

## 미니돼지 정액의 동결-융해 후 생존을 향상을 위한 동결 조건 확립

이용승<sup>1</sup> · 유한준<sup>1</sup> · 정희태<sup>2</sup> · 양부근<sup>1</sup> · 우제석<sup>3</sup> · 박춘근<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 동물생명과학대학, <sup>2</sup>강원대학교 수의과대학, <sup>3</sup>국립축산과학원

## Establishment of Freezing Conditions for Improving Cryosurvival in Miniature Pig Spermatozoa

Yong-Seung Lee<sup>1</sup>, Han-Jun Yoo<sup>1</sup>, Hee-Tae Cheong<sup>2</sup>, Boo-Keun Yang<sup>1</sup>,  
Jea-Seok Woo<sup>3</sup> and Choon-Keun Park<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>3</sup>National Institute of Animal Science, Hanwoo Ex, Gangwon 232-950, Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to establish a freezing method of miniature pig spermatozoa. The semen ejaculated from PWG M-type miniature pig was collected by gloved-hand method. The semen was diluted with same volume extender (m-Modena B). The frozen solution used frozen solution of four different (LEY, TCG, BF-5 and m-Modena+egg yolk) for find optimal frozen solution in miniature pig sperm. The diluted semen for frozen rate assay was added to LEY solution (solution I: 11% lactose+egg yolk; solution II: solution I+glycerol+OEP), and frozen depending on freezing rate by the three different freezing methods (A: until 5°C for 1 hrs, holding at -102°C for 10 min; B: until 5°C for 2 hrs, holding at -102°C for 10 min; C: until 5°C for 3 hrs, holding at -80 and -102°C for 10 min). Semen cooled until 5°C was added with glycerol 1, 3 and 5%, and take a equilibrium time for 0, 10 and 30min. Frozen-thawed sperm were evaluated for viability, acrosomal status and morphological abnormality. The results of frozen-thawed sperm ability by frozen solution, viability was higher in LEY solution compared to other three different frozen solution. AR pattern of LEY solution were lower than other three different frozen solution. The results of freezing rate, viability was higher in B method compared to other methods ( $p < 0.05$ ). Acrosomal statute was intacted in A and B methods than C method. The experiment for glycerol condition was showed that sperm viability was higher in extender with 1% and 3% glycerol and equilibrium time of 0 min. The acrosome damage was lower in extender with 1% glycerol and equilibrium time of 10 min than other conditions. In conclusion, the optimal conditions for cryopreservation of miniature pig spermatozoa obtained in LEY frozen solution, cooling rate of 1~2 hrs, 1~3% glycerol concentrations and glycerol equilibrium time of 0~10 min.

(Key words : Miniature pig, Freezing rate, Glycerol equilibrium, Freezing method, Spermatozoa)

### 서 론

Miniature pig는 해부, 생리학적으로 사람과 유사하여 바이오의학 연구를 위해 실험동물로서 연구되었다. 1950년대 미국에서 의학·생물학 연구자가 중심이 되어 miniature pig의 개발이 추진된 이래, 세계적으로 개량이 진행되어, 현재에는 Yucatan Minipig (1960), Sinclair (1954), Hanford Minipig (1957), Gottingen Minipig (1960), Ohmini (1945) 등 약 20계통 이상의 miniature pig가 연구에 이용되고 있다. Miniature pig는 중추·신경계, 행동학

연구 영역, 피부 연구 영역, 치과 소화기 영양학 연구 영역, 순환기계 영역, 면역학적 연구 영역 그리고 각종 질병 모델 등의 연구에 이용되고 있으며, 이종 이식 의료에 의한 장기이식용으로 주목받고 있다. 특정 형질을 가진 miniature pig의 생산성 향상과 우수 유전자원의 이용 범위 확대 및 특정 경제 형질의 개선을 위해 동결정액을 이용한 인공수정이 필요하다.

