

Alpha 1,3-Galactosyltransferase (GalT) Knock-out 복제 미니돼지 정액의 동결-용해 후 정액 성상 분석

우제석¹ · 이용승³ · 유한준³ · 황성수¹ · 오건봉¹ · 정희태² · 양부근³ · 박수봉¹ · 박춘근^{3,*}

¹국립축산과학원, ²강원대학교 수의과대학, ³강원대학교 동물생명과학대학

Analysis of Frozen-Thawed Sperm Characteristic in Alpha 1,3-Galactosyltransferase(GalT) Knock-out Cloned Miniature Pig

Jea-Seok Woo¹, Yong-Seung Lee³, Han-Jun Yoo³, Seong Soo Hwang¹, Keon Bong Oh¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang³, Soo Bong Park¹ and Choon-Keun Park^{3,*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was undertaken to evaluate of cryopreservation efficiency in a 1,3-galactosyltransferase knock-out(GalT KO) cloned miniature pig sperm. To compare ability of frozen-thawed sperm characteristics, three different pig strains (GalT KO) cloned miniature pig, PWG miniature pig and Duroc were used. The ejaculated semen from the three pig species 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. After thawing, the sperm ability were assessed for viability (SYBR-14/PI staining), abnormality (Rose Bengal staining), and acrosome status (intactness, intensity and capacitation) (chlorotetracycline, CTC staining). The viability of frozen-thawed GalT KO pig sperm had no significant difference as compared with Duroc and PWG miniature pig sperm. However, The CTC pattern of frozen-thawed GalT KO cloned miniature pig spermatozoa showed significantly lower rates in F pattern and AR pattern ($p < 0.05$) and significantly higher rates in B pattern than Duroc and PWG miniature pig ($p < 0.05$). The abnormality of GalT KO cloned miniature pig sperm was significantly lower as compared to Duroc and PWG miniature pig sperm ($p < 0.05$). In conclusion, GalT KO cloned miniature pig semen can be cryopreserved successfully and used for artificial insemination reasonably.

(Key words : a 1,3-Galactosyltransferase knock out(GalT KO), Cloned miniature pig, Cryopreservation, Sperm ability, Duroc, PWG miniature pig)

서 론

생의학분야 및 유전공학과 생명공학기술의 발전은 형질전환동물을 이용한 치료용 생체물질의 대량 생산, 유전자치료, 줄기세포배양 기술 및 백신 개발에 의한 난치병 치료 그리고 이종이식이 가능한 바이오 장기용 동물의 생산을 가능하게 하였다.

사람과 해부 생리학적으로 유사한 돼지를 이용한 이종간 장기이식은 부족한 장기이식 문제를 해결해 줄 대안으로 떠오르고 있다. 그러나 돼지 혈관 내 α 1,3-galacto-

syltransferase (GalT) 항원에 의해 이종간 장기이식 시 사람과 비영장류에서의 초급성 면역 반응이 일어나는 것으로 보고되었다 (Good 등, 1992). 비록 아직까지 완전히 면역적인 문제를 해결하지 못했지만, Gal oligosaccharide의 발현을 억제(knock-out, KO)하여 초급성 면역 거부 반응에 의한 문제를 극복해 나가고 있다(Cooper 등, 1993; Phelps 등, 2003). 또한, Cooper와 David (2006)는 바분원숭이 (Baboon)에 GalT KO 돼지의 장기를 이종간 장기이식을 시행하여 때에 최대 약 180일 정도를 생존하였고 보고하였다. 국내에서도 GalT KO된 형질 전환 복제 미니돼지 생산에 성공하였다고 보고하였다(Ahn 등, 2011).

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

따라서 GalT KO된 복제돼지의 생산은 이종간 면역 연구나 형질 전환 그리고 장기 이식 등의 연구에 활용될 것으로 생각된다.

그러나 GalT KO 돼지 등 형질전환 복제동물의 생산에 있어 고비용과 장시간이 소요되고, 전염성 질병의 노출 우려나, 급작스러운 폐사 및 수명의 한계로 인한 유전자원 손실이 발생할 수 있으므로 유전자의 보존 차원과 특정형질의 유전자원의 생산성 향상과 이용성 증대를 위해 동결 보존 기술을 이용한 생식세포 유전 자원 보존이 필요하다.

