

Percoll 분리된 미니돼지 정액의 체외 수정 능력에 있어서 동결보존액의 영향

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

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의학부대학, ³가천의과대학교 생명과학부

Effects of Cryo-extenders for Spermatozoa Sorted by Percoll on *In Vitro* Fertility of in Miniature Pigs

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 Science 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 on sperm cryosurvival and ability of *in vitro* fertilization using Triladyl and Lactose Egg-Yolk(LEY) as extenders for cryopreservation of separated sperm by 65% percoll in miniature pig. Sperm viability was measured with SYBR-14/PI double stained sperm by flow cytometry. Ability on embryo cleavage rate and blastocyst development were observed by *in vitro* fertilization after frozen-thawing of sperm separated by 65% percoll. The experimental groups were designed that separated sperm by 65% percoll with Triladyl (ST) or LEY(SL) and unseparated sperm with Triladyl(UT) or LEY(UL) for cryopreservation. As a result, the viability was significantly ($p < 0.05$) higher in ST(55.1%), SL(63.1%), UL(58.8%) than UT(38.2%) group. Sperm viability in SL(63.1%) group was significantly ($p < 0.05$) higher than other experimental groups. On the other hand, embryo cleavage rate was significantly ($p < 0.05$) higher in ST(79.1%), SL(83.2%) than UT(74.1%) and UL(75.7%) groups at 96h after *in vitro* fertilization. Blastocyst development was also significantly ($p < 0.05$) higher in ST(21.5%), SL(20.9%) than UT(17.0%) and UL(18.8%) groups. In conclusion, cryopreservation of miniature boar sperm separated by 65% percoll were beneficial to viability and capacity on *in vitro* fertilization.

(Key words : Miniature pig's sperm, Cryopreservation, Extenders, Percoll, *In vitro* fertilization)

서 론

돼지에서 동결정액으로 인공수정을 한 경우에는 신선 정액을 이용할 경우보다 얻어진 산자의 크기와 수가 적다는 보고가 있다(Johnson 등, 2000). 특히 소나 말에 비해 돼지 정액은 내동성이 예민하며 정자막의 불포화지방산 비율이 높아 냉각 과정동안 지질 산화 과정(Lipid Peroxidation)이 더 많이 일어난다는 보고가 있다(Cerolini 등, 2001). 정자를 동결하는데 있어 동결보존액 종류에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 그 중 제조가 간편하고 동결-용해 후 높은 생존율을 보이는 Lactose Egg-Yolk(LEY) 동결보존액이 현재 널리 쓰이고 있다(Shim 등, 2005). 또한, 동결의 효율을 높이기 위해 냉각속도(Shim 등, 2005), 동결용기의 변화(Dai 등, 2009) 등에 대

한 많은 연구가 이루어졌으나, 그 효과가 만족스럽지 못한 실정이다.

체외수정은 체외에서의 수정란 생산과 수정란 이식 후 산자의 생산을 목표로 하고 있으며, 또한 우수한 형질을 가진 개체의 보존, 외래유전자 도입 및 형질전환 동물의 생산 등에 이용되고 있다. 돼지 체외수정은 다른 포유동물의 경우보다 난자의 체외성숙배양 및 체외수정에 관한 연구가 다소 늦게 시작되었다. 돼지는 타 동물에 비해 체외에서 난자의 성숙 시간이 길며, 이로 인한 불완전한 성숙이 유기된 체외성숙 난자를 수정하였을 때 다정자 수정(polyspermy)이 높은 비율로 나타나고 있다(Yoshida 등, 1989). 이러한 이유로 돼지에서 일반적인 체외수정기법을 이용한 양질의 수정란 생산에는 많은 한계점이 있다. 즉, 생존율과 침체능력이 떨어지는 동결정액은 신선정액에 비하여 낮은 수정율과 배반포 형성율을 나타낸다. 일

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

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

반적으로 낮은 비율의 응성전핵 형성(Nagai, 1996) 및 다정자침입의 문제(Funahashi 등, 1997) 등이 제외수정에 있어 정자의 문제점으로 간주되고 있으며, 이에 따라 제외수정에 있어 정자의 질에 대한 연구가 이루어지고 있다(Rath 등, 1997).