그러나 돼지 정액은 다른 가축에 비해 사정량은 많으나 내동성이 약하고, 소나 말과 같은 다른 가축에서 관찰된 것보다 온도의 저하에 내성이 약하다 (Maxwell 등, 1997). 돼지 동결정액을 이용한 인공수정은 융해 후 활력

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

† Corresponding author : Phone:+82-33-250-8600, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

이 좋고, 신선정액에 비해 많은 수의 정자를 사용해도 자연 교미와 신선정액을 이용한 인공수정에 비해 작은 크기와 적은 수의 산자가 생산되며 (Johnson, 1998), 수태율이 떨어지는 단점이 있어 실용화가 지연되고 있다. 정액 동결 시 가장 중요한 문제점은 동해로부터 정자세포를 보호하는 것이다. 정자 동해의 가설은 정자 원형질막의 특이한 지질 배열이 하나의 원인으로 알려져 있다 (Lin 등, 1993; Park 등, 1987). 정자 원형질막 지질은 물리적인 반응시기에 의한 온도 변화에 반응한다. 비록 액체와 겔층의 지질 단계는 생리적 온도와 공존할지라도, 온도의 감소는 액체에서 겔로 변화될 때 영향을 미치며, 이때 스테롤의 존재는 변화기를 억제하는 것으로 판단되어진다 (review, Holt, 2000). 또 하나의 동해 원인은 동결 과정에서 냉각 속도에 따른 전해질 대사의 급격한 변동과 빙정 형성으로 인한 세포막 붕괴와 세포질 손실에 있다 (Mazur, 1984; 1970; Watson, 1990). 이러한 문제점을 해결하기 위해 냉각, 동결 속도 및 동결액 성분에 관한 여러 가지 연구가 진행되고 있으며, 돼지 동결 정액 실용화를 위해, 저온 충격에 의한 정자의 운동성과 생존성 저하를 극복하기 위한 연구를 통해 동결 과정이 최적화 되었다 (Bwanga 등, 1990; Berger와 Fischerleitner, 1992; Eriksson과 Rodriguez-Martinez, 2000).

그러므로 본 연구는 미니 돼지 정액의 동결보존율 향상을 위해 동결액, 냉각 속도 그리고 glycerol 농도와 평형 시간 등을 조절하여 미니 돼지 정액의 최적 동결조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 정액준비

본 연구에 이용된 정액은 강원대학교 목장에서 사육 중인 PWG miniature pig M type(60kg)에서 음경 수압법으로 정액을 채취하여 이용하였다. 채취된 정액은 m-Modena B 희석제(Lee 등, 2005)로 1차 희석하여 실험실로 1시간 이내 운반하여 연구에 이용하였다.

### 동결액 준비 및 동결

미니 돼지의 최적의 동결조건을 찾기 위해 미니 돼지 정액 동결에 적합한 동결액으로 Lactose Egg Yolk (305.3 mM lactose+20% egg yolk, LEY), Tris citric acid glucose egg yolk (158.5 mM Tris+53.3 mM citric acid+35.5 mM glucose+20% egg yolk, TCG), Beltsville F5 (52.4 mM TES+16.5 mM Tris+177.6 mM glucose+20% egg yolk, BF-5) 및 m-Modena B+20% egg yolk 4가지 1차 동결액을 준비하고 각각 2차 동결액은 1차 동결액에 1.5% Orvus Es Paste (OEP ; Nova Chem, U.S.A)와 9% glycerol을 첨가하여 냉장보관하여 실험에 사용하였다. 동결 시 OEP와 glycerol의 최종농도는 각각 0.5%와 3%였다. 동결액 조성 중 OEP를 제외한 모든 시약은 Sigma 제품을 이용하였다.

정액 동결은 운반된 희석정액을 상온(25°C)에서 1시간 정도 정치시킨 후 원심분리 (400×g, 15°C, 10분)한 후, 각각의 1차 동결액을 정자농도  $1 \times 10^9$ 이 되도록 첨가하였다.

1차 동결액 첨가 후 세포동결기로 2시간 동안 25°C에서 5°C까지 냉각시킨 후 2차 동결액을 1차 동결액량의 1/2을 첨가하여 0.5 ml, 5 ml straw를 제작하였다. 제작된 straw는 제작된 styrofoam box에 액체질소를 6 cm 정도를 담고, 표면으로부터 10 cm 위에서 10분간 정치 후 액체질소에 침적하여 액체질소통에 보관하였다.

### 정액의 동결 속도에 따른 정자의 성상변화

미니 돼지 정액 동결의 적정 동결 속도를 확립하기 위해 아래와 같이 조건으로 동결 속도를 달리하여 동결 후 융해하여 일반성상 검사를 통하여 평가하였다.