돼지 정액은 내동성이 약하고(Polge 등, 1970), 동결 용해 후의 침체 이상율이 높은 것으로 보고되었다(Potter 등, 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. 그러나 많은 연구를 통해 Eriksson 등 (2002)은 동결 정액을 이용한 인공 수정 기술이 신선 정액을 이용한 결과와 큰 차이 없이 비슷한 결과를 얻었다. 또한, LEY 동결 방법을 이용한 미니돼지와 Duroc 종간의 정액 동결 성상의 차이를 비교하였을 때 미니돼지가 Duroc의 동결정액보다 생존율이 높고 침체 손상이 낮게 나타났다는 보고가 있다(이 등, 2006). 위와 같은 사실은 돼지 정액 동결보존 기술이 발전되어 효율성이 있고, 돼지 종에 따른 내동성의 차이를 가지는 것을 의미하게 된다.

따라서 본 연구는 GalT KO 복제 미니돼지의 정액 동결보존의 효율성을 검증하기 위해 일반 가축용 돼지에 인공수정용으로 많이 이용되는 Duroc 종 돼지 정액과 60 kg의 실험용 미니돼지인 PWG 미니돼지 M type 종의 정액을 GalT KO 돼지 정액과 동결 용해 후 정액 성상을 비교함으로써 앞으로의 GalT KO 돼지 정자의 동결보존법에 관한 추가적인 연구가 필요한지를 판단하고자 한다.

그러므로 본 연구에서는 GalT KO 복제 미니돼지의 동결 전·후의 정액 성상을 차이를 살펴보기 위하여 일반적으로 가장 많이 활용되고 있는 Duroc 종 돼지 정액과 복제돼지와 크기가 유사한 PWG 미니돼지 M type 종의 정액을 이용하여 생존성, 기형율 및 침체율 등에 대한 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

정액 채취

본 연구에 이용된 GalT KO 복제 미니돼지(75 kg)의 정액은 국립축산과학원에서 채취하여 강원대학교로 운반하였고, 비교분석을 위해 이용된 정액은 금보육종에서 시판 중인 Duroc 종(180 kg)의 정액과 강원대학교 목장에서 사육 중인 PWG Miniature pig M type(60 kg)에서 음경 수압법으로 정액을 채취하여 강원대학교에서 각각 동결 및 분석하였다. 본 연구에서는 모두 1차 회석된 정액을 이용하였다.

동결액 준비

1차 동결액은 11% α -lactose 용액(Sigma) 80 ml와 egg

yolk 20 ml를 2시간 동안 혼합하여 원심분리(2,000 \times g, 5°C, 30분) 하여 상층액을 사용하였다. 2차 동결액은 1차 동결액에 1.5% Orvus Es Paste(OEP; Nova Chem., U.S.A)와 9% glycerol(Sigma)을 첨가하여 냉장보관하여 실험에 사용하였다. 동결 시 OEP와 glycerol의 최종 농도는 각각 0.5%와 3%였다.

정액 동결

운반된 회석정액을 상온(25°C)에서 1시간 정도 정치시킨 후 원심분리(400 \times g, 15°C, 10분)한 후, 1차 동결액을 정자 농도 1×10^9 이 되도록 첨가하였다. 1차 동결액이 첨가된 정액을 25°C의 물 1 l가 담긴 플라스틱 통에 넣고 주변에 얼음을 채워 넣어 5°C까지 1시간 30분 동안 냉각시켰다. 냉각시킨 후 2차 동결액을 1차 동결액량의 1/2을 첨가하여 0.5 ml straw를 제작하였다. 제작된 straw는 styrofoam box에 담겨져 있는 액체질소 표면의 6 cm 정도에서 10분간 정치 후 액체질소에 침적하여 액체질소에서 보관하였다.

