

다양한 Percoll 세척 방법이 동결-융해된 한우 정자의 회수율 및 운동역학에 미치는 영향

윤성재¹ · 박유진¹ · 정진용¹ · 정규현¹ · 김민섭¹ · 유새미¹ ·
김연희¹ · 권우성¹ · El-Sayed A. Mohamed¹ · 방명걸^{1,2,*}

¹중앙대학교 생명자원공학부 동물생명공학전공, ²중앙대학교 생명환경연구원

Effect of Various Percoll Washings on Motile Sperm Recovery Rate and Motion Kinematics in Frozen-thawed Bovine Semen

Sung-Jae Yoon¹, Yoo-Jin Park¹, Jin-Yong Cheong¹, Kyu-Hyun Jeong¹, Min-Seop Kim¹, Sae-Mi Yoo¹,
Yun-Hee Kim¹, Woo-Sung Kwon¹, El-Sayed A. Mohamed¹ and Myung-Geol Pang^{1,2,*}

¹Department of Animal Science and Technology, School of Bioresource & Bioscience,

Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

²BET Research Institute, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to examine the effect of various discontinuous Percoll washing conditions on motile sperm recovery rate and motion kinematics. Frozen semen samples from 3 bulls (0.5 ml plastic straws, 6% glycerol in egg yolk-Tris-glycerol extender) were thawed in 37°C water bath for 1 min. After thawing, the mixed semen samples were randomly allocated to 12 treatment groups. Briefly, the spermatozoa were centrifuged for three different time lengths (10, 20, and 30 min) at two gravities (300×g and 700×g) through two concentrations of discontinuous Percoll density gradient of 1 ml 90%: 1 ml 45% Percoll and 2 ml 90%: 2 ml 45% Percoll to remove extender, debris, and dead spermatozoa. Motile sperm recovery rate and motion kinematics were evaluated by computer assisted sperm analyzer using Makler counting chamber. Sperm motility (%) and motile sperm recovery rate showed similar pattern in all treatment groups. However, sperm motility (%) and motile sperm recovery rate were highest at 700×g for 30 min through a discontinuous Percoll density gradient of 1 ml 90%: 1 ml 45% Percoll. There were no significant differences in motion kinematics after various Percoll washings. These results suggest that force of centrifugation, centrifugation time, and Percoll volume significantly affect motile sperm recovery rate.

(Key words : Bovine frozen semen, Cryopreservation, Percoll, Motion kinematics, Motile sperm recovery rate)

서 론

소에서 동결정액을 이용한 인공수정은 생산 효율 및 이용 효율을 증진시키기 위해 보편적으로 사용되는 방법이다. 하지만 인공수정의 성공률은 50% 정도이며, 이러한 이유 때문에 농가에서는 자연교배로 회귀하려는 경향이 늘고 있다. 그러므로 인공수정의 성공률을 높이기 위해서는 동결정액에서 수태성 진단 혹은 예측에 관한 연구가 선행되어야 한다. 현재 사용되는 정액 검사 방법으로는 computer assisted sperm analysis(CASA; Holt 등, 1997), chlortetracycline(CTC) 염색법(Thundathil 등, 1999), *In-*

vitro fertilization(Parrish 등, 1986), 자궁점막 혹은 난자 침투법(Sharara 등, 1995), 투명대 제거 햄스터 난자를 이용한 정자 침입법 (sperm penetration assay; Oh 등, 2010)등이 사용되고 있다. 이러한 정자 검사 시 정장성분과 동해 방지제로 사용하는 glycerol 등은 체외 정자처리 시 악영향을 끼치므로 정확한 검사를 위해서는 이러한 물질을 완벽히 제거하고 운동성 정자만을 분리해 내는 중요한 단계를 거쳐야만 한다(Henkel과 Schill, 2003). 현재 동결 융해된 소 정액의 검사에서 주로 사용되는 Percoll density gradient 방법은 수정율에 악영향을 끼치는 죽은 정자 및 정자와의 물질을 감소시키고(Reddy 등, 1979), 정자의 운동성(%) 및 형태적으로 정상 정자의 회수율을

