

Percoll 분리된 미니돼지 정액에서 LEY와 Triladyl을 이용한 동결-융해후의 정자 성상 비교

이상희¹ · 유한준¹ · 이용승¹ · 정희태² · 양부근¹ · 김대영³ · 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의과대학, ³가천의과대학교 생명과학부

The Comparison of Triladyl and LEY for Cryosurvival Improvement of Sperm Separated by Percoll in Miniature Pig

Sang-Hee Lee¹, Han-Jun Yoo¹, Yong-Seung Lee¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹,
Dae-Young Kim³ and Choon-Keun Park^{1,*}

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

³Division Biological Science, Gachon University of Medical and Science, Incheon 406-799, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of sperm cryosurvival using each extenders Triladyl and LEY containing egg yolk to the cryopreservation of separated sperm by percoll in miniature pig. The ejaculated semen from miniature pig was separated by 65% percoll and un-separated sperm as a control before freezing. The freezing of diluted semen added with Triladyl containing egg yolk and LEY solution (solution I: 11% Lactose or Triladyl + egg yolk; solution II: solution I + glycerol + OEP). Analysis of sperm ability was estimated by viability, capacitation acrosome reaction using chlortetracycline (CTC) the morphologic abnormality and hypoosmotic swelling test(HOST). The groups were designed that as separated sperm by Percoll with Triladyl(ST) or LEY(SL) for cryopreservation. And unseparated sperm with Triladyl(UT) or LEY(UL). As a results, the viability was higher significantly($p < 0.05$) in ST, SL, UT than UL extender. The morphologic abnormality was measured significantly ($p < 0.05$) lower in ST than other extenders. The AR-patterned in CTC analysis was measured significantly($p < 0.05$) lower in SL and UL than other extenders. In conclusion, using Triladyl extender resulted in viability and morphology of separated sperm by percoll that were effective than using LEY extender, but it resulted in capacitation acrosome reaction was lower than using LEY extender.

(Key words : Miniature pig, Sperm, Cryopreservation, Extender, Percoll)

서 론

가축산업에 있어서 동결정액의 이용은 매우 중요한 잠재력을 갖고 있고 있으며, 지난 30여 년 동안 정자의 동결보존에 대한 연구는 많이 이루어져 왔다. 우수한 개체 생산과 가축 개량 촉진, 생산성 향상을 위해 신선 정액이 인공수정에 이용되고 있으나, 신선 정액의 한계점은 체외에서 단기일 밖에 보존할 수 없기 때문에 동결정액의 필요성이 대두되고 있다. 동결정액의 장점은 반영구적인 정액의 보존, 원하는 시기에 인공수정을 통한 산자의 생산, 유전자원의 보존, 조기 유전적 능력 검정을 우수한 종돈

의 다량 생산 등이 있다. 그러나 동결정액을 이용한 인공수정의 경우 얻어진 산자의 크기와 수는 자연교미와 신선정액의 성적에 비하여 낮다는 보고가 있다(Johnson 등, 2000).

특히 돼지정액은 소나 말과 같은 다른 가축에 비하여 냉동성에 예민하다. 동결에 있어 동해로부터 정자를 보호하는 것이 가장 중요하다. 또한 돼지는 정자막에는 불포화지방산의 비율이 높아 다른 동물에 비해 냉각 과정 동안 지질 산화 과정(lipid peroxidation)이 더 많이 일어난다는 보고가 있다(Cerolini 등, 2001). 정자를 동결하는데 있어 동결보존액의 종류도 많이 연구되어지고 있고, 특히 LEY의 동결보존액은 제조가 간편하고 동결 융해 후 높은

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

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

생존율을 보여 널리 쓰이고 있다(Shim 등, 2005). 이 외에도 돼지 동결정액의 효율성을 높이기 위해 냉각, 동결속도(Shim 등, 2005), 동결용기의 변화(Dai 등, 2009) 등의 연구가 이루어지고 있으나, 그 효과가 만족하지 못하여 실용화되지 못하고 있다.

