

미니 돼지 동결정액의 용해 온도가 정자성상에 미치는 영향

최원철¹ · 양미혜¹ · 이용승¹ · 정희태² · 양부근¹ · 이동석¹ · 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의학부대학

Effect of Thawing Temperature on Sperm Characteristics of Frozen Semen in Miniature Pig

Won-Cheol Choi¹, Mi-Hye Yang¹, Yong-Seung Lee¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹, Dong-Seok Lee¹ and Choon-Keun Park^{1,*}

¹College of Animal Life Sciences and ²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of thawing temperature on the sperm viability and acrosomal morphology for semen storage of miniature pig by the 0.5 ml straw method. In this present study, sperm viability (SYBR-14/PI staining), membrane integrity (Hypoosmotic Swelling Test), acrosome intactness, intensity and capacitation status (chlorotetracycline staining) in frozen miniature pig sperm were evaluated after thawing at 37, 50 and 70°C for 5, 10 and 45 sec, respectively. Interestingly, the results indicated that sperm thawed at 70°C for 5 sec significantly ($p < 0.05$) increased sperm viability, but lower the percentage of AR (acrosome reacted spermatozoa) pattern compared to sperm thawed at 37°C for 45 sec and 50°C for 10 sec. In terms of thawing condition, high temperature for a short time using the 0.5 ml straw was improved cryosurvival of miniature pig semen. Therefore, appropriate thawing method for cryopreservation of miniature pig is required for increasing post-thawing viability.

(Key words : Miniature pig, Thawing temperature, CTC pattern, Sperm viability, HOST)

요 약

본 연구는 0.5 ml straw를 이용한 정자 동결용해 시 용해 온도가 동결정자의 성상에 미치는 영향을 파악하고 미니 돼지의 동결정액에 최적화된 적정 용해 조건을 찾기 위하여 실시하였다. 정액동결 straw를 37, 50 및 70°C에서 각각 5초, 10초 및 45초간 용해하여 생존율(SYBR-14/PI staining), 정자원형질막기능검사(Hypoosmotic Swelling Test) 및 침체반응율(CTC : chlorotetracycline staining)을 검사 한 결과, 70°C에서 5초간 용해한 정자의 생존율과 CTC 결과가 37°C와 50°C에서 10초 및 45초간 용해한 처리구보다 유의적($p < 0.05$)으로 높은 생존율과 낮은 비율의 침체 반응율을 얻었다. 따라서 미니 돼지의 동결 정액은 고온에서 단시간 용해를 하는 것이 정자의 성상에 유리한 것으로 사료된다.

서 론

유전공학과 생명공학 기술의 발전과 함께 인간을 대신 할 실험동물로서 마우스, 랫트, 기니픽, 개, 토끼, 고양이 및 원숭이 등이 이용되어 왔다. 1900년대에 들어 돼지가 해부, 생리학적으로 사람과 많은 유사점을 갖고 있어 의학, 생리학 연구 분야에 있어서 실험동물로서 각광을 받기 시작했다. 하지만 식용이 목적인 가축용 돼지는 큰 체형으로 인한 취급 곤란과 사육이나 실험할 때의 대규모 시설의 확보, 막대한 사료비로 인한 경제적 부담 등은

돼지를 이용한 실험에 있어서 제한적 요소로 작용되고 있다. 이 문제를 해결하기 위해서 1950년대 미국에서 의학·생물학 연구자가 중심이 되어 미니 돼지(miniature pig)의 개발이 추진된 이래, 세계적으로 많은 연구에 의해 개량이 진행되어, 현재는 약 20계통 이상의 미니 돼지가 생산되었고, 중추·신경계, 행동학, 피부, 치과, 소화기, 영양학, 순환기계, 면역학 및 각종 질병 모델 등의 영역에서 연구에 이용되고 있으며 특히, 이종이식 공여동물로써 제 1후보였던 비비나 집팬지가 질환 이입의 문제로 사실상 금지되어(1999, FDA), 대체 공여동물로 주목 받고 있다. 이와 같이 실험동물으로써만 아니라 이종간 장기이식으

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 20070301034040)의 지원에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8627, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

로 인해 수요가 증가될 것으로 생각되는 미니 돼지는 현재 대부분 자연교미를 통해 생산되고 있어 개량을 위한 종모축의 확보와 산자 생산에 있어 어려움을 겪고 있기 때문에 생산성 향상과 특정 형질의 보존을 위해선 동결 정액을 활용한 인공수정이 필요할 것으로 생각된다.