동결정액 용해

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

일반 성상검사

생존율 검사(SYBR-14/PI Staining)

생존율 검사는 Maxwell과 Johnson(1997)의 Live/DeadTM sperm viability kit (Molecular Probes)를 이용한 방법을 수정·보완하여 실시하였다. Live sperm과 dead sperm 사이의 DNA의 차이를 이용한 형광 염색 방법으로 live sperm은 녹색으로 염색되며, dead sperm은 붉은색으로 염색되게 된다. 실험 과정은 100 μ l의 정액에 1 ml의 HEPES(Sigma)+0.1% BSA와 5 μ l의 SYBR-14 working stock (2 μ l SYBR-14+198 μ l DMSO)을 첨가하여 incubator(37°C) 상에서 10분간 정치시켰다. 10분 후 5 μ l의 PI(Propidium Iodide)를 첨가하여 incubator(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 μ l에 1 ml의 saline+5% FBS를 첨가하여 원심분리(400 \times g, 10분)한 후 상층액을 제거하여, saline+5% FBS 200 μ l로 부유시켰다. 정자부유액 100 μ l를 side glass 위에 옮겨 도말하여, 실온에서 완전히 건조시킨 후 Rose-Bengal 염색액 500 μ l를 떨어뜨려 염색한 후 현미경(400배) 하에서 기형정자를 관찰하였다.

침체율 검사 (Chlortetracycline; CTC)

Wang 등(1995)과 Abeydeera 등(1997)의 방법을 수정·보완하여 침체율을 검사하였다. 정자부유액 100 μ l에 2 μ l의 Hoechst33258을 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 μ l의 PBS를 부유시켰다. 부유된 정액에 동량의 CTC solution(750 μ M chlortetracycline (Sigma)+5 mM cysteine+130 mM NaCl+20 mM Tris(pH 7.8))을 첨가시키고, 실온에서 3분간 정치시켰다. 그 후 8 μ l의 CTC fixative {12.5% (w/v) paraformaldehyde+0.5 M Tris-HCl(pH 7.4)}를 첨가하여 정자를 고정시켰다. 제작된 CTC sample 중 10 μ l를 slide glass에 분주하여 5 μ l의 DABCO와 혼합하여, 형광현미경 (400배) 하에서 정자 두부를 관찰하였다. CTC에 염색된 정자 중 두부 전체가 황색 형광으로 염색된 것은 수정능 획득 및 침체반응이 일어나지 않은 정자(F), 침체부위만 염색된 것은 수정능 획득이 일어난 정자(B), 두부가 거의 되지 않은 것은 침체반응이 일어난 정자(AR)로 판정하였다.

통계 처리 (Statistical Analysis)

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS@9.2 package/PC를 이용하여 동결 전 후 정액성상에 관한 유의차 검정은 최소 유의차 검정(Least Significant Different test ; LSD test)을 이용하였고, 돼지 종간의 정액성상의 유의적 차이 분석은 Duncan의 Multiple Range Test에 의하여 유의차 ($p<0.05$)를 검정하였다.

결 과

정액의 외부 성상

동결보존 전 각각의 돼지종별 정액의 외부성상을 비교한 결과는 Table 1에서 나타났다. 정액의 1회 사정량의 경우 Duroc이 약 2배 정도가 많은 양이 채정되며, GalT KO 돼지가 가장 적은 양이 채정되었다 ($p<0.05$). 그리고 1 ml당 정자의 수를 비교한 결과 역시 유의적으로 ($p<0.05$) Duroc이 가장 많은 $7.5\pm 0.3\times 10^8$ /ml를 나타냈으며, 유의적으로 ($p<0.05$) 가장 적은 돼지 종은 PWG 미니돼지로 정자가 $1.9\pm 0.2\times 10^8$ /ml로 나타났다. 총 정자 수의 경우도 Duroc이 다른 돼지 종에 비해 유의적으로 가장 높게 나타났다 ($1531.6\pm 60.2\times 10^8$) 약 7배 정도의 차이를 나타냈다. 정액의 외부성상을 비교한 결과, GalT KO 돼지의 정

