Cold shock

- damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes a demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.*, 265:432-437.
- Eivarsson S and Viring V. 1973. Distribution of frozen thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. *J. Reprod. Fert.*, 32:117-120.
- Eriksson BM, Petersson and Rodrogez-martinez H. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new Flac Pack container. *Theriogenology*, 58:1065-1079.
- Fiser PS and Fairfull RW. 1990. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straw. *Mol. Reprod. Dev.*, 25:123-129.
- Fiser PS, Hansen C, Underhill KL and Shrestha JNB. 1991. The effect of induced ice nucleation seeding on the post-thaw motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 24:293-304.
- Fiser PS, Rairfull RW and Marcus GJ. 1986. The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. *Cryobiology*, 23:141-149.
- Gillan L, Evans G and Maxwell WMC. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9:481-487.
- Grosveld F and Kollias G. 1992. *Transgenic animals*. London: Academic Press.
- Hammerstedt RH and Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29:26-38.
- Hammerstedt RH, Graham JK and Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.*, 11:73-88.
- Hofmo PO and Almlid T. 1991. Freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. In: Johnson LA, Rath, D. (Eds.), *Boar Semen Preservation II*. Paul Parey, Berlin, pp. 111-122.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:3-22.
- Holt WV and North RD. 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.*, 230:473-483.
- Holt WV and North RD. 1986. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 78:445-457.
- Holt WV, Head MF and North RD. 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing-observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.*, 46:1086-1094.
- Kim TS, Cao Y, Cheong HT, Yang BK and Park CK. 2005. Analysis of sperm ability in specific pathogen free miniature pig for production of bio-organ. *Reprod. Dev. Bio.*, 29:149-154.
- Lee SH, Cheong HT, Yang BK and Park CK. 2005. Development of semen extenders by assessment of sperm viability in miniature pig semen. *Reprod. Dev. Bio.*, 29:247-252.
- Lin DS, Connor WE, Wolf DP, Neuringer M and Hachey DL. 1993. Unique lipids of primate spermatozoa-desmosterol and docosahexaenoic acid. *J. Lipid. Res.*, 34:491-499.
- Maxwell WMC and Johnson LA. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48:209-219.
- Mazur P, Leibo SP, Farrant J, Chu EHY, Hanna MG Jr and Smith LH. 1970. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M (Eds), *The Frozen Cell*, Churchill. London. pp. 69-88.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, 247:C125-C142.
- Neild DM, Gadella BM, Maria GC, Marcelo H, Miragaya C, Colenbrander B and Aguero A. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze thaw protocol for equine semen cryopre-

- ervation. *Theriogenology*, 59:1693-1705.
- Parks JE and Lynch DV. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29: 255-266.
- Parks JE, Arion JW and Foore RH. 1987. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 37:1249-1258.
- Perez LJ, Valcarcel A, de las Heras MA, Moses D and Baidassarre H. 1996. Evidence that frozen thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 46:131-140.
- Polge C, Salamon S and Wilmut I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Res.*, 87:424-428.
- Potter WL, Upton PC and Dunn BL. 1979. Morphological changes as observed by light microscopy of the acrosome of boar spermatozoa subjected to deep freezing. *Aust. J. Biol. Sci.*, 32:575-578.
- Pursell VG, Johnson LA and Rampacek GB. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.*, 34:278-283.
- Salamon S and Maxwell WMC. 1995a. Frozen storage of ram semen: I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 37:185-249.
- Salamon S and Maxwell WMC. 1995b. Frozen storage of ram semen: II Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:1-36.
- Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR and Niwa K. 1995. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in protein-free chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.*, 104:305-313.
- Watson PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming G (Ed), *Marshall's Physiology of Reproduction* vol. 2 Churchill Livingstone, Edinburgh, London, pp. 747-869.
- Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7:871-891.
- Westendorf P, Richter L and Tren H 1975. Zurtiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberg-Paillettenverfahren. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 82:261-267.
- Wolf DP and Patton PE. 1989. Sperm cryopreservation: state of the art. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 6:325-327.
- 김성곤, 장현용, 박동현, 박춘근, 정희태, 김정익, 양부근. 2006. 돼지 정액의 간편 동결 방법 확립과 동결 정액의 용해 후 생존성 평가. *한국동물번식학회지*, 30:59-64.
- 정영호, 서경덕, 김광식, 심금섭, 이장희. 1999. 동결 보존한 돼지정액의 용해조건이 정자의 생존율과 첨체변화에 미치는 효과. *한국수정란이식학회지*, 14:131-137.

(접수일: 2006. 9. 15 / 채택일: 2006. 9. 27)