가축의 수정율에 있어 정자의 수보다는 질이 더 중요하게 간주되고 있으며, 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 percoll에 원심분리하여 활동성 정자와 X 정자를 94% 이상 회수하였다는 보고(Iizuka 등, 1987)와 분리된 정자를 제외수정하였을 경우 성숙율이 높았다는 보고가 있다(Grant 등, 1994). 돼지 정액을 percoll로 분리하면 정액내에 존재하는 정액성분, 사멸정자, 체세포, 세포단면 및 백혈구 등의 이물질이 제거되고 정자의 운동성이 증가하며, 제외수정시 수정율이 증가한다는 보고가 있다(Shim 등, 2005). 제외수정에 있어 percoll을 이용한 정액의 분리는 사멸정자의 제거와 정상 형태의 운동성 정자 획득 그리고 세포 파편 및 세균 분리(Sakkas 등, 2000)에 이용할 수 있다. 또한, Park 등(2008)은 percoll이 돼지 정액내의 세균 분리에 효과적이라고 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 액상보존에 한계가 있는 percoll 분리된 정자를 장기간 보존하는 방법이 필요하다고 생각된다.

따라서 본 연구는 선행연구를 바탕으로 65% percoll을 통해 세균이 제거되고 높은 운동성을 갖는 미니돼지 정자를 조성하여 서로 다른 동결보존액 Triladyl과 LEY를 사용하여 동결하여 융해 후 정자 생존율을 비교 분석하였고, 이를 제외수정에 이용하여 수정율, 분화율 및 배반포로의 발달율을 확인하여 percoll 분리된 정자의 동결-보존체계를 확립하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

정액의 준비

본 연구에 이용된 돼지는 강원대학교 목장에서 사육되고 있는 PWG miniature pig를 이용하였다. 의빈대를 이용한 음경 수압법으로 정액을 채취하여 가온된 병에 1차적으로 거즈를 통해 정액을 거른 후, 정액을 37°C로 가온된 병에 옮겨 2시간 이내로 실험실로 운반하여 사용하였다. 실험에 사용된 정액은 70% 이상의 정상 움직임과 80% 이상의 생존율을 나타내는 정액을 사용하였다.

Percoll을 이용한 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. 미니돼지 정액은 percoll 위에 분주하여 원심분리(2,000 rpm, 20 min, 20°C)하여 최하단의 정자만을 이용하였고, 분리된 정액은 동결보존액(LEY와 Triladyl)으로 2회 세척한 후 정자 동결에 이용하였다.

정액 동결 과정

분리된 미니돼지 정자를 서로 다른 두 개의 동결보존액을 이용하여 동결에 이용되었다. 일반적으로 돼지 정액 동결에 이용되는 동결보존액 LEY와 소 정액 동결에 이용되는 Triladyl(KRUUSE, Cat. no. 340244)의 2가지 동결보존액을 이용하였다. 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 상층액만을 사용하였다. 동결시 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.

Modena B로 1차 희석된 정액을 원심분리(1,500 rpm, 10 min, 20°C)하여 상층액을 제거한 후 동결보존하였다. Percoll로 분리된 정액과 그렇지 않은 정액의 농도를 1×10^9 개/ml가 되도록 1차 동결보존액 LEY와 Triladyl을 첨가한 후 2시간 동안 5°C로 냉각하였다. 그 후 2차 동결보존액을 1차 동결보존액의 1/2을 첨가하여 0.5 ml straw를 제작하였고, 6 cm 정도의 액체 질소가 담겨져 있는 용기 표면위로부터 10 cm 위에서 10분간 정지 후 액체 질소에 침지하여 동결 보존하였다.

동결 정액 융해 및 생존율 평가

융해에 사용된 동결정액은 최소 7일 이상 보관된 것을 이용하였다. 동결된 straw는 37°C에서 45초 동안 융해하였다. 37°C로 가온된 Beltsville thawing solution(BTS)로 희석한 후 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 상층액을 제거하고 실험에 사용하였다.

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 분석하였다. 살아 있는 세포에서는 SYBR-14가 세포막을 투과하게 되어 핵이 녹색으로 형광 염색되고, 막 손상을 입은 세포나 막 투과성이 없는 세포는 PI가 핵에 염색되어 붉은색을 띠게 되는 방법을 사용하였다. 두 가지 색으로 염색된 정자는 유속세포 분석기인 Flow cytometry를 이용하여 형광의 발현차를 분석하여 생존율을 평가하였다.