일반적으로 수정술에 있어 정자의 수보다는 질이 더 중요하게 간주되어진다. 사정된 정액에서 양질의 정자분리과정을 통해 정상 형태의 운동성을 가진 정자를 분리할 수 있는 방법이 연구되어져 왔다. 분리 방법에 따라 adherence 방법, sperm migration 방법, density gradient 방법 등으로 나눌 수 있다. 그 중 density gradient 방법에 쓰이는 percoll은 콜로이드 성질을 가진 농도 구배 물질로써 밀도 차이를 이용하여 정자를 분리하는 물질이다. 특히 사람의 정자를 불연속 percoll 원심분리하여 활동성 정자와 X 정자를 94% 이상 회수하였다는 보고(Iizuka 등, 1987)와 분리된 정자를 체외수정하였을 경우 성숙율이 높았다는 보고가 있다(Grant 등, 1994). 돼지 정액을 percoll로 분리하면 정액 내에 존재하는 정액 성분, 사멸정자, 체세포, 세포단면 및 백혈구 등이 이물질이 제거되며, 정자의 운동성이 증가하고 체외수정시 수정율이 증가한다는 보고가 있다(Shim 등, 2001). 그 후 많은 연구자들은 정자를 분리하여 가축산업에 이용하고자 많은 시도를 하였다. 따라서 percoll은 정액을 분리하여 체외수정시 사멸정자의 제거와 정상 형태의 운동성의 획득 그리고 세포파편 및 세균을 분리(Sakkas 등, 2000; Nicholson 등, 2000)에 이용할 수 있다. 또한 Park 등(2008)은 percoll이 돼지 정액 내의 세균 분리에 효과적이고 보고한 바 있고, 미니 돼지 정액을 분리할 때 65% 이상의 percoll에서는 세균이 완전히 제거된다고 보고하였다. 하지만 percoll을 정자 분리에 사용할 경우, 독소에 의한 오염이나 정자 형태 변화를 유발하기 때문에 수정에 좋지 못한 영향을 미칠 수 있다는 보고들이 있다(Andersen과 Grinsted, 1997; De Vos 등, 1997; Scott와 Smith, 1997; Strehler 등, 1998). 따라서 Percoll 분리된 정자는 액상보존성이 떨어지기 때문에 이를 장기간 보존하는 방법이 필요하다고 생각된다.

본 연구는 65% percoll을 통해 세균이 제거되고 높은 운동성을 갖는 미니돼지 정자의 장기간 보존을 위해 조성으로 다른 동결보존액 Triladyl과 LEY를 사용하여 동결-융해 후 정자 성상을 비교 분석함으로써 percoll 분리된 정자의 동결-보존 체계를 확립하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

정액 채취 및 운반

본 연구에 이용된 돼지는 강원대학교 목장에서 사육되고 있는 PWG miniature pig를 이용하였다. 의빈대를 이용한 음경수압법으로 정액을 채취하였고, 정액은 37°C로 가온된 병에 담아 2시간 이내로 실험실로 운반되어 희석액(Mulberry III; modified-Modena B)과 1:1로 희석하였다. 그 후 20°C 냉장고에서 3시간 동안 냉각하였다.

동결보존액의 준비

동결보존액 차이에 대해 알아보기 위해 동결보존액은

LEY와 Triladyl(KRUUSE, Cat. no. 340244)을 비교하여 사용하였다. LEY 1차 동결보존액은 11% α -lactose 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 20%의 egg-yolk를 첨가하였고 Triladyl 1차 동결보존액은 Triladyl에 20% egg-yolk를 첨가하여 각각 원심분리(4,000 rpm, 90 min, 4°C)하여 상층액을 사용하였다. 동결 시 glycerol과 Orvus Es Paste(OEP; Nova Chem., USA)의 최종 농도를 각각 0.5%와 3%로 맞추기 위하여 2차 동결보존액은 1차 동결보존액에 9% glycerol(Sigma)과 1.5% OEP를 첨가하여 4°C 냉장에 보관하였다.

정자 분리

Percoll 원액을 희석액(Mulberry III; modified-Modena B)과 혼합하여 65% percoll을 제조한 후 정액과 percoll의 비율(v/v)을 1:2로 사용하였다. 정액은 percoll 위에 분주하여 원심분리(2,000 rpm, 20 min, 20°C)하여 최하단의 정자만을 이용하고 분리된 정액은 동결보존액(LEY와 Triladyl)으로 2회 세척한 후 정자 동결에 이용하였다.