최근에 일반돼지의 경우, 유전적으로 능력이 우수한 개체를 대량 생산하기 위하여 인공수정 보급률이 급증하고 있으나 내동성이 약하고(Polge 등, 1970), 동결 용해 후의 침체 이상율이 높은(Potter, 1979) 특성 때문에 동결 정액 보다는 신선 정액이 인공수정에 많이 이용되고 있다. 그러나 신선 정액의 이용은 체외에서 단기간 보존할 수밖에 없는 한계성이 있으며, 교통의 발달로 인해 동결 정액의 원활한 국제간 수출입으로 우수한 종모축의 활용 빈도가 높아지는 등 동결 정액을 이용한 돼지 개량의 필요성이 대두되고 있다. 하지만 돼지 동결 정액을 이용한 인공수정은 용해 후 활력이 낮고, 신선 정액에 비해 많은 수의 정자를 사용해도 자연 교미와 신선 정액을 이용한 인공수정에 비해 태아의 크기가 작고, 또한 적은 수의 산자가 생산되며(Johnson, 1998), 수태율이 낮아지는 단점이 있어 실용화가 지연되고 있다.

정자는 동결 보존과 용해 과정 중 0°C ~ -20°C 사이에서 세포 내 얼음 결정 형성으로 인한 치명적인 손상을 받게 된다(Bwanga, 1991). 동결정액 실용화를 위해, 저온 충격에 의한 정자의 운동성과 생존성 저하를 극복하기 위한 연구를 통해 동결과정은 최적화 되었지만 (Bwanga 등, 1990; Berger와 Fischerleitner, 1992; Eriksson과 Rodriguez-Martinez, 2000), 용해 과정은 주목 받지 못했다.

동결 보존용기의 형태에는 pellet과 straw를 이용한 방법이 쓰이고 있는데, 그 중 straw는 0.5, 1 및 5 ml straw가 있으며, 돼지의 경우 다량의 정자를 보존할 수 있는 5 ml straw가 주로 이용되고 있으나, 정자의 낭비가 심하고, 부피가 커서 취급과 보관이 용이하지 못하다는 단점이 있다. 그에 비해 동결 실험용으로 주로 이용되는 0.5 ml straw는 작은 부피로 보관상의 편리함이 있으며, 취급이 용이하고, 용해 시 급속한 열 전달로 빙점 형성 시간을 줄여줄 수 있고 정자의 효율적 이용이 가능하다는 장점이 있기 때문에 특정 형질을 가진 미니 돼지 정자의 보존과 이용의 효율성을 극대화 할 수 있을 것이다.

그러므로 본 연구는 미니 돼지의 생산성 향상과 효율적인 인공수정 기술 개발의 일환으로 0.5 ml straw를 이용한 정자 동결 용해시 용해 온도가 동결정자의 성상에 미치는 영향을 파악하고 미니 돼지에 최적화된 적정 용해 조건을 찾기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

정액 채취

본 실험에 이용된 정액은 강원도 원주시 영서 인공수정센터에서 시판하는 종모돈(Duroc 및 Landrace)의 정액과 강원대학교 목장에서 사육 중인 PWG의 M type의 미니 돼지에서 주 1회 음경 수압법으로 채취한 정액을 이용하였다. 미니 돼지로부터 채취한 정액은 1차 희석 후 2시간 이내에서 실험실로 운반하여 사용되었다.