난자의 수집 및 체외성숙

실험에 사용한 난자는 도축장에서 도살된 암돼지로부터 난소를 채취한 후 직경 2~6 mm의 난포에서 18G의 주사침을 이용하여 난포액을 모아 침전 후 상층액을 걸러낸 뒤에 실험현미경 하에서 난세포와 난구세포가 균일

한 난자를 선별하여 실험에 이용하였다. 난자의 체외성숙은 기본 배양액 TCM199에 pFF (10%), LH (5 µg/ml), FSH (0.5 µg/ml), hCG (10 IU/ml), EGF (0.01 µg/ml)를 첨가한 IVM-1 용액에서 5% CO₂, 38.5°C에서 21시간 성숙 배양 후 TCM199에 pFF (10%)와 EGF (0.01 µg/ml)만을 첨가한 IVM-2 용액에서 5% CO₂, 38.5°C에서 21시간 동안 성숙배양시켰다.

체외수정 및 체외배양

체외수정에 이용된 기본배양액은 mTBM (NaCl 113.1 mM, KCl 3 mM, CaCl₂·2H₂O 7.5 mM, Glucose 11 mM, Pyruvic acid 5 mM, L-cysteine 0.57 mM, Tris 20 mM, Penicillin G 20 mM, Streptomycin sulfate 3.4 mM)을 사용하였다. 성숙된 난자는 0.1% hyaluronidase 용액을 이용하여 난구세포를 제거한 후 mTBM에 0.02% BSA (Sigma A-6003)가 첨가된 배양액 drop으로 옮겼다. 그 후 동결정액을 37°C에서 45초 동안 용해한 후 BTS로 희석한 후 원심분리(1,500 rpm, 5 min)하여 상층액을 제거한 후 실험에 사용하였다. 정자의 침체반응을 유도하기 위해 mTBM에 0.04% BSA (Sigma A-4503)와 caffeine이 첨가된 배양액에 정자의 최종 농도를 2×10⁶/ml로 희석하여 난자가 들어있는 drop에 체외수정을 한 후 5% CO₂, 38.5°C에서 배양하였다. 배양 6시간 후 수정된 난자 주위에 붙어있는 난구세포와 정자를 제거한 후 PZM-3 (NaCl 108 mM, KCl 10.00 mM, KH₂PO₄ 0.35 mM, MgSO₄·7H₂O 0.40 mM, NaHCO₃ 25.07 mM, Glutamine 1 mM, Ca-(lactate)₂·5H₂O 2 mM, Hypotaurine 5 mM, Gentamicin sulfate 0.05 mg/ml, Basal Medium Eagle Amino Acid (BME), MEM)에 0.03% BSA를 첨가한 체외배양액에서 5% CO₂, 38.5°C에서 배양하며 관찰하였다.

실험설계

실험 1

Percoll 분리 후 동결보존액 LEY와 Triladyl를 이용한 동결-용해 후의 미니돼지 정자의 생존율 비교 평가 : 65% percoll로 분리된 미니돼지 정액과 분리하지 않은 정액을 LEY와 Triladyl 두 종류의 동결보존액을 이용하여 동결-용해한 후 SYBR-14와 PI 형광염색약을 이용한 double stain 방법을 이용하여 Flow cytometry로 형광의 발현차를 분석하였다.

실험 2

Percoll 분리된 미니돼지 정자를 동결보존액 LEY와 Triladyl를 이용하여 동결-용해된 정자의 체외수정율, 분할율 및 배반포 발달을 비교 평가 : 실험 1에서 동결보존된 4 종류의 동결 정액을 용해한 후 체외수정에 이용하였다. 체외수정율과 분할율 및 배반포 발달율은 수정 후 48, 96 및 144시간에 관찰하여 기록하였다.

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.

Table 1. Effect of freezing extenders on viability of frozen-thawed sperm separated by percoll in miniature pig

Treatment		Percent of viability (%)
Percoll	Extender	
+	Triladyl	55.1±1.8 ^b
-	Triladyl	38.2±3.4 ^c
+	LEY	63.1±6.1 ^a
-	LEY	58.8±3.3 ^{ab}

Means±SEM are presented. ^{a-c} Different superscripts differ significantly of each other treatment group(p<0.05).