- A: 상온에서 정액을 희석액과 저장물질을 원심분리를 이용하여 제거한 후 1차 동결액과 혼합 후 얼음이 담긴 스티로폼 박스에 보온재 등을 감아서 넣고 -20°C 냉상고에서 1시간 동안 5°C로 냉각 후 2차 동결액을 첨가하여, 10분간 -120°C에서 예비동결 후 액체질소에 침적하여 냉동보존하였다.
- B: 상온의 희석정액을 세포동결기를 이용하여 20분간 서서히 냉각 후 원심분리하여 1차 동결액을 첨가하였다. 이후 2시간 동안 서서히 5°C로 냉각하여 2차 동결액을 첨가한 후 10분간 -120°C 상에서 예비동결하여 액체질소에 침적시켜 동결보존하였다.
- C: 상온에서 15°C까지 40분 동안 서서히 냉각하여 원심분리 후 1차 동결액 첨가 후 2시간 동안 5°C까지 냉각하였다. 이후 2차 동결액을 첨가하여 -80°C에서 20분간 정치하고, -20°C에서 10분간 정치 후 액체질소에 침적하여 냉동보존하였다.

### Glycerol 농도와 평형 시간

미니 돼지 정액 동결을 위한 LEY 동결액에 glycerol을 각각 1, 3 및 5%씩 첨가하여 동결에 이용하였으며, 각각의 농도에 따른 평형 시간을 0, 10 및 30분간 실시하여 동결 후 융해하여 성상 검사를 통하여 평가하였다.

### 일반성상 검사

#### 생존율 검사(SYBR-14/PI Staining)

생존율 검사는 Maxwell과 Johnson(1997)의 Live/Dead™ sperm viability kit (Molecular Probes)를 이용한 방법을 수정·보완하여 실시하였다. Live sperm과 dead sperm 사이의 DNA의 차이를 이용한 형광염색 방법으로 live sperm은 녹색으로 염색되며, dead sperm은 붉은색으로 염색되게 된다. 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) 상에서 10분간 정치시켰다. 10분 후 5 μl의 PI (propidium iodide)를 첨가하여 incubater(37°C)상에서 10분간 정치 후 형광현미경(400배) 하에서 관찰하였다.

#### 기형율 검사(Rose Bengal Staining)

기형율 검사는 김 등(2002)의 Rose-Bengal 염색 방법을 수정·보완하여 실시하였다. 정액 100 μl에 1 ml의 saline +5% FBS를 첨가하여 원심분리(400×g, 10분)한 후 상층액을 제거하여, saline+5% FBS 200 μl를 부유한다. 정자부

유액 100  $\mu$ l를 side glass 위에 옮겨 도말하여, 실온에서 완전히 건조시켰다. 건조된 side glass 위에 Rose-Bengal 염색액 500  $\mu$ l를 떨어뜨려 염색한 후 현미경(400배) 하에서 기형정자를 관찰하였다. Fig. 1은 Rose Bengal에 의해 염색된 기형정자를 광학현미경(400배) 하에서 관찰된 모습이다.

**침체율 검사(Chlortetracycline, CTC)**

Deborah 등(2003)의 방법을 수정·보완하여 침체율을 검사하였다. 정자부유액 100  $\mu$ l에 2  $\mu$ l의 Hoechst 33258을 첨가하여 실온에서 3분간 정치 후 1 ml의 3% polyvinylpyrrolidone (PVP, ICN Biomedicals)를 첨가시켜, 실온에서 원심분리(400 $\times$ g, 5분) 하여 상층액을 제거한 후 100  $\mu$ l의 PBS를 부유하였다. 부유된 정액에 동량의 CTC solution{(750  $\mu$ M chlortetracycline(Sigma)+5 mM cysteine+130 mM NaCl+20 mM Tris(pH 7.8))을 첨가시키고, 실온에서 3분간 정치시켰다. 그 후 8  $\mu$ l의 CTC fixative {12.5% (w/v) paraformaldehyde+0.5M Tris-HCl(pH 7.4)}를 첨가하여 정자를 고정시켰다. 제작된 CTC sample 중 10  $\mu$ l를 slide glass에 분주하여 5  $\mu$ l의 DABCO와 혼합하여, 형광현미경 (400배) 하에서 정자 두부를 관찰하였다. 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), 침체 부위만 염색된 것은 수정능 획득이 일어난 정자(B), 두부가 거의 되지 않은 것은 침체 반응이 일어난 정자(AR)로 판정하였다.