* 이 논문은 2009년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-31-670-4841, E-mail: mgpang@cau.ac.kr

높여준다(Parrish 등, 1995; Somfai 등, 2002). 하지만 원심 분리 조건과 Percoll의 농도 등 수많은 Percoll 세척 조건에 따른 정자의 기능 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구는 다양한 Percoll 세척 조건들에서 정자의 회수율과 운동역학 변수를 비교하여 원심분리의 조건에 따른 운동성 정자 회수율, 운동성(%) 및 운동역학 변화를 측정하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

동결보존액 및 배양액 조성

본 실험에 사용된 보존액은 Tris-egg yolk buffer(TYB; 250 mM Tris, 88.5 mM citric acid, 68.8 mM glucose, 20% egg yolk)를 사용하였고, 배양액으로는 Tyrode's albumin lactated pyruvate(TALP; 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM lactate, 2 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM pyruvate)를 사용하였다.

정액의 동결

사용된 한우 수소의 정액은 (주)서문축산(경기도 화성시)에서 도축된 수소의 정소상체 미부에서 채취하였다. 채취된 정액은 TYB에 희석하여 2시간 동안 천천히 4℃까지 온도를 하강시켰다. 동결 stress를 최소화하기 위하여 glycerol이 12% 함유된 TYB를 각각 20분의 간격을 두고 1, 2, 4 ml로 희석하여 최종 6% 희석정액을 제조하였다. 평형을 맞추기 위해 다시 4℃에서 2시간 동안 정치시켰다. 이후 0.5 ml straw에 정액을 주입하고 액체질소 위 2.5 cm 높이의 증기에서 15분간 방치한 후 액체질소에 넣어 보관하였다.

정액의 세척

동결 보존된 3개체의 정액을 37℃ 증류수에서 1분간 용해하여 15 ml tube에 옮겨 담았다. 사용된 3개체의 정액을 혼합하여 사용하였다. Percoll 원액을 10×Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)와 9:1비율(v/v)로 희석하여 90% Percoll을 제조하였다. 또한, 90% Percoll과

1×DPBS를 각각 1:1의 비율(v/v)로 희석하여 45% Percoll을 제조한 후, 이를 이용하여 12개의 처리 조건을 만들었다. 먼저 1 ml 90%: 1 ml 45% Percoll 위에 정액을 0.5 ml씩 분주하여 300×g에서 10분(T300/10-1), 20분(T300/20-1) 및 30분간(T300/30-1) 원심분리하였고, 2 ml 90%: 2 ml 45% Percoll 위에 정액을 0.5 ml씩 분주하여 300×g에서 10분(T300/10-2), 20분(T300/20-2) 및 30분간(T300/30-2) 원심분리하였다. 또한, 1 ml 90%: 1 ml 45% Percoll 위에 정액을 0.5 ml씩 분주하여 700×g에서 10분(T700/10-1), 20분(T700/20-1), 및 30분(T700/30-1) 원심분리하였다. 2 ml 90%: 2 ml 45% Percoll 위에 정액을 0.5 ml씩 분주하여 700×g에서 10분(T700/10-2), 20분(T700/20-2), 및 30분(T700/30-2) 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 최하단의 정자만을 회수하였으며, Percoll을 제거하기 위해 TALP 5 ml를 첨가하여 5분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 TALP media를 1 ml 첨가하여 정자를 재부유하였다.

CASA를 이용한 운동성 정자 회수율 및 운동성(%) 측정

동결 용해된 정자 10 µl를 39℃로 가열된 Makler counting chamber에 올린 후 CCD 카메라(JVC, Japan)가 부착된 광학현미경(Nikon, Japan)에 연결된 SAIS system (Medical Supply, 서울, 한국)을 이용하여 운동성 정자 회수율(%) 및 운동역학 변수를 측정하였다. 위의 Percoll 방법으로 세척후 각 처리구에 따른 운동성 정자 회수율과 정자 운동역학 변수를 비교하였다. 정자의 운동역학 변수 측정에 대한 각 항목의 정의는 Table 1과 같다. 운동성 정자의 회수율은 아래 공식에 근거하여 산출하였다(방 등, 1993).