동결보존액 준비

1차 동결보존액은 11% α -lactose 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA) 80 ml와 egg yolk 20 ml를 2시간 동안 혼합하고 원심분리 (2,000 \times g, 5°C, 30분)하여 상층액만을 사용하였다. 2차 동결보존액은 1차 동결보존액에 1.5% Orvus Es Paste(OEP ; Nova Chem., USA)와 9% Glycerol(Sigma)을 첨가하여 냉장보관하여 실험에 사용하였다. 동결시 OEP와 Glycerol의 최종농도는 각각 0.5%와 3%였다.

정액 동결

운반된 희석 정액을 0.17°C/분의 냉각 속도로 25°C에서 15°C로 1시간 동안 세포동결기로 냉각시킨 후 원심분리 (400 \times g, 15°C, 10분)하여, 1차 동결액을 정자 농도가 1×10^9 /ml가 되도록 첨가하였다. 1차 동결액 첨가 후 세포동결기로 2시간 동안 15°C에서 5°C로 냉각시킨 후 2차 동결액을 1차 동결액 용량의 1/2를 첨가하여 0.5 ml straw를 제작하였다. 제작된 straw는 액체 질소가 6 cm 정도 담겨 있는 표면으로부터 10 cm위에서 10분간 정치 후 액체 질소 내에 침적하여 보관하였다.

동결 정액 용해

동결된 각 straw는 항온 수조를 이용하여 각각 37, 50 및 70°C에서 5, 10 및 45초 동안 용해하여 세척액인 PBS + 0.1% BSA(Sigma A-4503)와 혼합 후 원심분리(400 \times g, 37°C, 10분)하여 상층액을 제거한 후 Beltsville thawing solution(BTS)로 부유하여 실험에 사용하였다.

일반 성상 검사

생존율 검사(SYBR-14/PI Staining)

생존율 검사는 Maxwell과 Johnson(1997)의 Live/Dead™ sperm viability kit(Molecular Probes, USA)를 사용한 방법을 수정·보완하여 실시하였다. 살아있는 정자와 죽은 정자 사이의 세포막 투과성의 차이를 이용한 형광 염색 방법을 이용하였으며, 이때 살아있는 정자는 녹색으로, 죽은 정자는 붉은색으로 염색이 되었다(Silva와 Gadella, 2006). 실험방법은 1 ml의 HEPES(sigma) + 0.1% BSA에 100 μ l 정액과 5 μ l의 SYBR-14 working sol.(2 μ l SYBR-14 + 198 μ l DMSO)을 첨가하여 37°C에 10분간 배양한 후 5 μ l PI(Propidium Iodide, Molecular Probes, USA)를 첨가하여 37°C에서 10분간 배양시킨 후 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다.

침체율 검사(Chlortetracycline Assay; CTC Assay)

Wang 등(1995)과 Abeydeera 등(1997)의 방법을 수정·보완하여 침체율을 검사하였다. 정자 부유액 100 μ l에 2 μ l Hoechst33258(Sigma)을 첨가하여 실온에서 3분간 정치시킨 후 1 μ l의 3% polyvinylpyrrolidone (PVP, ICN Biomedicals)을 첨가시켜, 실온에서 원심분리(400 \times g, 5분)하여 상층액을 제거한 후 100 μ l의 PBS로 부유하였다. 부유된 정액에 동량의 CTC 액((750 μ M Chlortetracycline(Sigma) +5 mM cysteine +130 mM NaCl +20 mM Tris(pH 7.8))을 첨가시킨 후 실온에서 3분간 정치시

켰다. 그 후 8 μ l의 CTC 고정액 {12.5%(w/v) paraformaldehyde+0.5 M Tris-HCl(pH 7.4)}를 첨가하여 정자를 고정시켰다. 제작된 sample 중 10 μ l를 슬라이드 글라스에 분주하고 DABCO와 혼합하여 형광 현미경에서 정자의 두부를 관찰하였다. 정자의 검사 기준은 정자의 두부 전체가 황색으로 염색이 된 것은 수정능 획득 및 침체 반응이 일어나지 않는 정자(F pattern), 침체 부위만 염색이 된 것은 수정능력 획득이 일어난 정자(B pattern) 및 두부가 거의 염색되지 않은 것은 침체 반응이 일어난 정자(AR pattern)로 판단하였다.