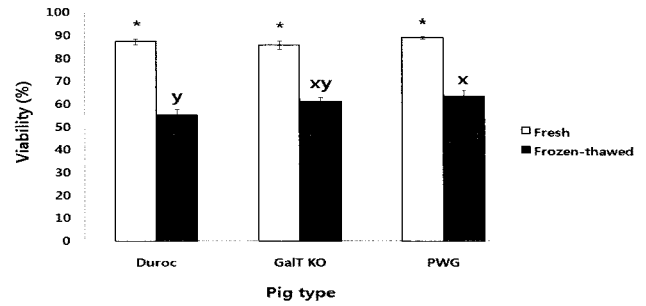


Fig. 1. Change of frozen-thawed sperm viability by different pig species. ^{xy}: Bars with different superscripts within the same receptor category differ significantly. *: Significantly difference between fresh and frozen-thawed sperm in same pig species ($p<0.05$).

우 가축용 돼지인 Duroc에 비해 정액량, 정자 농도 및 총 정자 수에서 평균적으로 약 3, 2 및 9배 정도의 차이가 나타났다. 비교적 크기가 비슷한 PWG 미니돼지와 비교한 결과에서는 정자 농도가 PWG 미니돼지($1.9\pm 0.2\times 10^8$ /ml)에 비해 유의적으로 ($p<0.05$) 높게($4.0\pm 1.1\times 10^8$ /ml) 나타났다. 정액량과 총 정자 수의 경우 PWG 미니돼지가 정액이 127 ± 8.2 ml, 총 정자 수가 $231.0\pm 15.1\times 10^8$ 으로 정액량이 65.3 ± 19.1 ml, 총 정자 수가 $169.7\pm 28.3\times 10^8$ 인 GalT KO 돼지에 비해 유의적으로 ($p<0.05$) 높게 나타났다.

동결-융해 후 정자성상

동결-융해 후 돼지 종에 따른 생존율의 차이를 분석한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 동결실험에 이용된 정액은 Fig. 1에서와 같이 80% 이상의 생존율을 보인 신선 정액만을 실험에 이용하였고, 신선정액의 생존율을 분석한 결과, 실험에 이용된 신선정액 간의 유의적인 ($p<0.05$) 차이가 없었다. 동결 융해 후 생존율이 유의적으로 ($p<0.05$) 가장 높은 종은 PWG 미니돼지로 $63.6\pm 2.4\%$ 였으며, 가장 낮은 종은 $55.3\pm 2.6\%$ 로 Duroc 종이었고, GalT KO 돼지는 $61.1\pm 2.0\%$ 의 생존율을 보였다.

동결 전후 정자의 침체 상태를 분석하기 위해 chlortetracycline 염색을 통한 침체막의 pattern을 분석한 결과는 Fig. 2, 3 및 4에서 나타냈으며, 그 결과 수정능획득이 일어나지 않은 정자 막이 온전한 상태인 F pattern을 분석한 결과에서 돼지 종간의 유의적 ($p<0.05$) 차이를 나타냈으며, Duroc 종이 $36.5\pm 1.2\%$ 로 가장 높았고 GalT KO 돼지가 $20.6\pm 1.4\%$ 로 가장 낮은 F pattern 율을 나타냈다. 또한, 모든 돼지 종에서 동결 후 F pattern 율이 유의적

Table 1. Characteristic of pig semen

Pig type	Semen characteristic		
	Volume (ml)	Concentration (sperm $\times 10^8$ /ml)	Total sperm (sperm $\times 10^8$)
PWG miniature pig	127 ± 8.2^b	1.9 ± 0.2^c	231.0 ± 15.1^b
GalT KO pig	65.3 ± 19.1^c	4.0 ± 1.1^b	169.7 ± 28.3^b
Duroc	213.2 ± 8.8^a	7.5 ± 0.3^a	$1,531.6\pm 60.2^a$

* Mean \pm SEM. n= PWG and GalT KO pig: 7 Replicate ; Duroc: 53 replicate $p<0.05$.