Motile Sperm Recovery Rate (%)

$$= \frac{\text{Concentration}(i) \times \text{Volume}(i) \times \text{Motility}(i)}{\text{Concentration}(f) \times \text{Volume}(f) \times \text{Motility}(f)} \times 100$$

i: 용해 직후의 정액분석 결과

f: 정액 처리 후 정액분석 결과

통계 분석

통계 분석은 통계 프로그램(SPSS 12.0)을 사용하였으며,

Table 1. Definition of chosen motility kinematic descriptions

Name	Units	Description
Curvilinear velocity (VCL)	µm/s	Time-average velocity of sperm head along its actual curvilinear trajectory as perceived in two dimensions under the microscope
Straight-line velocity (VSL)	µm/s	Time-average of a sperm head along the straight line between its first detected position and its last position
Average path velocity (VAP)	µm/s	Time-average velocity of a sperm head along its spatial average trajectory
Linearity (LIN)		VSL/VCL
Mean amplitude of head lateral displacement (ALH)	µm	Mean head displacement along its curvilinear trajectory around the mean trajectory
Percentage of hyperactivated sperm (HYP)	%	Percentage of sperm with increased curvilinear velocity and lateral head movement sperm, and decreased linearity; curvilinear velocity ≥ 80, linearity ≤ 65, amplitude of head lateral displacement ≥ 6.5

이원 분산 분석 및 T-test을 실시하여 각 처리군 간 운동성 정자 회수율 및 운동역학 변수를 비교 분석하였다. 이변량 상관관계 분석과 다중 선형 회귀분석을 이용하여 운동성 정자 회수율과 운동성(%) 간의 상관 관계를 분석하였다. $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

처리구에 따른 운동성 정자 회수율의 차이

각 처리구에 따라 Percoll로 세척한 후 운동성 정자 회수율을 비교하였으며, 회수율의 차이는 Fig. 1과 같다. 원심력에 의한 차이에서는 T300/10-1, T700/30-1 및 T700/30-2를 제외하고는 1 ml/1 ml Percoll에서 2 ml/2 ml Percoll보다 유의적으로 높은 회수율을 보였다. 10분간 원심분리한 정자보다 30분간 원심분리한 정자에서 유의적으로 높은 회수율을 보였다. T300/10-1과 T700/30-1 및 T700/30-2에서는 유의적인 차이는 없었으나, 2 ml/2 ml Percoll에서 더 높은 회수율을 보였다. 300×g에서는 원심분리의 시간에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 반면에 700×g 조건에서는 원심분리 시간이 늘어날수록 운동성 정자 회수율이 증가하였으며, Percoll 1 ml 처리에서 2 ml 처리 시보다 운동성 정자 회수율이 높았다.

처리구에 따른 정자의 운동성(%) 및 운동역학 변화

Percoll 세척 조건에 따른 정자의 운동성(%) 변화 및

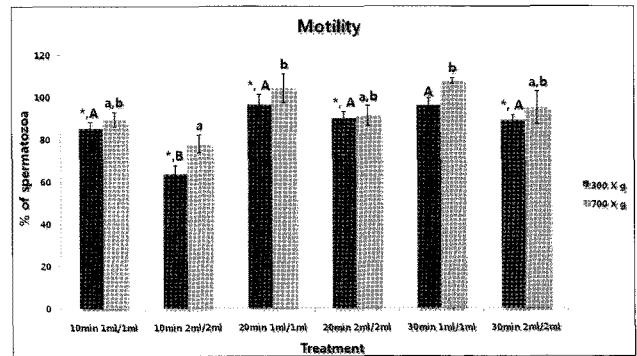
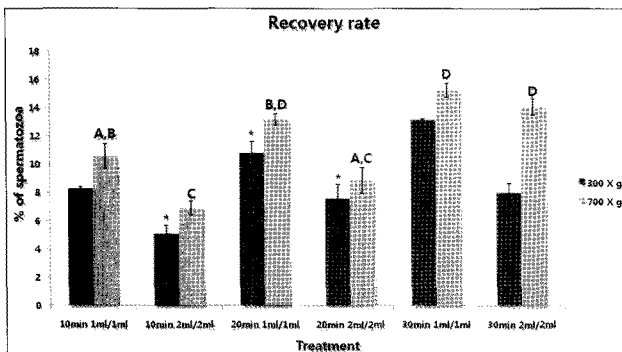