결 과

Percoll 분리 후 동결보존액 LEY와 Triladyl를 이용한 동결-용해 후의 미니돼지 정자의 생존율 비교 평가

Flow cytometry를 통한 SYBR-14/PI로 double stain된 정자를 처리구당 30,000개를 분석하였다. Percoll로 분리한 정액과 그렇지 않은 정액을 서로 다른 동결보존액으로 동결-용해하여 생존율을 나타낸 것을 Table 1에 나타냈다. 연구의 결과 동결정자의 생존율은 percoll 분리된 정자와 분리하지 않은 정자를 비교하였을 때 높게 나타났고, percoll 분리된 정자에서는 LEY(63.1±6.1%)와 Triladyl(55.1±1.8%)의 동결보존액을 사용하여 동결하였을 때 LEY에서 유의적(p<0.05)으로 높은 결과를 나타냈다.

체외수정 시 Percoll 분리된 LEY와 Triladyl를 이용한 동결정액이 수정율, 분할율 및 배반포 발달율에 미치는 영향

65% percoll로 분리된 미니돼지 정액을 두 종류의 동결보존액 LEY와 Triladyl을 이용하여 동결 보존한 정액의 수정율, 분할율 및 배반포 발달율을 수정 후 48, 96 및 144시간 후에 변화를 관찰하였다. 수정 후 48시간 후의 수정율을 Table 2에 나타냈다. 체외수정 후 48시간 후에는 percoll로 분리된 정자와 분리되지 않은 정자를 동결보존액 Triladyl과 LEY를 사용하여 동결보존한 처리구에서 수정율은 유의적(p<0.05)인 차이가 나타나지 않았다.

체외수정 96시간 후 수정란의 수정율 및 배반포 발달율을 Table 3에 나타냈다. Percoll로 분리하여 동결한 모든 처리구에서의 분할율이 분리하지 않고 동결한 처리구보다 유의적(p<0.05)으로 높게 나타났다. 특히, 분할율에 있어 percoll을 이용하여 분리한 처리구에서 LEY 동결보존액을 사용하여 동결한 정액의 분할율(83.2±1.9%)이 Triladyl 동결보존액을 사용하여 동결한 정액의 분할율(79.1±1.6%)보다 유의적(p<0.05)로 높은 결과를 나타냈다. 동결정액을 이용한 체외수정 144시간 이후의 수정란의 배반포 발달율을 Table 4에 나타냈다. Percoll로 분리된 동결정액의 배반포 발달율이 분리하지 않은 처리구보다 유의적(p<0.05)으로 높게 나타났다. 또한, percoll 분리 후 동결한 정액을 사용한 수정란의 경우 배반포 발달율은 LEY 동결 보존액(20.9±1.3%)보다 Triladyl 동결보존액(21.5±1.4%)을 사용하였을 때 유의적(p<0.05)으로 높았다.

Table 2. Comparison of different cryoextender (Triladyl and LEY) for miniature sperm separated by percoll on cleavage rate of porcine oocytes after 48h of *in vitro* fertilization

Treatment	No. of oocytes in IVF	Cleavage (%)	No. of embryo development to (%)				Deg. (%)
			2 Cell	4 Cell	8 Cell	>8 cells	
ST	238	174 (72.7±5.5) ^a	15 (8.2±3.1) ^a	12 (4.9±0.7) ^a	22 (10.4±1.7) ^a	125 (49.1±5.1) ^a	64 (27.3±5.5) ^a
UT	231	153 (65.1±2.2) ^a	18 (7.5±2.1) ^a	19 (7.5±1.5) ^a	18 (8.7±2.1) ^a	98 (41.4±2.2) ^a	78 (34.9±2.2) ^a
SL	252	186 (72.2±2.9) ^a	14 (6.5±1.9) ^a	25 (10.9±4.0) ^a	16 (8.2±3.6) ^a	131 (47.1±9.6) ^a	66 (27.3±2.9) ^a
UL	269	166 (62.3±1.6) ^a	16 (7.6±4.8) ^a	14 (6.0±2.2) ^a	14 (5.5±0.9) ^a	122 (43.2±6.1) ^a	103 (37.7±1.6) ^a

Means±SEM are presented. ^a Values with different superscripts in the same column were not significantly different ($p < 0.05$). Deg : Degeneration, UT : Unseparated with Triladyl, ST : Separated with Triladyl, UL : Unseparated with LEY, SL : Separated with LEY.