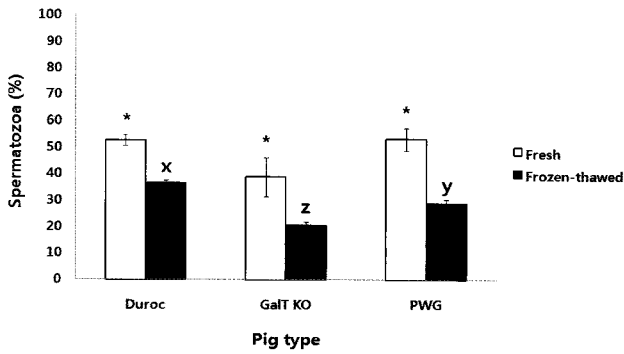


Fig. 2. Change of F pattern rate in sperm acrosome frozen-thawed in different pig species. ^{x-z} : Bars with different superscripts within the same receptor category differ significantly. * : Significantly difference between fresh and frozen-thawed sperm in same pig species ($p < 0.05$).

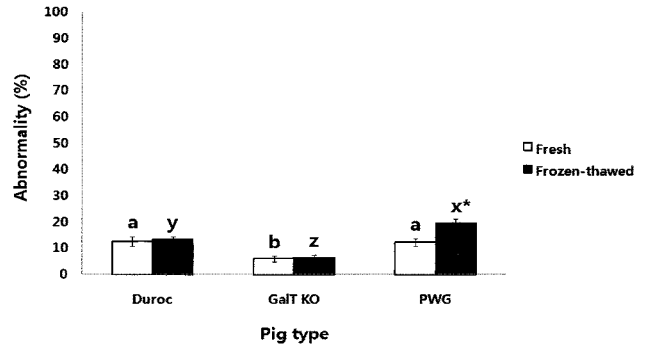


Fig. 5. Change of frozen-thawed sperm abnormality in different pig species. ^{a,b, x-z} : Bars with different superscripts within the same receptor category differ significantly. * : Significantly difference between fresh and frozen-thawed sperm in same pig species ($p < 0.05$).

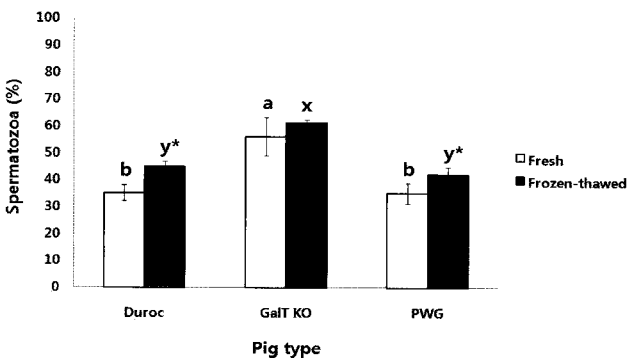


Fig. 3. Change of B pattern rate in sperm acrosome frozen-thawed in different pig species. ^{a,b, x,y} : Bars with different superscripts within the same receptor category differ significantly. * : Significantly difference between fresh and frozen-thawed sperm in same pig species ($p < 0.05$).

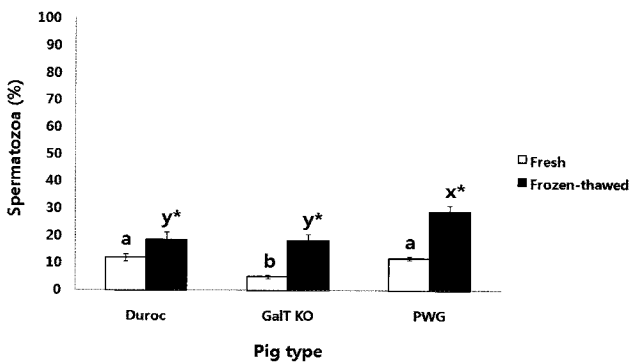


Fig. 4. Change of AR pattern rate in sperm acrosome frozen-thawed in different pig species. ^{a,b, x,y} : Bars with different superscripts within the same receptor category differ significantly. * : Significantly difference between fresh and frozen-thawed sperm in same pig species ($p < 0.05$).