정자 원형질막 기능검사 (Hypoosmotic Swelling Test)

Na-citrate·2H₂O와 fructose가 혼합된 150 mOsm/kg의 저장액을 만든 후 저장액 1 ml에 정자 부유액 100 μ l를 혼합하여 37°C에서 30분간 배양시킨 후 표본을 제작하여 위상차 현미경을 이용하여 정자 미부의 굴곡 여부를 관찰하였다. 정자 원형질막 기능의 검사 기준은 미부의 형태가 감겨 있거나, 나선형으로 감겨 있는 정자가 정자 원형질막의 기능이 정상상을 나타내는 것으로 판단하였다.

통계처리 (Statistical Analysis)

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS@8.1 package/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

생존 정자율

미니 돼지와 Duroc, Landrace 종의 동결 정액을 각각 37°C, 50°C 및 70°C로 용해 시 생존율의 변화를 Fig. 1에 나타냈다. 용해 후 생존율은 Duroc 종을 제외한 미니 돼지와 Landrace 종은 용해 온도가 높아질수록 생존율이 상승하는 경향을 보였으며, 두 종 모두 70°C에서 유의적($p<0.05$)으로 높은 생존율을 보였다. 종간 비교에 있어 미니 돼지의 경우, 70°C에서 용해하였을 때 Duroc 종에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높은 생존율을 나타냈다.

침체 반응과 수정능 획득 정자

미니 돼지와 Duroc, Landrace 종간의 동결 용해 후 각각 CTC pattern의 결과를 Fig. 2~4에 나타냈다. 수정능 획득이 일어나지 않는 F pattern의 결과에서 (Fig. 2) 미니 돼지의 종내 비교의 경우, 용해 온도에 따른 유의적 차이가 없었으나, Duroc 종과 Landrace 종의 경우 70°C에서 용해하였을 때 F pattern이 감소하는 경향을 보였고, Landrace 종의 경우, 37°C에 용해하였을 때와 비교하여 유의적($p<0.05$)인 차이를 보였다. 용해 온도에 따른 B pattern의 변화의 결과는 Fig. 3에 나타냈다. 미니 돼지와 Duroc 종의 경우, 70°C에서 용해했을 때 가장 높은 비율의 B pattern을 보였으며, 특히 미니 돼지의 경우, 온도가

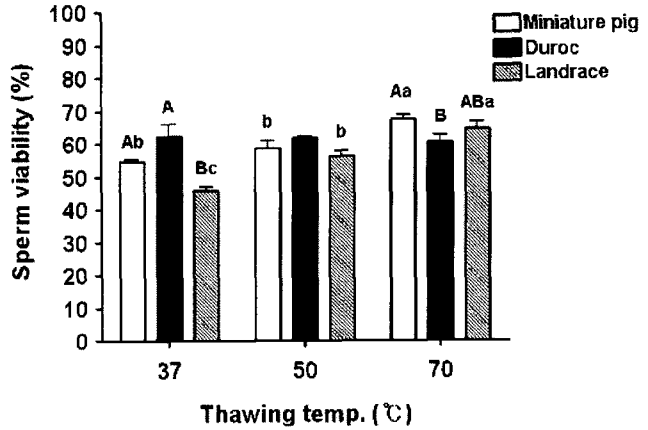


Fig. 1. Effect of thawing temperature on survival ability of frozen-thawed boar spermatozoa. ^{a-c} Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p<0.05$). ^{A,B} Significantly difference between species in same treatment groups ($p<0.05$).

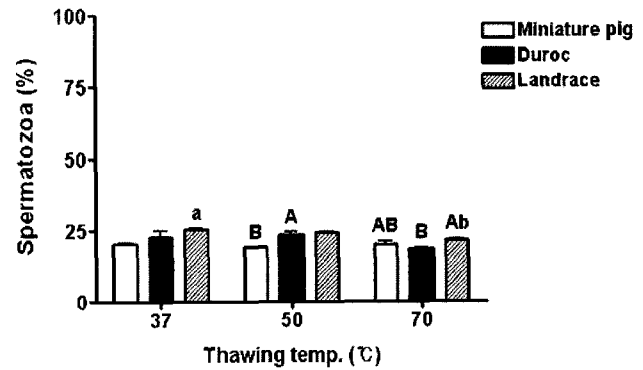


Fig. 2. Effect of thawing temperature on F pattern (acrosome intactness spermatozoa) of frozen-thawed boar spermatozoa. ^{ab} Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p<0.05$). ^{A,B} Significantly difference between species in same treatment groups ($p<0.05$).