정액 동결

65% percoll에 의해 분리된 정액과 분리되지 않은 정액을 비교하기 위해 분리되지 않은 정액은 1차 희석된 정액을 원심분리(1,500 rpm, 10 min, 20°C)를 하여 상층액을 제거하고 동결보존하였다. Percoll로 분리된 정액과 그렇지 않은 정액은 각각의 정액은 정자 농도가 1×10^9 개/ml가 되도록 1차 동결보존액을 LEY와 Triladyl을 첨가한 후 2시간 동안 5°C로 냉각하였다. 그 후 2차 동결보존액을 1차 동결보존액의 1/2를 첨가하여 0.5 ml straw를 제작하였고 6 cm 정도의 액체 질소가 담겨져 있는 용기 표면위로부터 10 cm 위에서 10분간 정치 후 액체 질소에 침지하여 동결 보존하였다.

동결 정액 융해

융해에 사용된 동결정액은 최소 7일 이상 보관된 것을 이용하였다. 동결된 straw는 55°C에서 12초 동안 융해하였다. 37°C로 가온된 Beltsville thawing solution(BTS)로 희석한 후 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 상층액을 제거 하고 실험에 사용하였다.

생존율 검사(SYBR-14/PI Staining)

생존율은 Live/Dead kit(Maxwell과 Johnson, 1997)로 정자를 형광 염색하여 분석하였다. 생존율 확인을 위한 Live/Dead kit는 SYBR-14와 PI로 구성되어 있어 세포막 투과도의 차이로 생존율을 분석하는 방법이다. 살아 있는 세포에서는 SYBR-14가 세포막을 투과하게 되어 핵이 녹색으로 형광 염색되고, 막손상을 입은 세포나 막 투과성이 없는 세포는 PI가 핵에 염색되어 붉은색을 띠게 되는 방법을 사용하였다(Silva와 Gadella, 2006). 염색된 표본들은 형광현미경(400 \times) 하에서 관찰하였다.

정자 원형질막 기능검사(Hypoosmotic Swelling Test)

정자 원형질막의 기능검사는 Na-citrate·2H₂O와 fructose가 혼합된 저장액에 정자를 37°C에서 30분간 배양하였다. 표본은 위상차현미경(400 \times) 하에서 관찰하였으며, 미부의 형태에 따라 검사 기준을 정하여 미부가 나선형

으로 감겨 있는 정자가 원형질막의 기능이 정상을 나타내는 것으로 판단하였다.

침체를 검사(Chlortetracycline Assay; CTC Assay)

Wang 등(1995)의 방법을 수정 보완하여 침체 상태 검사에 이용하였다. 용해된 정액은 CTC 염색을 통한 침체 상태를 분석하였다. 실험은 용해 후 BTS로 세척 후 희석한 정자 부유액 792 μ l에 8 μ l의 Hoechst 33258을 첨가 후 어두운 실온에서 3분간 배양시킨 후, 3%(w/v) polyvinyl-pyrrolidone(PVP-40; Sigma) 4 ml로 첨가시켜 실온에서 원심분리(500 \times g, 3분)하였다. 상층액을 제거 후 재부유하여 동량의 CTC solution과 PVP-40을 첨가하여 염색하고 12.5%(w/v) paraformaldehyde 8 μ l로 고정 후 slide glass에 10 μ l를 떨어뜨려 10 μ l의 DABCO와 혼합해 표본을 제작하였다. 제작된 표본은 형광현미경(400 \times) 하에서 정자 두부 전체가 주황색으로 염색된 것은 수정능 획득 및 침체 반응이 일어나지 않은 정자(F pattern)로, 침체 부위만 염색된 것은 수정능 획득은 일어났지만 침체 반응이 일어나지 않은 정자(B pattern)로, 염색이 희미하거나 두부 적도 부위에 band가 형성된 것(AR pattern)은 수정능 획득과 침체 반응이 일어난 정자로 판정하였다.