**동결정액 용해**

동결된 각 straw는 water bath를 이용하여 55 $^{\circ}$ C에서 13초 동안 용해하여 Beltsville Thawing Solution (BTS) 희석제 (205.4 mM glucose, 3.358 mM EDTA, 20.4 mM sodiumcitrate, 14.879 mM sodium bicarbonate, 10.06 mM potassium chloride)와 혼합 후 원심분리(400 $\times$ g, 37 $^{\circ}$ C, 10분)하여 상층액을 제거하여 다시 BTS를 부유하였다. 용해된 정액은 일반성상 검사(생존율, 기형율 및 침체율)를 실시하였다.

**통계처리(Statistical Analysis)**

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS@9.2 package/PC를 이

용하여 Duncan의 Multiple Range Test에 의하여 유의차 ( $p<0.05$ )를 검정하였다.

**결 과**

미니 돼지 정액의 동결보존 조건을 확립하기 위해 Table 1과 같이 4가지 동결액을 이용하여 동결 후 일반성상 검사로 생존율과 기형율 그리고 CTC 염색을 통한 침체 상태를 분석한 결과, 4가지 동결액 중 LEY 동결액으로 동결하였을 때 생존율이 유의적으로 ( $p<0.05$ ) 가장 높았고, 손상된 침체를 나타내는 AR pattern 율이 가장 낮게 나타났다. 미니 돼지 동결보존에 있어서 가장 낮은 생존율을 나타낸 동결액은 BF-5였으며, 침체 손상은 Modena 희석제에 egg yolk을 섞어서 제조한 동결액으로 동결하였을 때 유의적으로 ( $p<0.05$ ) 침체 손상이 가장 크게 나타났다. 기형율은 Tris를 기본으로 한 TCG 동결액으로 동결하였을 때 유의적으로 ( $p<0.05$ ) 가장 높게 나타났다.

미니 돼지 정액의 동결 과정에서 냉각 속도에 관한 실험 결과는 Table 2에 나타났다. 생존율에서는 A와 B 방법이 60% 이상의 생존율을 보였으나, 유의적으로( $p<0.05$ ) B방법에 의해 동결된 정자의 생존율이 높게 나타났으며, 침체상태를 나타낸 CTC pattern에서 A는 F pattern이 B에 비해 유의적으로( $p<0.05$ ) 높았으나, 상대적으로 B patt-

**Table 2. Effect of freezing methods on assessment of sperm characteristics in miniature pig semen**

Test type	Frozen method (% , mean $\pm$ SEM)			
	A	B	C	
Viability	61.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	64.6 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	17.3 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>	
CTC patterns	F	31.3 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	23.3 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	19.3 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>
	B	46.3 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	53.7 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	42.7 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>
	AR	22.4 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	23.0 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	38.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
Abnormal	16.0 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	19.6 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	23.6 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	

<sup>a-c</sup>: A rows with different superscripts within the same category differ significantly ( $p<0.05$ ).

**Table 1. Effect of freezing solutions on assessment of sperm characteristics in miniature pig semen (% , mean $\pm$ SEM)**

Freezing solution	Viability	Abnormal	CTC patterns		
			F	B	AR
Fresh semen	90.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	10.5 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	52.6 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	34.7 $\pm$ 3.8 <sup>c</sup>	12.7 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>
LEY	68.0 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	14.7 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	27.7 $\pm$ 0.7 <sup>bc</sup>	52.3 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	20.0 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
TCG	50.0 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	18.3 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	32.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	43.7 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	24.0 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>
BF-5	40.0 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>	12.0 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	29.7 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	49.3 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>	21.0 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>
Modena+egg yolk	52.0 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	11.7 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	23.7 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	51.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	24.6 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup>: A rows with different superscripts within the same category differ significantly ( $p<0.05$ ).

ern은 B가 유의적으로 높았으며, AR에서 두 방법간의 유의적 차이는 없었다. 한편, 기형율에서는 A방법이 유의적으로 가장 낮은 비율을 나타냈다 ( $p<0.05$ ).