Fig. 1. Effects of Percoll volume and centrifugation time at 300×g and 700×g conditions on motile sperm recovery rate (%). The effects of different Percoll volume, centrifugation time, and gravity were compared. Data are expressed as the mean±SE. ^{A-D} Significantly different in 700×g ($p < 0.05$). * Significantly different between 300×g and 700×g ($p < 0.05$).

Fig. 2. Effects of Percoll volume and centrifugation time at 300×g and 700×g conditions on sperm motility (%). The effects of different Percoll volume, centrifugation time, and gravity were compared. Data are expressed as the mean±SE. ^{A,B} Significantly different in 300×g ($p < 0.05$), ^{a,b} Significantly different in 700×g ($p < 0.05$). * Significantly different between 300×g and 700×g ($p < 0.05$).

운동역학 변화를 CASA를 이용하여 비교하였다. 처리 조건에 따른 운동성(%) 변화는 Fig. 2와 같다. 원심력에 의한 차이에서는 T300/30-1과 T700/30-1을 제외하고는 700×g에서 유의적으로 높은 운동성(%)을 보였다. T300/10-1과 T300/10-2에서 1 ml의 Percoll을 사용하였을 때 2 ml Percoll 사용 시보다 운동성(%)이 높았다. 또한, 이를 제외한 모든 처리 조건에서 유의적인 차이는 없었지만 Percoll을 1 ml 사용하였을 때가 2 ml 사용하였을 때보다 운동성(%)이 높았다. 운동역학 변수인 HYP, VCL, VSL, VAP, LIN 및 ALH에서는 처리 조건에 따른 유의적인 차이가 발견되지 않았다.

운동성 정자 회수율 및 운동성(%)과 처리 조건의 상관 관계

Percoll 세척 조건에 따른 운동성 정자 회수율과의 상관 관계를 분석하기 위하여 다중 선형 회귀분석을 실시하였다(Table 2). 원심력과 원심분리 시간은 운동성 정자 회수율과 유의적으로 양의 상관 관계를 보였고($p < 0.05$), Percoll 양에 따른 운동성 정자 회수율은 음의 상관 관계를 나타냈다($p < 0.05$). 또한, 원심분리 시간이 Percoll의 양 및 원심력에 비해 정자회수율에 가장 큰 영향을 주었다($R^2 = 0.857$).

또한, Percoll 세척 조건과 정자 운동성(%)과의 상관 관계를 다중 선형 회귀분석을 실시하였다(Table 3). 원심력 및 원심분리 시간과 정자 운동성(%)은 양의 상관 관계를 보였으며($p < 0.05$), Percoll 양에 따른 정자의 운동성(%)은 음의 상관 관계를 나타냈다($p < 0.05$). 또한, 운동성 정자 회수율과 마찬가지로 원심분리 시간이 정자의 운동성(%)에

Table 2. Multiple linear regression analysis to assess the relationship of gravity, time, and volume of Percoll with motile sperm recovery rate

Model	Estimate (B)	S.E	Beta	t-value	p-value
Gravity	0.416	0.001	0.007	6.213	0.006
Volume	-0.538	0.427	-3.430	-8.041	0.000
Time	0.628	0.026	0.245	9.382	0.000

Table 3. Multiple linear regression analysis to assess the relationship of gravity, time, volume of Percoll with motility(%)

Model	Estimate (B)	S.E	Beta	t-value	p-value
Gravity	0.291	0.007	0.018	2.741	0.043
Volume	-0.477	2.692	-12.089	-4.490	0.002
Time	0.573	0.165	0.890	5.396	0.000

가장 큰 영향을 끼쳤다($R^2=0.64$).