기형을 검사

기형을 검사는 Rose-Bengal 염색 방법을 이용하여 정자의 이상 형태를 관찰하여 분석하였다. 실험 방법은 동결 후 BTS 세척 후 희석한 정액 1 ml와 5%의 FBS가 첨가된 생리식염수용액 5 ml를 혼합시킨 후 500 g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거시킨 후 재부유시켰다. 정자 부유액의 200 μ l를 취하여 slide glass 위에 각각 50 μ l의 정자 부유액을 옮겨 도말하고, 실온에서 완전히 건조시킨 후, 0.5 μ l의 Rose-Bengal 염색액을 떨어뜨려 염색한 후 위상차 현미경(400 \times) 하에서 기형정자를 관찰하였다.

통계처리(Statistical Analysis)

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.1을 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

정자의 생존율

Live/Dead Kit로 percoll로 분리한 정액과 그렇지 않은 정액을 서로 다른 동결보존액으로 동결-융해하여 생존율을 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. 연구의 결과, 동결정자의 생존율은 percoll 분리된 정자가 분리하지 않은 정자와 비교하였을 때 높은 생존율을 보였고, percoll 분리된 정자에서는 LEY(67.9 \pm 3.8%)와 Trilady(57.8 \pm 1.8%)의 동결보존액을 사용하여 동결하였을 때 LEY에서 유의적($p < 0.05$)으로 높은 결과가 나왔다.

HOST 양성반응을

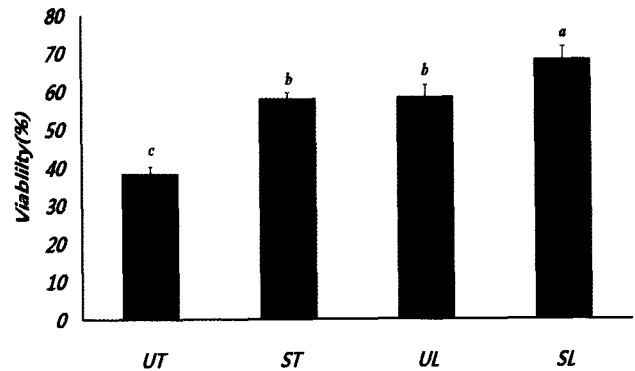


Fig. 1. Effect of freezing extenders and separated with percoll on viability of frozen-thawed sperm in miniature pig. UT: Unseparated with Triladyl, ST: Separated with Triladyl, UL: Unseparated with LEY, SL: Separated with LEY. ^{a-c}: Bar with different superscripts differ significantly of each other treatment group($p < 0.05$).

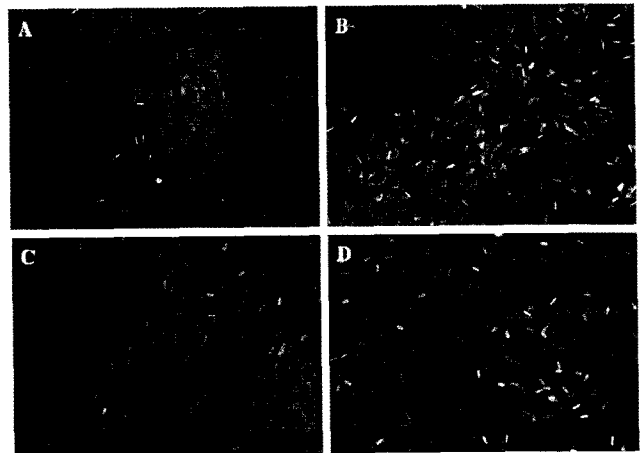


Fig. 2. Fluorescence images of frozen-thawed sperm, dual stained with SYBR14 and propidium iodide to distinguish lived and dead sperm. A: Un-separated with Triladyl, B: Separated with Triladyl, C: Un-separated with Triladyl, D: Separated with LEY.

PWG miniature pig의 정액을 percoll로 분리한 것과 분리하지 않은 것을 동결보존액 LEY와 Triladyl을 사용하여 동결-융해하였을 때의 결과를 Fig. 3에 나타냈다. Percoll로 분리하지 않고 LEY 동결보존액을 사용하여 동결 융해하였을 때 미부가 나선형으로 말린 정자(25.1 \pm 2.04%)가 다른 처리구에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 높은 경향을 나타냈다. Triladyl 동결보존액을 사용하여 동결-융해한 경우에는 percoll 분리한 정자(18.22 \pm 0.78%)와 분리하지 않은 정자(18 \pm 1.52%)간 유의적($p < 0.05$)인 차이가 없었다.