Table 3, 4는 미니 돼지 정액의 동결 과정에서의 적정 glycerol 농도와 평형 시간을 찾기 위해 실험을 실시한 결과를 나타냈다. Table 3에서는 glycerol 농도와 평형 시간에 따른 동결 용해된 미니 돼지 정자의 생존율을 나타냈다. 1, 3%의 glycerol 농도에서 0이 가장 높은 생존율을 보였으며, 두 농도 간 생존율에서 유의적 차이( $p<0.05$ )를 보이지 않고 있다. 반면, 5%의 경우 1와 3%의 생존율에 비해 유의적으로 낮게 나타났다.

Table 4은 glycerol 농도와 평형 시간에 따른 침체 상태 차이를 나타낸다. Glycerol 농도 1%에서 10분간 평형 시킨 sample에서 침체 반응이 일어나 수정 능력을 잃은

Table 3. Effect of glycerol concentrations and equilibrium time on sperm viability in frozen-thawed miniature pig semen

Glycerol concentration (%)	Effect of glycerol equilibrium time(min) on sperm viability in frozen-thawed miniature pig semen (%), mean $\pm$ SEM)		
	0	10	30
1	63.3 $\pm$ 0.6 <sup>Aa</sup>	56.6 $\pm$ 0.8 <sup>Ab</sup>	52.6 $\pm$ 1.2 <sup>Bc</sup>
3	67.3 $\pm$ 1.2 <sup>Aa</sup>	43.6 $\pm$ 1.2 <sup>Bc</sup>	60.3 $\pm$ 0.8 <sup>Ab</sup>
5	54.3 $\pm$ 2.4 <sup>B</sup>	55.3 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	55.0 $\pm$ 1.1 <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup>: Significantly difference of sperm viability between glycerol concentration in same equilibrium time ( $p<0.05$ ). <sup>a-c</sup>: Significantly difference of glycerol equilibrium time on sperm viability in frozen-thawed miniature pig semen ( $p<0.05$ ).

Table 4. Effect of glycerol concentration and equilibrium time on acrosome of frozen-thawed spermatozoa in miniature pig

Glycerol concentration (%)	Glycerol equilibrium time (min)	CTC patterns (%), mean $\pm$ SEM)		
		F	B	AR
	0	21.7 $\pm$ 0.8 <sup>Ba</sup>	47.3 $\pm$ 0.6 <sup>Cb</sup>	31.0 $\pm$ 0.5 <sup>Ab</sup>
1	10	22.0 $\pm$ 0.5 <sup>Ba</sup>	60.0 $\pm$ 0.5 <sup>Aa</sup>	18.0 $\pm$ 0.5 <sup>Cc</sup>
	30	9.7 $\pm$ 0.8 <sup>Bb</sup>	46.0 $\pm$ 1.5 <sup>Bb</sup>	44.3 $\pm$ 2.3 <sup>Aa</sup>
	0	28.3 $\pm$ 0.8 <sup>Aa</sup>	50.0 $\pm$ 0.5 <sup>Bb</sup>	21.7 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>
3	10	13.6 $\pm$ 0.8 <sup>Cb</sup>	62.4 $\pm$ 1.4 <sup>Aa</sup>	24.0 $\pm$ 1.0 <sup>B</sup>
	30	25.7 $\pm$ 0.8 <sup>Aa</sup>	51.0 $\pm$ 0.5 <sup>Ab</sup>	23.3 $\pm$ 1.4 <sup>B</sup>
	0	21.6 $\pm$ 0.8 <sup>Bb</sup>	58.3 $\pm$ 0.8 <sup>Aa</sup>	20.0 $\pm$ 1.5 <sup>Bc</sup>
5	10	25.0 $\pm$ 0.5 <sup>Aa</sup>	47.7 $\pm$ 0.6 <sup>Bb</sup>	27.3 $\pm$ 0.8 <sup>Ab</sup>
	30	12.3 $\pm$ 0.8 <sup>Bc</sup>	42.0 $\pm$ 0.5 <sup>Cc</sup>	45.7 $\pm$ 0.8 <sup>Aa</sup>

<sup>a-c</sup>: Significantly difference of CTC patterns between glycerol concentration in same equilibrium time ( $p<0.05$ ). <sup>a-c</sup>: Significantly difference of CTC patterns between glycerol equilibrium time in same glycerol concentration ( $p<0.05$ ).