고 찰

동결 용해된 정자는 동결보존액 및 죽은 정자 등 정자의 질에 악영향을 주는 많은 요소들에 노출되어 있다. 이러한 요인이 제거되지 않은 정자는 인공수정 시 생리적인 침체반응의 단계까지 가지 못하여 수정에 실패하게 된다(Watson, 2000). 따라서 동결보존액 및 죽은 정자의 제거는 정자처리 시 반드시 선행되어야 하는 단계이다. 이를 통해 운동성 정자의 회수율과 운동성(%)을 높여 수정율을 증진시킬 수 있다.

정자의 회수율 및 운동성을 높이기 위해 Percoll이 주로 사용되고 있다. Percoll은 colloidal silica 입자로 구성되어 있으며, 정자의 성숙과정과 관련된 정자두부의 밀도 등 정자의 특성에 따라 정자를 분리한다(Oshio, 1988). 운동성(%)이 높은 정자는 Percoll 세척 시 그렇지 않은 정자보다 더 빨리 가라앉게 되는데, 그 이유는 정자의 운동성은 원심분리의 원심력을 따라 가기 때문이다(Rhemrev 외, 1989). Percoll을 이용한 방법에는 continuous 방법과 discontinuous 방법이 있으며, 일반적으로 discontinuous 방법이 운동성 정자의 회수율에 있어 더 높은 성적을 보고하고 있다(Lizuka 등, 1988).

Valcarcel 등(1996)은 양의 정액에서 discontinuous Percoll 방법이 운동성을 가지며, 침체막이 손상되지 않은 정자를 회수하는 데 적합하다고 보고하였다. 반면에 동결 용해된 소의 정액에서는 용해 시 운동성이 낮거나(27~30%), 침체막이 온전한 정자의 비율이 낮은 정액에서만 Percoll의 유용성이 입증되었다(Rodríguez-Martínez 등, 1997). 반면에 Somfai 등(2002)은 용해 후 운동성 40% 이상인 정액에서도 처리 후 운동성 정자의 회수율 및 운동성(%)이 높았다고 보고하였다. 이러한 차이가 나타난 이유는 명확하지 않지만 Rodríguez-Martínez는 40%와 80% discontinuous Percoll을 400×g에서 세척하였고, Somfai는 45%와 90% discontinuous Percoll을 이용하여 300×g에서 세척하였다는 차이점이 있다. 이후에도 Percoll gradient는 최상의 정자를 회수할 수 있는 방법이라고 많은 연구진들에 의해서 보고되어 왔다(Somfai 등, 2002). 그럼에도 불구하고 다른 세척법과 마찬가지로 Percoll 세척 시 사용하는 원심분리는 정자에 손상을 줄 수 있는 한 과정이며(Aitken과 Clarkson, 1988), Percoll을 통과할 때 정자가 화학물질에 직접 노출되기도 한다. 그렇기 때문에 원심분리의 속도와 Percoll의 양이 정자에 미치는 영향은