정자의 기형을 평가

Fig. 4에서 동결-융해한 정액의 기형율을 평가한 결과로 percoll로 분리한 후 Triladyl 동결보존액을 사용하여 동결을 하였을 때의 정자(1.44 \pm 0.29%)가 분리하지 않은 정자(3.88 \pm 0.1%)에 비하여 낮은 결과를 나타냈다. 한편 LEY 동결보존액을 사용하여 동결한 정자사이에서는 유의적($p < 0.05$)인 차이가 없었다.

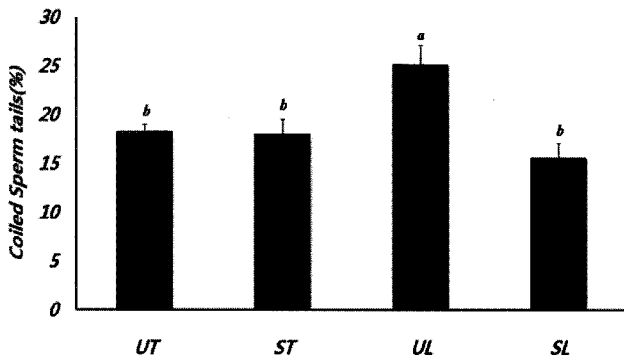


Fig. 3. Effect of freezing extenders and separated with percoll on HOST of frozen-thawed sperm in miniature pig. UT: Unseparated with Triladyl, ST: Separated with Triladyl, UL: Unseparated with LEY, SL: Separated with LEY. ^{ab}: Bar with different superscripts differ significantly of each other treatment group ($p < 0.05$).

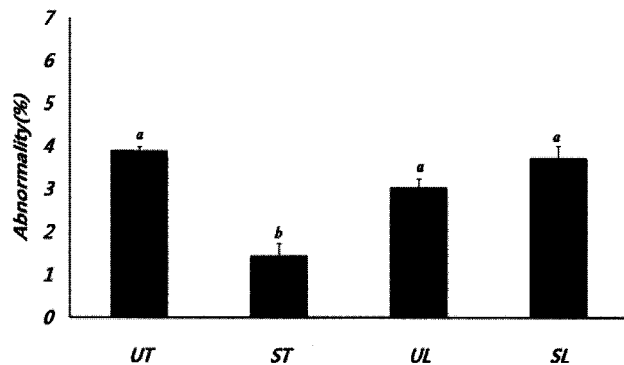


Fig. 4. Effect of freezing extenders and separated with percoll on abnormality of frozen-thawed sperm in miniature pig. UT: Unseparated with Triladyl, ST: Separated with Triladyl, UL: Unseparated with LEY, SL: Separated with LEY. ^{ab}: Bar with different superscripts differ significantly of each other treatment group ($p < 0.05$).

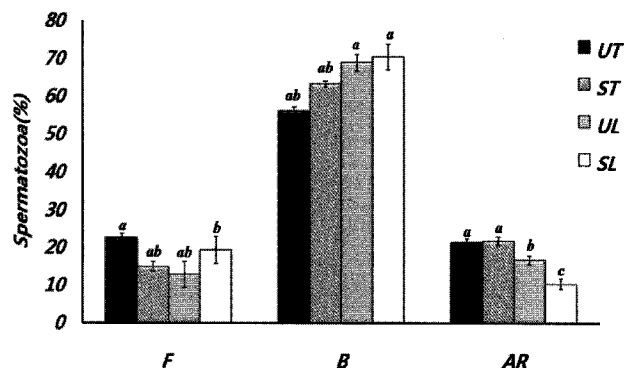


Fig. 5. Analysis of the impact of two extenders and separated sperm by percoll on acrosome state. ST: Separated sperm with Triladyl, UT: Un-separated sperm with Triladyl, SL: Separated sperm with LEY, UL: Un-separated sperm with LEY. ^{a-c}: Significantly difference of each other treatment group ($p < 0.05$).