AR pattern의 비율이 유의적으로( $p<0.05$ ) 가장 낮게 나타났다. Glycerol 농도 1과 5%에서 30분간 평형 시간을 가졌을 때 AR pattern이 40% 이상으로 가장 높게 나타났다.

## 고 찰

본 연구는 미니 돼지 동결 체계를 확립하기 위해 동결보존에 영향을 미치는 동결액, 동결 속도 그리고 동해보존제의 농도와 평형 시간의 조건을 확립하고자 하였다. 그중 정액 동결보존에 있어서 동결액의 조성은 중요한 인자로 작용하며, 일반적으로 정자 동결보존액의 구성은 비침투성 동해방지제 (milk와 egg yolk), 침투성 동해방지제 (glycerol, ethylene glycol, dimethyl sulfoxide), buffer (Tris나 TES), 당 (glucose, lactose, raffinose, saccharose, trehalose), 염 (sodium citrate, citric acid) 그리고 항생제 등으로 구성된다 (Evans와 Maxwell, 1987). 동결액 내의 당물질은 정자의 원형질막이 퍼지는 것을 모아주고, 삼투압을 증가시켜 탈수를 야기시키고, 세포내 빙정 형성 발생빈도를 낮추는 역할을 함으로써 동결보존 시 정자의 생존율을 향상시킨다 (Aisen 등, 2002). Tris는 이당류보다 단당류와 혼합하여 이용하였을 때 동결보존에 효과적이다 (Molinia 등, 1994). 또한, Tris buffer의 경우 소, 양 그리고 오리 정액 동결에 이용된다 (Purdy, 2006). 본 연구에서는 당과 난황 이외에 아무것도 첨가하지 않은 LEY 동결액, Tris와 glucose를 기본으로 하는 Tris buffer인 TCG 동결액, TES와 glucose를 기본으로 하는 BF-5 동결액 그리고 돼지 희석제인 Modena에 난황을 섞은 동결액으로 정액을 동결 용해한 결과, TES를 기본으로 하는 BF-5보다 Tris buffer인 TCG가 생존율이 유의적 ( $p<0.05$ )으로 높게 나타났으며, 특히 다당류인 lactose를 기본으로 하는 LEY 동결액으로 동결을 실시한 결과, 생존율이 68.0 $\pm$ 1.2%로 유의적으로 가장 높은 생존율을 나타냈다 (Table 1). 또한, 이 등 (2006) LEY 동결액을 이용한 미니 돼지와 Duroc 종간의 동결용해 후 정액 성상을 비교하였을 때에도 미니 돼지의 생존율이 60% 후반을 나타냈다. 침체막 손상 또한 LEY 동결액에서 유의적으로 ( $p<0.05$ ) 가장 낮은 손상을 나타냈다.

급속한 동결은 냉각 충격을 야기하며, 그로 인한 운동성 상실과 침체 막 붕괴를 초래하게 된다 (Plummer와 Watson, 1985). 특히 돼지 정액 동결 시 정자의 생존율이 급격히 떨어지는 것은 동결 과정 중 급속한 냉각 또는 용해에 의한 온도 변화에 따라 발생한다 (Huang 등, 1999). 돼지 정액의 동결은 빙정이 형성되기 전인 -5 $^{\circ}$ C까지 분당 3~5 $^{\circ}$ C의 냉각 속도가 좋으며 빙정이 형성된 후인 -5~-50 $^{\circ}$ C까지는 분당 20~50 $^{\circ}$ C의 빠른 냉각 속도가 정자의 생존율에 유익하다 (Fiser와 Fairfull, 1990; Bwanga, 1991). 그 이유는 빙점이 형성되기 전에는 생존율에 큰 피해가 없지만 비정형성 시 느린 동결 속도는 오히려 정자의 원형질막에 피해를 주기 때문이다. 본 연구에서도 Table 2에서와 같이 동결 속도를 -80 $^{\circ}$ C에서 20분 정치하고, -120 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치한 가장 느린 C방법으로 동결을 했을 시 가장 낮은 생존율을 나타냈으며, 동결은 -120 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치하는 것은 똑같고 냉각 속도만 1시간

정도의 차이를 보이는 A와 B방법의 경우 생존율에서는 유의적인 차이를 보였으나, 침체손상면에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 김 등 (2006)이 실험한 간편동결방법의 결과와 비슷한 경향을 나타냈다.