로 ($p < 0.05$) 낮게 나타났다. 수정 능력이 획득된 즉 침체 외막이 밖으로 드러난 상태인 B pattern의 경우 GalT KO 돼지를 제외한 다른 돼지 종에서는 동결 후 B pattern 율이 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가하였으나, GalT KO 돼지는

유의적 차이를 나타내지 않았다. 그러나 신선정액이나 동결정액의 B pattern 율을 비교한 결과 GalT KO 돼지가 신선정액($56.1 \pm 7.1\%$)과 동결정액($61.2 \pm 1.3\%$)의 B pattern 율에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 가장 높게 나타났다. 침체막이 손상되어 수정 능력이 상실된 AR pattern의 경우 모든 돼지 종에서 동결 후 정액의 비율이 유의적으로 ($p < 0.05$) 높아졌다. 특히 GalT KO 돼지의 경우 다른 돼지 종에 비해 신선정액($5.0 \pm 0.7\%$)과 동결정액($18.2 \pm 2.5\%$)의 AR pattern 율이 유의적으로 ($p < 0.05$) 가장 낮게 나타났다. 한편, PWG 미니돼지의 동결정액 AR pattern 율이 $29 \pm 2.2\%$ 로 다른 종에 비해 유의적으로 ($p < 0.05$) 가장 높게 나타났다. 전체적으로 동결 후 정자의 침체 상태는 F pattern이 감소하며, B와 AR pattern이 증가하는 것으로 나타났으며, GalT KO 돼지의 경우 AR pattern 율이 낮아 동결에 따른 침체 손상이 적게 발생된 것으로 나타났다.

기형율은 Fig. 5에서와 같이 동결정액의 경우 GalT KO 돼지($6.5 \pm 0.8\%$)가 다른 종에 비하여 유의적으로 ($p < 0.05$) 낮은 기형율을 나타냈으며, PWG 미니돼지($19.5 \pm 1.5\%$)가 가장 높은 기형율을 나타냈다. Duroc 종과 GalT KO 돼지의 경우 동결 전후 뚜렷한 기형율의 변화는 없었으나, PWG 미니돼지의 경우 동결 후 정액의 기형율이 $12.2 \pm 1.5\%$ 에서 $19.5 \pm 1.5\%$ 로 유의적인 ($p < 0.05$) 증가를 보였다.

고찰

본 연구는 GalT KO 복제 미니돼지의 동결 전·후의 정액성상 효율을 검증하기 위해 비교하고자 돼지 종을 일 반 가축에 이용되는 약 180 kg 정도의 Duroc 종의 정액과 SPF 환경에서 생산되어 실험용 돼지로 이용되는 PWG 사의 약 60 kg 정도의 M type의 미니돼지 정액을 비교분석함으로써 체중의 차이와 Table 1에서와 같이 정액채취 시 외부 성상의 차이를 보이는 돼지 종간의 비교분석을 통해 GalT KO 돼지의 동결보존 효율의 차이와 LEY 동결액이 GalT KO 돼지 정액을 동결 보존하는데 적합한지를 판단하고자 연구를 진행하였다. 정액 채취에 따른 차이는 Table 1에서 나타냈듯이 Duroc의 정액 사정량, 정자

농도 그리고 총정자 수에서 압도적으로 높게 나타났으며, 미니돼지인 PWG 돼지와 GalT KO 돼지는 사정량에서는 PWG가 높았으나, 정자 농도면에서 GalT KO 복제 미니돼지가 높아 최종적인 총 정자수의 차이는 보이지 않았다. 정액의 이용효율에 있어서 정액의 외부 성상은 중요하다. 많은 양의 정액과 정자가 사출된다는 것은 곳 다량의 유전자원을 보존할 수 있고, 많은 개체의 인공수정에 이용될 수 있다. 그런 의미에서의 GalT KO 복제 미니돼지는 가축으로 분류된 Duroc 종에는 미치지 못하였으나, 크기상으로 비슷한 PWG 미니돼지와 비교하여 총정자 수의 유의적인 ($p < 0.05$) 차이를 보이지 않았다는 점에서의 실험용 미니돼지 정도의 정자 이용효율을 가졌다고 판단할 수 있다.