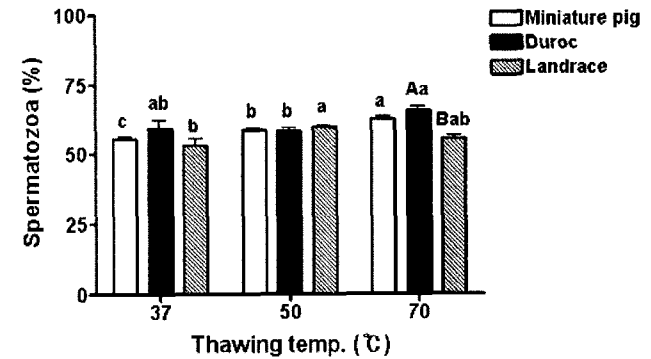


Fig. 3. Effect of thawing temperature on B pattern (capacitated spermatozoa) of frozen-thawed boar spermatozoa. ^{a-c} Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p<0.05$). ^{A,B} Significantly difference between species in same treatment groups ($p<0.05$).

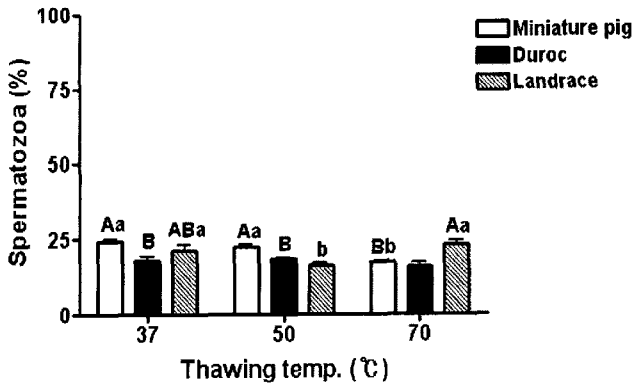


Fig. 4. Effect of thawing temperature on AR pattern (acrosome reacted spermatozoa) of frozen-thawed boar spermatozoa. ^{ab} Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p < 0.05$). ^{AB} Significantly difference between species in same treatment groups ($p < 0.05$).

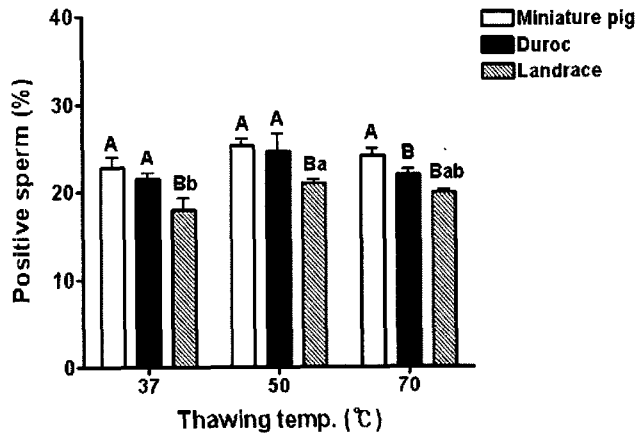


Fig. 5. Effect of thawing temperature on membrane integrity in frozen-thawed boar spermatozoa. ^{ab} Bars with different superscripts within the same category differ significantly ($p < 0.05$). ^{AB} Significantly difference between species in same treatment groups ($p < 0.05$).

높아질수록 유의적($p < 0.05$)으로 B pattern이 증가하는 경향을 나타냈다. 한편, 첨체 반응이 일어났음을 나타내는 AR pattern 변화의 결과는 Fig. 4에서 볼 수 있듯이 Duroc 종의 경우 온도별 차이가 없었고 특히, 미니 돼지의 경우, 70°C에서 용해하였을 때 유의적($p < 0.05$)으로 가장 낮은 비율의 AR pattern을 나타냈다.