침체반응과 수정능 획득정자

침체막의 상태와 수정능을 분석하기 위해 정액을 동결-융해한 후 정자 검사를 한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. Percoll로 분리하지 않고 Triladyl 동결 보존액을 사용하여 동결 융해한 정자(22.66±2.16%)가 높은 F pattern을 보였다. B pattern의 경우에는 Triladyl 동결보존액보다 LEY 동결보존액을 사용하여 동결한 정액이 더 높은 결과를 보였고, percoll 분리된 정자와 분리되지 않은 정자 사이에서는 유의적($p < 0.05$)인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 침체 반응이 일어난 AR pattern의 경우에는 Triladyl 동결보존액보다 LEY 동결보존액을 사용하였을 때 낮은 결과가 나타났고, 특히 percoll로 분리 후 LEY 동결 보존액을 사용하여 동결 융해한 정자(10.33±1.48%)의 경우에 가장 낮은 비율의 AR pattern을 관찰할 수 있었다.

고찰

Percoll gradient를 이용한 정자분리법은 운동성이 높은 정자를 분리하는 방법 중 하나로 polyvinylpyrrolidone (PVP)으로 코팅된 silica particle은 Percoll이라는 이름으로 상업적으로 제조, 판매되었다. Percoll은 배양액에 첨가하여도 삼투압의 변화를 유발하지 않아 높은 밀도 구배 배양액을 만들 수 있다. Percoll을 이용한 density gradient 방법을 이용하여 정액 내의 세균을 완전히 제거하는 연구가 보고되었고(Park 등, 2008), 미니돼지에서의 높은 운동성의 정자를 얻을 수 있다는 보고가 있다(Yoo 등, 2009). 정액 내의 세균은 정자의 저장성과 질에 악영향을 미친다(Althouse와 Lu, 2005)라는 연구 결과와 비교하여 본다면 percoll 분리된 정액은 분리하지 않은 정액에 비하여 보존성이 높다고 생각을 한다.

돼지 정액은 다른 가축에 비해 농도는 적고 사출된 정액량이 많고 내용성과 온도 저하에 내성이 약하다(Maxwell과 Johnson, 1997). 온도 변화와 저온충격에 민감한 돼지정액은 동결과정 중 60% 이상의 정자가 사멸하게 된다. 저온 충격과 정자의 생존율의 관계는 동결과정 중 세포내의 빙정 형성으로 인한 막손상, 세포 내외의 삼투압 차이로 인한 영향으로 전해질 대사의 심각한 변화, 정자막의 손상으로 인한 침체반응 유발, 핵내의 DNA 손상이 이루어지게 된다(Salisbury 등, 1978). 따라서 이러한 정자의 생존 능력을 높이고자 인지질에 대한 연구(Holt와 North, 1984, 1986; Crowe 등, 1989; Park과 Lynch, 1992; Drobnis 등, 1993), L-glutamine(Mercado 등, 2008), α -tocopherol(Jung 등, 2009) 등과 같은 항산화제의 첨가, 콜레스테롤의 첨가 등의 연구가 활발하게 이루어지고 있지만 아직 동해 원인에 대한 정확한 기작과 다른 포유동물에 비해 융해 후 정자의 생존율이 낮은 실정이다.

동결보존에 필요한 보존액은 세포를 반영구적으로 보존시킬 수 있을 뿐만 아니라 정액과 초기배 수정란의 장기보존에 이용되며 번식 연구 분야에 많은 영향을 끼쳤다. 동결보존에 사용되는 돼지정액 동결보존제는 일반적으로 당, protein, lipoprotein, buffer 등에 따라 나눌 수 있다. 희석액의 종류에는 egg yolk-glucose(Baier, 1962; Polge 등, 1970), egg yolk-lactose(Richter 등, 1975; Westendorf 등, 1975), Beltsville F3(BF3; Pursel와 Johnson, 1971) 등이 있고, 여기에 비전해질로서 물에 녹기 쉽고,

용액의 pH가 중성이고, 세포에 대한 투과성이 높은 동해 보호제를 첨가하여 사용한다. 이러한 동해보호제에는 exy-thriol, xylitol, adontiol, acetamide, glycerol 및 DMSO 등이 있는데, 그 중 glycerol이 널리 쓰이고 있다.