최소화되어야 한다. 본 연구에서는 다양한 Percoll 세척법에 따라 정자의 운동성(%)과 운동성 정자의 회수율을 비교하여 가장 효율적인 방법을 알아보려고 하였다. 또한, Percoll 세척 방법 중 운동성 정자 회수율 및 운동성(%)에 영향을 주는 요인을 알아보았다. 각 세척법에 따라 정자 운동성(%)을 제외한 운동역학 변수에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 운동성 정자 회수율과 운동성(%)에서는 유의적인 상관 관계가 나타났다. 운동성 정자 회수율이 높은 처리구일수록 높은 운동성(%)을 나타냈고, Percoll을 이용한 원심분리 시간이 길어질수록 운동성 정자 회수율과 운동성(%)이 높게 나타났다. 또한, Percoll의 양의 차이에서는 모든 실험구에서 1 ml Percoll로 세척한 정자의 회수율과 운동성(%)이 2 ml Percoll보다 모두 높게 나타났는데, 정자가 Percoll을 통과하는 동안 직접적으로 접촉하면서 손상을 받기 때문인 것으로 생각된다. 원심분리의 속도에 따른 운동성 정자 회수율과 운동성(%) 비교 시 700×g에서 처리한 정자들이 300×g에서 세척한 정자들보다 높은 운동성 정자 회수율과 운동성(%)을 나타냈는데, 이는 높은 원심력에서 운동성 정자가 Percoll을 더욱 용이하게 통과한다고 생각할 수 있다. Percoll 세척 시 원심력, 처리 시간 및 Percoll의 양에 따른 운동성(%) 및 운동성 정자 회수율 비교에서 원심분리 시간이 가장 큰 변수로 작용하는 것으로 나타났다.

따라서 Percoll을 이용하여 동결보존된 소 정액의 운동성 정자 회수 및 운동성(%)을 높이려고 할 때 Percoll 양, 원심분리 시간 및 원심력을 조절하여 최상의 정자를 회수하는 것이 바람직하다.

인용문헌

1. Aitken RJ, Clarkson JS (1988): Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 9:367-376.
2. Anzar M, Graham EF, Iqbal N (1997): Post-thaw plasma membrane integrity of bull spermatozoa separated with a Sephadex ion-exchange column. *Theorigenology* 47:845-856.
3. Henkel RR, Schill WB (2003): Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 1:108.
4. Holt C, Holt WV, Moore HD, Reed HC, Curnock RM (1997): Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J*

- Androl 18:312-323.
5. Kim YJ, Ji DB, Oh HG (2000): Studies on HOS test and CTC test for viability and capacitation of frozen-thawed canine sperm. Korean J Vet Clin Med 17:431-437.
 6. Oh SA, You YA, Park YJ, Pang MG (2010): The sperm penetration assay predicts the litter size in pigs. Int J Androl 33: 604-612.
 7. Oshio S (1988): Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. Gamete Res 20:159-164.
 8. Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL (1995): Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. Theriogenology 44:859-869.
 9. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL (1986): Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology 25:591-600.
 10. Reddy JM, Stark RA, Zaneveld LJD (1979): A higher molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. J Reprod Fertil 57:437-446.
 11. Rhemrev J, Jeyendran RS, Vermeiden JP, Zaneveld LJ (1989): Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. Fertil Steril 51:685-690.
 12. Rodriguez-Martinez H (2009): *In vitro* fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation. Reprod Domest Anim 44:390-404.
 13. Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Pertoft H (1997): Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. Reprod Fertil 9:297-308.
 14. Sharara FI, Illions EH, Coddington CC 3rd, Scott RT Jr (1995): Evaluation of the Tru-Trax cervical mucus penetration test in predicting fertilization and pregnancy rates in *in-vitro* fertilization. Hum Reprod 10: 1481-1505.
 15. Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp AB, Ivancsics J, Baranyai B, Gocza E, Kovacs A (2002): Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. Reprod Dom Anim 37:285-290.
 16. Thundathil J, Gil J, Januskauskas A, Larsson B, Soderquist L, Mapletoft R, Rodriguez-Martinez H (1999): Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. Int J Androl 22:366-373.
 17. Valcarcel A, de las Heras M, Moses DF, Perez LJ, Baldassarre H (1996): Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. Anim Rep Sci 41:215-224.
 18. Watson PF (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Report Sci 60-61: 481-492.
 19. 방명걸, 정구민, 신창재, 김정구, 문신용, 장윤석, 이진용 (1993): 인간정자에 있어서 정자처리법의 비교. 대한불임학회지 20:107-115.
(접수일자: 2011. 2. 25 / 채택일자: 2011. 3. 3)