HOST 양성반응

미니 돼지와 Duroc, Landrace 종간의 동결 용해 후 각 HOST 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 미니 돼지의 경우, 각각 37, 50 및 70°C에서 용해 시 용해 온도에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다. Duroc 종의 경우, 70°C의 고온에서 용해 시 유의적($p < 0.05$)으로 낮은 HOST 양성 반응율이 나타났으며, 특히 미니 돼지의 경우, 70°C에서 용해 시 Duroc 종과 Landrace 종에 비해 유의적($p < 0.05$)으로 높은 HOST 양성 반응율이 나타났다.

고찰

정 등(1999)은 5 ml straw의 경우, 20, 37 및 50°C에서 동결정액을 용해하였을 때 생존율은 각각 14.9, 7.5 및 26.8%로서 50°C에서 1분간 용해한 것이 가장 높은 것으로 나타났으며, Ahmad(1984)는 75°C에서 9초간 용해한 정자가 운동성과 생존율이 가장 좋다고 보고하였고, Fiser 등(1986)도 높은 온도에서 용해한 정자의 생존율이 가장 높다고 보고하였다. Watson (1990)은 일반적으로 높은 온도에서 용해를 하는 것이 양, 소 또는 말 정자의 활력과 첨체 정상성을 향상시킨다고 하였으며, 또한 Fiser 등(1993)은 5 ml straw의 급속한 용해가 돼지 정자에서도 이롭다고 하였다. 본 실험에서도 미니 돼지와 Duroc, Landrace 종의 동결 정액을 37, 50 및 70°C의 온도에서 각각 5, 10 및 45초간 용해한 결과, Duroc 종을 제외한 미니 돼지와 Landrace 종에서 70°C에서 5초간 용해를 한 것이 높은 생존율을 나타냈다.

용해 속도의 증가는 결정 형성시간을 단축시켜 intracellular ice 재결정으로 인한 미토콘드리아의 손상을 줄여 줄 수 있다(Courtens와 Paquignon, 1985; Fiser와 Fairfull, 1990). 이전의 연구를 살펴보면 이처럼 용해속도의 증가는 정자의 생존률과 첨체 정상성을 개선시킨다고 보고하였다(Pursel과 Johnson, 1975; Fiser 등, 1993; Eriksson과 Rodriguez-Martinez, 2000). 본 실험에 있어서도 Duroc 종의 경우, 70°C에서 용해를 한 것이 37°C와 50°C에서 용해를 한 것보다 수정능 획득이 일어나지 않은 F pattern이 증가하는 결과를 얻었다. 반면 미니 돼지에 있어서는 유의적인 차이가 발견되지 않았고, Landrace 종은 F pattern이 70°C에서 감소하였다. 한편, Gillan 등(1997)에 의하면 신선 정자에 비해 동결 용해 과정을 거친 정자의 경우, B pattern과 AR pattern이 증가한다고 보고하였다. 본 실험에 있어서 특히, 미니 돼지의 경우, 첨체 반응이 일어났음을 보여주는 AR pattern이 37, 50 및 70°C에서 다른 종에 비해 높게 나타났다. 이는 미니 돼지가 다른 종에 비해 수정 능력과 첨체 상태에 관련된 특정 요인에 민감하게 반응하는 것이 있을 것이라 생각된다.