Table 3. Effects of cryoextenders for miniature pig's sperm separated by percoll on cleavage rate of porcine oocytes at 48h after *in vitro* fertilization

Treatment	No. of oocytes in IVF	Cleavage (%)	No. of embryo development to (%)					Deg. (%)
			2 Cell	4 Cell	8 Cell	>8 Cells	Bla.	
ST	238	190 (79.1±1.6) ^{ab}	5 (4.0±2.6) ^a	11 (4.6±0.1) ^a	16 (6.1±1.0) ^a	145 (64.3±3.4) ^a	13 (5.1±2.9) ^a	48 (20.9±1.6) ^{ab}
UT	231	173 (74.1±1.8) ^b	7 (3.7±1.8) ^a	5 (2.3±0.7) ^a	13 (5.5±0.2) ^a	141 (62.5±4.3) ^a	7 (3.5±2.4) ^a	58 (25.9±1.8) ^b
SL	252	209 (83.2±1.9) ^a	8 (3.0±0.3) ^a	12 (5.4±1.2) ^a	11 (6.6±4.6) ^a	176 (68.7±4.6) ^a	2 (0.8±0.4) ^a	43 (16.8±1.9) ^a
UL	269	202 (75.7±2.3) ^b	9 (4.1±2.2) ^a	14 (5.7±1.5) ^a	23 (10.6±5.9) ^a	148 (55.2±8.1) ^a	8 (3.4±2.2) ^a	67 (24.3±2.3) ^a

Means±SEM are presented. ^{ab} Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p < 0.05$). Bla : Blastocyst, Deg : Degeneration, UT : Unseparated with Triladyl, ST : Separated with Triladyl, UL : Unseparated with LEY, SL : Separated with LEY.

Table 4. Effects of cryoextenders for sperm separated by percoll on *in vitro* development of porcine embryo at 144~192 h after *in vitro* fertilization

Treatment	No. of oocytes in IVF	Cleavage (%)	No. of embryo development to (%)					Deg. (%)
			2 Cell	4 Cell	8 Cell	>8 Cells	Bla.	
ST	238	187 (78.2±0.7) ^{ab}	4 (2.5±1.1) ^a	8 (2.5±1.2) ^a	12 (5.0±1.0) ^a	124 (68.3±1.9) ^a	39 (21.5±1.4) ^a	51 (21.8±0.7) ^{ab}
UT	231	171 (75.1±2.0) ^{ab}	4 (2.0±1.1) ^a	5 (2.3±0.8) ^a	11 (4.9±0.6) ^a	120 (62.4±5.7) ^a	31 (17.0±1.4) ^b	56 (24.9±2.0) ^{ab}
SL	252	201 (80.8±1.9) ^a	7 (2.7±0.1) ^a	9 (3.9±0.7) ^a	8 (4.6±3.0) ^a	135 (69.5±1.7) ^a	42 (20.9±1.3) ^{ab}	51 (19.1±1.9) ^b
UL	269	193 (71.4±3.9) ^b	8 (3.6±1.7) ^a	12 (5.1±1.8) ^a	13 (5.9±3.4) ^a	124 (57.5±6.4) ^a	36 (18.8±0.5) ^{ab}	78 (28.5±3.9) ^a

Means±SEM are presented. ^{ab} Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p < 0.05$). Bla : Blastocyst, Deg : Degeneration, UT : Unseparated with Triladyl, ST : Separated with Triladyl, UL : Unseparated with LEY, SL : Separated with LEY.

고 찰

돼지 정액은 다른 가축에 비해 농도가 낮고 1회 사출되는 정액량이 많으며, 내동성과 온도 저하에 대한 내성이 약하다(Maxwell과 Johnson, 1997). 저온충격과 정자의 생존율의 관계는 동결 과정 중 세포 내외의 삼투압 차이로 인한 전해질 대사의 변화, 정자 세포 내의 원형질 및 핵막의 손상, 정자 막의 손상으로 인한 침체반응 유발, 핵내의 DNA 손상이 이루어지게 된다(Salisbury 등, 1978). 정액동결의 효율을 높이는 연구는 많이 이루어지고 있으나, 아직 동해 원인에 대한 정확한 기작에 대한 연구는 부족한 실정이며, 돼지의 경우 다른 포유동물에 비해 용해 후 정자의 생존율이 낮은 실정이다.