동결보존 기술은 Polge 등 (1949)이 glycerol의 동해방지 효과를 발견함으로써 획기적인 동결보존 효율의 향상을 가져왔다. Glycerol과 같은 동해방지제는 동결액 내에 첨가되어 동결 과정 동안에 정자의 냉각과 동결 그리고 융해로 인한 물리화학적 충격을 줄여주는 역할을 한다 (Purdy, 2006). 또한, 동해방지제는 정자 막내 인지질과 단백질의 배열의 원인이 되고, 막 유동성을 향상시키며, 저온에서 탈수를 돕고, 세포내 빙정형성을 억제시켜줌으로써 동결보존된 정자의 생존율을 향상시킨다 (review Holt, 2000). 몇몇 연구들은 냉각과 동결 속도, 동결액 구성 그리고 glycerol 첨가 형태에 따라 동결액내 최적의 glycerol 농도를 계산한다 (Byrne 등, 2000). Hernandez 등 (2007)은 53마리의 돼지 사출정액을 분석한 결과, glycerol 최종 농도 2~3%가 최적이라고 보고하였으며, 본 연구의 결과에서도 3% 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈다. 또한, 미니 돼지 정액의 Glycerol 평형 시간은 Wilmut 등 (1973)이 주장한 값을 평형 시간을 가졌을 때 정자의 생존율이 높게 나타났다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 미니돼지의 동결액은 다당류인 Lastose를 기본으로 하는 LEY 동결액이 최적이며, 동결 속도는 5°C까지 2시간에 거쳐 온도를 내렸을 때 가장 높은 생존율을 나타냈다. 최적의 glycerol 농도는 3%로 평형 시간이 없이 바로 동결하는 게 가장 좋다.

## 감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 정액 성분분석 장비의 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Aisen E, Medina V, Venturino A (2002): Cryopreservation and post thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57:1801-1808.
- 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.
- Bwanga CO (1991): Cryopreservation of boar semen: 1. A literature-review. *Acra Vet Scand* 32:431-453.
- Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP (2000): Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility *in vivo* and *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 62:265-275.
- 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.
- Evans G, Maxwell W (1987): *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworth, Sydney, p 194.
- Fiser PS, 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.
- Hernandez M, Roca J, Gil MA, Vazquez JM, Martinez EA (2007): Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* 67:1436-1445.
- Holt WV (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62:3-22.
- Huang SY, Kuo YH, Lee WC, Tsou HL, Lee YP, Chang HL, Yang JJ (1999): Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenology* 51:1007-1016.
- Johnson LA (1998): Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: *Proceedings of 15th IPVS Congress*, pp 225-229.
- Lee SH, Cheong HT, Yang BK, Park CK (2005): Development of semen extenders by assessment of sperm viability in miniature pig semen. *Reprod Dev Biol* 29(4):247-252.
- Lin DS, Connor WE, Wolf DP, Neuringer M, Hachey DL (1993): Unique lipids of primate spermatozoa-desmosterol and docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 34:491-499.
- Maxwell WMC, 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, 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.
- Molinia FC, Evans G, Casares PI, Maxwell WM (1994): Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 36:113-122.
- Parks JE, Arion JW, Foore RH (1987): Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1249-1258.
- Plummer JM, Watson PF (1985): Ultrastructural localization of calcium ions in ram spermatozoa before and after cold shock as demonstrated by a pyroantimonate technique. *J Rprod Fertil* 75:255-263.

20. Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 164:666-676.
21. Purdy PH (2006): A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum Res* 6:215-225.
22. 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.
23. 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.
24. Wilmot I, Salamon S, Polge C (1973): Deep freezing of boar semen II. Effect of method of dilution, glycerol concentration, and time of semen-glycerol contact on survival of spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 26:231.
25. 김성곤, 장현용, 박동현, 박춘근, 정희태, 김정익, 양부근 (2006): 돼지 정액의 간편 동결 방법 확립과 동결 정액의 용해 후 생존성 평가. *한국동물번식학회지* 30:59-64.
26. 이용승, 최원철, 이승형, 정희태, 이상영, 양부근, 박춘근 (2006): Miniature Pig와 Duroc 종간의 동결-용해 후 정액 성상 비교. *한국수정란이식학회지* 21:263-271. (접수일자: 2011. 9. 2 / 채택일자: 2011. 9. 9)