정액 동결 시 가장 중요한 문제점은 동해로부터 정자 세포를 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 변화를 억제하는 것으로 판단되어진다(review Holt, 2000). 콜레스테롤과 인지질의 비율은 냉각충격과의 연관이 있으며(Darin-Bennett와 White, 1977), 원형질막내 콜레스테롤은 냉각 과정 동안의 인지질의 불안정화를 억제시킨다(review Holt, 2000). 특히 돼지 정자는 다른 종에 비해 원형질막내 인지질 비율이 높음 것으로 알려져 있다(Park와 Lynch, 1992). Loomis와 Graham (2008)은 말 정자의 원형질막내 지방산과 스테로이드의 차이가 각각의 개체에 따른 동결생존율에 영향을 미친다는 보고하였다. 본 연구에서도 GalT KO 복제 미니돼지, PWG 미니돼지 그리고 Duroc 종의 정자를 동결 용해 후 정액 성상을 비교한 결과, 돼지 종에 따른 생존율의 유의적 차이가 발생하였으며, PWG 미니돼지가 63.6±2.4%로 가장 높게 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과는 미니돼지가 Duroc 종보다 생존율이 더 높다는 이 등 (2006)의 보고와 일치하였다. 또한, GalT KO 돼지도 61.1±2.0%로 PWG 미니돼지와 Duroc 종의 사이에 존재하였으며, 신뢰범위를 90%로 하였을 때 Duroc 종에 비해 유의적으로($p < 0.1$) 높은 생존율을 나타냈다. CTC 분석을 통한 침체손상을 분석한 결과에서도 GalT KO 복제 미니돼지는 유의적으로($p < 0.05$) 가장 낮은 6.5±0.8%를 나타냈다. 이와 같은 결과는 앞선 연구에서의 동물 종에 따른 정자막내 인지질과 콜레스테롤의 비율 차이가 있고, 그로 인한 동결보존 시 냉각 충격의 차이가 발생하며, 이러한 정자막내 지질구성이 동일 종에서 개체간 차이를 보인다는 점으로 봤을 때 돼지 종에서도 개체간이나 종에 따른 정자막 지질구성의 차이로 인한 Fig. 1과 Fig. 4에와 같은 정자의 생존율과 침체손상 정도의 차이를 보인 것으로 판단된다.

정액의 동결 보존 과정 시 정자는 원형질막의 손상으로 인해 세포막의 침투성이 증가와 세포막이 변성을 가져온다. 이와 같은 세포의 변성은 침체에 이상을 유발시켜 용해 후 생존율과 수정율의 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 난자 내 침

투 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 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서도 B pattern과 AR pattern이 증가하는 양상을 나타냈으며, GalT KO 돼지는 B pattern 비율이 유의적으로($p < 0.05$) 가장 높게 나타났으며, 침체막이 완전히 손상되어 수정 능력이 상실된 AR pattern 비율은 유의적으로($p < 0.05$) 가장 낮게 나타났다. 이는 동결 과정 동안에 GalT KO 돼지 정자가 다른 돼지 종에 비해 침체막 손상에 따른 변화 영향을 덜 받았다는 것을 증명한다.

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 매우 중요하지는 않지만 기형율이 20% 이상일 경우 수태율이 저하된다(Pursel 등, 1972). 본 연구 결과에서는 GalT KO 복제 미니돼지의 기형율이 유의적으로($p < 0.05$) 가장 낮은 6.5±0.8%로 동결 전 후에 따른 기형율의 유의적인 변화는 나타나지 않았다.