동결보존액은 일정한 온도에서 세포의 반영구적인 보존, 정액과 초기배 수정란의 장기 보존, 체세포 이식을 통한 수정란의 장기 보존 등에 이용되며, 생명공학 연구 분야에 많이 이용되어지고 있다. 돼지 정액 동결보존액의 종류에는 Glucose Egg-Yolk(Baier, 1962 ; Polge 등, 1970), Lactose Egg-Yolk(Westendorf 등, 1975), Beltsville F3 (BF3 ; Pursel과 Johnson, 1973) 등이 많이 쓰이며, 그 중 Lactose Egg-Yolk(LEY) 동결보존액은 돼지 정자를 동결하는데 있어 간편하고 효율이 높아 널리 이용되고 있다. 또한, Triladyl 동결보존액은 주로 소 정액 동결보존에 많이 쓰이며, 그 외에 개(Dobrinski 등, 1993), 말(Blotner 등, 2001), 양(Ollero 등, 1998) 등 정액 동결보존에 이용되었다는 보고가 있다.

정자의 분리 방법을 통한 고능력의 정자의 획득에 대한 연구는 이전부터 이루어져 왔다. 정자의 질을 높이고자 Swim-up(Morrell, 2006), gravity sedimentation(Tea 등, 1983), percoll gradients(Somjai 등, 2003), glass wool 접착 방법에 의한 분리(Mogas 등, 1998) 등을 이용하여 정자를 분리하였으며, 그 중 운동성이 높은 정자를 분리하는 방법 중 하나인 percoll gradient 방법은 돼지, 소 등 여러 가축에서 수정을 하는데 많이 이용되고 있다. Polyvinylpyrrolidone(PVP)으로 코팅된 silica particle는 Percoll이라는 이름으로 상업적으로 제조, 판매되었다. Percoll은 배양액에 첨가하여도 삼투압의 변화를 유발하지 않는 높은 밀도구배 물질이다.

정액내의 세균은 정자의 저장성과 질에 악영향을 미친다는 보고가 있다(Althouse와 Lu, 2005). 그러나 percoll을 이용한 density gradient 방법은 정액 내의 세균을 완전히 제거시킨 연구 결과가 있었으며(Park 등, 2008), 미니돼지 정액을 percoll로 분리 시 높은 운동성의 정자를 분리하였으며, 액상보존시 높은 생존율을 나타낸다는 보고가 있다(Yoo 등, 2009). 또한, 이전 연구에서는 percoll 분리된 미니돼지 정액을 동결보존시 낮은 기형율, 높은 원형질막 보존 및 낮은 침체반응율이 나타난다는 연구 결과가 있다(Lee 등, 2010).

돼지의 난자는 체외에서의 성숙, 수정, 배양에 있어 사람보다 분할율 및 발달율이 낮으며, 정자의 침체반응과 운동성은 체외수정에 있어 중요한 영향을 끼친다. 인간의 불임치료를 해결하고자 percoll로 분리된 정자를 체외수정에 이용하였을 때 높은 정자의 운동성과 체외 수정 능력이 증가한다는 보고가 있다(Nice 등, 1991). 가축에서는 동결-용해 후 percoll을 이용한 정액을 분리 후 체외수정

에 이용하는 방법이 많이 이용되어지고 있다. 그 중 돼지 정자를 percoll로 분리한 후 체외수정에 이용하였을 때 분할율이 증가하였으며(Grant 등, 1994), percoll로 분리된 미니돼지 정액을 체외수정에 이용 시 분할율이 증가한다는 보고가 있다(Yoo 등, 2009).

따라서 이전실험에서 수행되었던 65% percoll에 의해 분리된 미니돼지 정자가 동결-용해 후 생존율, 기형율, 원형질막 보존 및 침체반응에 좋은 효과를 나타내어, 본 연구에서는 이 동결정액을 이용하여 체외수정 능력을 검토하였다. 실험 1을 바탕으로 percoll 분리된 정자의 동결보존능력에 대해 알아보기 위하여 돼지에서 잘 사용되고 있지 않은 Triladyl 동결보존액과 보편적으로 쓰이는 LEY 동결보존액을 실험에 이용하였다. LEY 동결보존액이 돼지 정액의 동결보존에 있어 효율적(Shim 등, 2005)이라는 보고가 있었고, percoll 분리된 정자는 액상보존시 높은 생존율(Yoo 등, 2009)을 갖는다고 알려져 있기 때문에 percoll 분리된 정자의 동결보존에 있어 동결보존액과 생존율에 초점을 맞추어 실험을 실행하였다. 그 결과, 돼지 정액의 동결에 잘 이용되지 않는 Triladyl 동결보존액과 비교해 보았을 때 LEY 동결보존액이 높은 생존율을 보였으며, percoll 분리된 동결보존된 정자는 용해 후 높은 생존율을 나타내었다. 이러한 결과로부터 percoll 분리된 정자를 LEY 동결보존액에 동결보존시 높은 생존능력이 있다고 판단된다.