Triladyl 동결보존액은 주로 소 정액 동결보존에 많이 쓰이는 물질로 그 외에 양(Ollero 등, 1998), 개(Dobrinski 등, 1993), 말(Blottner 등, 2001) 등 정액 동결보존에 이용되었다는 보고가 있다. 하지만 돼지 정액 동결보존에 있어 Triladyl에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 판매되고 있는 Triladyl 원액 자체에 함유된 glycerol이 돼지 정액보존에 있어서 좋은 결과를 얻을 수 없기 때문으로 보여진다. 이전의 연구에서 Triladyl 동결보존액을 사용하여 일반 돼지 정액을 동결 보존하였을 때 좋은 결과를 얻지 못하였다. 하지만 본 연구에서는 percoll에 의해 분리된 세균이 제거되고 운동성이 높은 돼지 정액의 동결 효율성을 알아보기 위하여 LEY와 Triladyl 동결보존액을 사용하여 생존능력 및 성상을 관찰하였다.

정액의 동결 보존 과정은 정자의 운동성과 생존율에 영향을 미치게 된다. 본 실험에서 생존율을 측정하기 위해 Live/Dead kit를 사용하였을 때 percoll에 의해 분리된 정자가 분리되지 않은 정자에 비해 높은 생존율을 보였다. 이 결과는 세균이 분리되고 운동성이 좋은 정자가 동결 보존에 있어 더 높은 능력을 갖는 것으로 추측된다. 또한 percoll로 분리한 정액과 분리하지 않은 정액을 LEY와 Triladyl을 사용하여 동결하였을 때 모두 LEY의 사용이 생존율이 더 높았다. 이는 LEY가 Triladyl보다 돼지 정액 동결보존에 있어 더 효율적으로 사용할 수 있다고 생각한다. 저장액 안에서의 원형질막 상태 변화는 정자의 미부에서 관찰할 수 있는데 주부의 미부가 말리는 상태를 확인하여 정자막의 온전성과 정자의 강도를 확인한다. Percoll로 분리되지 않은 정자를 LEY로 동결보존을 하였을 때 정자막의 온전성이 제일 높게 평가되었다. 하지만 다른 처리군에서는 유의적($p<0.05$)인 차이가 없었다. Percoll 분리된 정자에서는 원형질막의 보존이 높게 나타나지 않은 것으로 보아 percoll에 의한 독성으로 정자의 원형질막에 영향을 끼친 것으로 생각이 된다.

일반적으로 인공 수정과 체외 수정에 있어 이용되는 정액은 형태학적으로 정상 정자가 높은 범위에 있는 정액이 선택되며, 정자의 기형율이 20% 이상일 경우 수태율이 저하된다(Pursel 등, 1972). 본 실험에서는 동결 보존한 정자의 기형율을 측정된 결과, percoll 분리 후 Triladyl을 사용하였을 때 낮은 기형율을 볼 수 있었다. 이것은 미니돼지 정액을 percoll로 분리할 때 기형 정자는 운동성이 거의 없으므로 점성이 있는 percoll을 침전하지 못하여 기형율을 낮춘다는 보고(Yoo 등, 2009)와 일치하는 결과이다.

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. Gillan 등(1997)에 의하면 신선 정자에 비해 동결 용해 과정을 거친 정자의 경우 B pattern과 AR pattern이 증가한다는 보고가 있고, Yoo 등(2009)은 percoll 분리한 정자가 그렇지 않은 정자에 비하여 AR pattern이 낮게 나타났다는 보고가 있다. 정자의 침체반응율의 지표로 쓰이는 AR pattern의 경우를 보면 Tri-

ladyl보다는 LEY 동결보존액을 사용하였을 경우 더 낮은 경향을 보이며, percoll 처리한 동결 정액에서 더 낮은 결과를 나타냈다. Percoll에 의한 분리와 LEY를 사용한 정액 동결 보존 방법은 AR pattern을 낮추는데 있어 효과적일 것이라 생각한다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 percoll에 의해 분리된 정자는 생존율과 기형을 그리고 침체반응 면에서 유의적($p<0.05$)으로 좋은 결과를 나타냈다. 또한 동결보존할 때 사용되는 보존액은 Triladyl보다는 돼지 동결정액에 많이 이용되는 LEY를 사용하는 것이 좋은 효과를 얻는다는 것을 입증하였다. 반면 정자의 원형질막 보존의 경우에는 percoll을 처리한 동결 정액에서 그 능력이 떨어지는 것으로 판단되어진다. 향후 이와 관련하여 percoll로 분리한 정자의 수정 능력과 초기배의 분할능력평가 그리고 동결-용해한 정액을 이용하여 인공수정 하였을 때 생산된 산자를 확인하는 연구가 필요할 것이라 생각한다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 정액의 채취와 보존에 협조해 주신 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