반면 급속한 용해는 정자 세포 외 용액의 갑작스런 유입으로 물의 유입과 동해 보호제의 유출의 불균형을 유발하여 세포의 팽창과 용해로 이어지는 삼투압 충격을 줄 수 있다(Hammerstedt 등, 1978; Mazur, 1984). HOST는 살아 있는 정자가 저 삼투압 상태에서 수분이 정자 원형질막을 투과하여 종창되고 그 결과 정자의 주부가 말리는 상태를 확인하여 정자막의 온전성을 확인하는 원리로서 본 연구에서 살펴보면 위의 연구와 같이 Duroc 종의 경우 70°C의 고온에서 용해 시 낮은 HOST 양성반응율을 나타내었다. 그러나 미니 돼지의 경우, 70°C의 고온 용해 시 Duroc 종과 Landrace 종에 비해 높은 양성 반응율을 나타냈는데, 이는 미니 돼지의 정자세포 막의 온도에 대한 저항성이 다른 종에 비해 강하다고 판단된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 미니 돼지에 있어서 동결 용해 시 70°C에서 5초간 용해를 한 정자의 생존율, CTC 결과 높은 생존율과 낮은 비율의 AR pattern을 얻었고, HOST 결과 용해 온도에 따른 차이가 나타나지 않은 것으로 보아 미니 돼지 동결 정액은 고온에서 단시간 용해를 하는 것이 정자의 성상에 유리한 것으로 사료된다.

사 사

본 연구의 수행을 위해 정액의 동결과 분석에 협조해 주신 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

인용문헌

1. Abeydeera LR, Funahashi H, Kim NH, Day BN (1997): Chlorotetracycline fluorescence patterns and *in vitro* fertilization of frozen thawed boar spermatozoa incubated under various bicarbonate concentrations. *Zygote* 5:117-125.
2. Ahmad K (1984): Effect of thaw rates on survival of buffalo spermatozoa frozen straws. *J Dairy Sci* 67: 1535-1538.
3. Berger B, Fischerleitner F (1992): On deep freezing of boar semen: investigations on the effects of different straws volumes, methods of freezing and thawing extenders. *Reprod Dom Anim* 27:266-270.
4. Bwang CO, de Braganca MM, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H (1990): Cryopreservation of boar semen in Mini-and Maxi-straws. *J Vet Med A* 37: 651-658.
5. Bwanga CO (1991): Cryopreservation of boar semen: 1. A literature-review. *Acra Vet Scand* 32:431-453.
6. Courtens JL, Paquignon M (1985): Ultrastructure of fresh, frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: Johnson LA, Larsson K (eds), *Deep Freezing of Boar semen*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, pp 61-87.
7. Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H (2000): Effect of freezing and thawing rates on post-thaw viability of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 63:205-220.
8. Eriksson BM, Petersson H, Rodriguez-Martinez H (2002): Field fertility with exported boar semen frozen in the new Flacpack container. *Theriogenology* 58:1065-1079.
9. Fiser PS, Pairfull RW, 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.
10. Fiser PS, Pairfull RW (1990): Combined effect of glycerol concentration and velocity on motility and acrosome integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5ml straws. *Mol Reprod Dev* 25:123-129.
11. Fiser PS, Pairfull RW, Hansen C, Panich PL, Shrestha JNB, Underhill L (1993): The effect of warming velocity on motility and acrosome integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol Reprod Dev* 34:190-195.
12. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC (1997): Capacitation status and fertility of fresh and frozen thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9:481-487.
13. Hammerstedt RH, Keith AD, Snipes WC, Amann RP, Arruda D, Griel Jr LC (1978): Use of spin labels to evaluate effect of cold shock and osmolarity on sperm. *Biol Reprod* 18: 686-696.
14. Johnson LA (1998): Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: *Proceedings of 15th IPVS Congress*, pp 225-229.
15. Maxwell WMC, Johnson LA (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
16. Mazur P (1984): Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:C125-C142.
17. Polge C, Salamon S, Wilmut I (1970): Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Res* 87:424-428.
18. Potter WL, Upton PC, 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.
19. Pursel VG, Johnson LA (1975): Effect of time of insemination on fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. *J Anim Sci* 41:375-379.
20. Silva PFN, Gadella BM (2006): Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65:958-978.
21. Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K (1995): Functional analysis using chlorotetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 104:305-313.
22. 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.
23. 정영호, 서경덕, 김광식, 심금섭, 이장희 (1999): 동결 보존한 돼지정액의 용해조건이 정자의 생존율과 침체 변화에 미치는 효과. *한국수정관아식학회지* 14:131-137.

(접수일자: 2007. 8.14 / 채택일자: 2007. 9. 11)