그러므로 본 연구를 통해 얻어진 GalT KO 복제 미니돼지 정자의 효율성을 정리해 보면 정액 사출에 따른 정액 외부성상 면에서 가축종인 Duroc에는 미치지 못했지만 실험용 미니돼지인 PWG와의 유의적인 차이는 없었다. GalT KO 복제 미니돼지 정액을 액상보존하여 인공수정에 이용하였을 시 1회 정액 주입량을 100 ml 정자 농도를 2×10^7 /ml로 했을 시 약 8.5마리의 돼지에 인공수정이 가능하며, 동결보존 시 1개의 5 ml straw에 들어가는 정자의 수가 약 3.3×10^9 로 계산할 때 약 5.14개의 5 ml straw를 제작할 수 있다. 동결 용해 후 정자 성상분석을 통해 동결보존 효율을 분석한 결과 생존율에서는 Duroc 종보다 높고, 수정 능력과 직접적인 연관성을 가지는 침체 상태는 동결에 따른 손상이 PWG 미니돼지와 Duroc 종 정자보다 낮게 나타났다. 또한, 기형율에서도 동결 전 후에 따른 기형율 증가는 없었으며, 10% 이하의 낮은 기형율을 나타낸 점으로 보아 LEY 동결 방법으로 인한 GalT KO 복제 미니돼지 정액의 동결보존 효율은 높다고 판단된다. 그러나 돼지 종간 동결 용해 후 정액 성상의 차이는 돼지 종에 따른 막 지질의 차이가 있는 것으로 보아 앞으로의 연구에서 돼지의 종과 개체별에 따른 적합한 동결 방법의 개선 연구가 필요하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 시판 중인 Duroc 정액과 정보를 제공해 주신 금보육종과 정액 성상 분석에 있어서 장비의 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

이용문헌

1. Ahn KS, Kim YJ, Kim M, Lee BH, Heo SY, Kang

- MJ, Kang YK, Lee JW, Lee KK, Kim JH, Nho WG, Hwang SS, Woo JS, Park JK, Park SB, Shim H (2011): Resurrection of an α -1,3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theriogenology* 75:933-939.
2. Cooper DKC, David KC (2006): Xenotransplantation: the road ahead. *Curr Opin Organ Transplant* 11: 151-153.
 3. Cooper DKC, Koren E, Oriol R (1993): Genetically engineered pigs. *Lancet* 342:682-683.
 4. Darin-Bennett A, White IG (1977): Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology* 14:466-470.
 5. Eriksson BM, Petersson, Rodroguez-martinez H (2002): Field fertility with exported boar semen frozen in the new Flac Pack container. *Theriogenology* 58: 1065-1079.
 6. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC (1997): Capacitation status and fertility of fresh and frozen thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9:481-487.
 7. Good AH, Cooper DKC, Malcolm AJ, Ippolito RM, Koren E, Neethling FA, Ye Y, Zuhdi N, Lamontagne LR (1992): Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc* 24:559-562.
 8. Holt WV (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62:3-22.
 9. Lee SH, Cheong HT, Yang BK, Park CK (2005): Development of semen extenders by assessment of sperm viability in miniature pig semen. *Reprod Dev Bio* 29:247-252.
 10. 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.
 11. Loomis PB, Graham JK (2008): Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci* 105:119-128.
 12. Maxwell WMC, Johnson LA (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
 13. Mazur P (1984): Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:C125-C-142.
 14. Neild DM, Gadella BM, Maria GC, Marcelo H, Miragaya C, Colenbrander B, Aguero A (2003): Membrane changes during different stages of a freeze thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59:1693-1705.
 15. Park JE, Lynch DV (1992): Lipid-composition and thermotropic phase-behavior of boar, bull, stallion and rooster spermatozoa. *Cryobiology* 29:255-266.
 16. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL (2003): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411-414.
 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, Rampacek GB (1972) Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci* 34:278-283.
 20. 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.
 21. 김성근, 장현용, 박동현, 박춘근, 정희태, 김정익, 양부근 (2006): 돼지 정액의 간편 동결 방법 확립과 동결정액의 용해 후 생존성 평가. *한국동물번식학회지* 30:59-64.
 22. 이용승, 최원철, 이승형, 정희태, 이상영, 양부근, 박춘근 (2006): Miniature Pig와 Duroc 종간의 동결-용해 후 정액 성장 비교. *한국수정란이식학회지* 21:263-271.
(접수일자: 2011. 9. 9 / 채택일자: 2011. 9. 22)