인용문헌

1. Althouse GC, Lu KG (2005): Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63:573-584.
2. Andersen CY, Grinstead J (1997): A new method for the purification of human motile spermatozoa applying density-gradient centrifugation: polysucrose media compared to Percoll media. *J Assist Reprod Genet* 14:624-628.
3. Baier W (1962): Erfahrungen in der Kunstlichen Besamung des Hausschweines einschliesslich der Verwendung von Tiefkuhl Samen. *Zootec* 17:94-99.
4. Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H (2001): Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci* 65(1-2):75-88.
5. Cerolini S, Maldjian, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM (2001): Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121:395-401.
6. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, Anchordoguy TJ, Drobnis E (1989): Lipid phase transitions measured in intact cell with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 26:76-84.
7. Dai JJ, Wu CF, Zhang DF, Yin FZ, Zhang TY, Liu D, Wu HL, Li LL, Yang ST, Wang L (2009): Some factors affecting freezing of boar semen in 5 ml maxi-straws. *Asian-Aust J Anim Sci* 22:507-515.

8. De Vos A, Nagy ZP, Van de Velde H, Joris H, Bocken G, Van Steirteghem A (1997): Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12:1980-1984.
9. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC (1997): Capacitation status and fertility of fresh and frozen thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9:481-487.
10. Grant SA, Long SE, Parkinson TJ (1994): Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J Reprod Fertil* 100:477-483.
11. Holt WV, 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.
12. Holt WV, Head MF, North RD (1986): Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 78:445-457.
13. Iizuka R, Kaneko S, Aoki R, Kobayashi T (1987): Sexing of human sperm by discontinuous Percoll density gradient and its clinical application. *Hum Reprod* 2:573-575.
14. Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Mohana Kumar B, Balasubramanian S, Rho GJ (2009): Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 58:181-189.
15. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
16. Maxwell WMC, Johnson LA (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
17. Mercado E, De, Hernandez M, Sanz E, Rodriguez A, Gomez E, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J (2008): Evaluation of L-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 115:149-157.
18. Ollero M, Perez-Pe R, Muiño-Blanco T, Cebrian-Perez JA (1998): Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* 37(1):1-12.
19. Park CK, Hong KH, Son SJ, Lee YS, Hahn TW (2008): Identification of bacterial contaminants in porcine semen and its removal. *Korean J Vet Serv* 31(4):547-554.
20. Parks JE, Lynch DV (1992): Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29:255-266.
21. Polge C, Salamon S, Wilmut I (1970): Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Res* 87:424-428.
22. Pursel VG, Johnson LA (1973): Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *USDA. ARS Bull* 44-227:1-5.
23. Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB (1972): Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before col shock. *J. Anim Sci* 34:273-278.
24. Sakkas D, Manucardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, *et al* (2000): The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod* 15:1112-1116.
25. Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR (1978): *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. W. H. Freeman and Co. 2nd (eds), San Francisco, USA.
26. Scott L, Smith S (1997): Mouse *in vitro* fertilization, embryo development and viability, and human sperm motility in substances used for human sperm preparation of assisted reproduction. *Fertil Steril* 67:372-381.
27. Shim KS, Kim KS, Seo KD, Song HB (2005): Studies on the freezing of boar semen I. Effects of cooling rate and extenders on viability and normal acrosome after frozen-thawed of boar semen. *Emb Trans* 20:43-48.
28. Silva PFN, Gadella BM (2006): Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65:958-978.
29. Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collorel G, De Santo M (1998): Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa. *Hum Reprod* 13:120-123.
30. Szász F, Gábor G, Solti L (2000): Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Vet Hung* 48(3):325-333.
31. Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, 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.
32. Yoo HJ, Jeon JM, Lee YS, Cheong HT, Yang BK, Kim DY, Park CK (2009): Effect of bacteria eliminated sperm by percoll method on sperm quality and embryo cleavage in miniature pig. *Reprod Dev Biol* 33:35-40.

(접수일자: 2010. 3. 11 / 채택일자: 2010. 3. 24)