그러나 percoll 독성과 관련된 문제점들이 보고된 바가 있어 인공수정이나 체외수정을 위해서는 적합한 방법이 아니라고 밝히고 있는 연구 결과(Strehler 등, 1998)와 percoll로 분리한 돼지정자의 체외 수정 능력의 향상(Grant 등, 1994)에 대한 연구 결과를 바탕으로 이를 확인하고자 체외수정실험을 실시하였다. 실험 2의 결과, 65% percoll 분리 후 동결한 미니돼지 정액을 사용하여 체외수정을 하였을 때 수정 48시간 후 수정율은 유의적인 차이가 없었지만, 96시간 후에는 65% percoll로 분리된 동결정자를 사용하였을 때 분리하지 않은 동결정자에 비하여 유의적으로 높은 분할율을 보였으며, 특히 LEY 동결보존액을 사용하였을 때 Triladyl 동결보존액보다 더 높은 분할율을 나타내었다. 이는 정자가 percoll에 의한 분리 과정에서 percoll 내에 존재한다는 독소 물질로부터 해로운 영향을 받지 않는 점과 미니돼지 정액 동결에 있어 LEY가 Triladyl보다 동결보존에 높은 효율을 보인다고 판단되어진다. 또한, 수정 후 144시간 이후에는 배반포 발달율이 percoll로 분리 후 동결한 처리구에서 더 높은 결과가 나타났다. 이는 65% percoll로 분리된 미니돼지 정자가 액상 보존시 높은 생존능력과 침체반응율(Yoo 등, 2009)을 보이며, 동결-용해 후 낮은 기형율, 높은 정자강도 및 낮은 침체반응율(Lee 등, 2010)의 결과와 비교해 볼 때 이번 실험을 통하여 동결-용해 후에도 생존율, 수정율, 분할율 및 배반포 발달율에 있어서 좋은 영향을 미친다는 점에서 중요한 결과라고 판단할 수 있다.

본 연구의 결과로 보아 65% percoll에 의해 분리된 정자의 생존율과 체외수정 능력은 percoll로 분리 후 동결보존한 정액은 분리하지 않은 정액에 비하여 생존율이 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나타났다. 그리고 동결보존액은 Triladyl보다는 돼지 동결정액에 많이 이용되는 LEY를 사용하는 것이 좋은 효과를 얻는다는 것을 입증하였다. 또한, 체외수정에 있어 percoll로 분리된 후 동결보존된

정액이 그렇지 않은 정액에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 높은 분할율과 배반포 발달율을 나타냈다. 따라서 percoll에 의해 분리된 정액의 동결이 체외수정에 있어 좋은 영향을 미친다고 판단되어진다.

사 사

본 연구에 수행하는 있어서 정액의 채취와 분석에 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소와 공동실험실습관에 감사드립니다.

인용문헌

- Althouse GC, Lu KG (2005): Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63:573-584.
- 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* 14:624-8.
- Baier W (1962): Erfahrungen in der Kunstlichen Besamung des Hausschweines einschliesslich der Verwendung von Tiefkuhlsamen. *Zootec* 17:94-99.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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*. 12:1980-4.
- Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K (1993): Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil Suppl* 47:291-6.
- Funahashi H, Cantley TC, Day BN (1997): Advances *in vitro* production of pig embryos. *J Reprod Fertil* 52:271-283.
- 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.
- 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.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
- Lee SH, Yoo HJ, Lee YS, Cheong HT, Yang BK, Kim DY, Park CK (2010): The comparison of Triladyl and LEY for cryosurvival improvement of sperm separated by percoll in miniature pig. *Reprod Dev Biol* 34(1):41-46.
- Maxwell WMC, Johnson LA (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
- Mogas T, Rigay T, Piedrafita J, Bonet S, Rodriguez-Gil JE (1998): Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen. *Theriogenology* 40:1171-1189.
- Morrell JM (2006): Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Domest Anim* 41:63-67.
- Nagai T (1996): *In vitro* maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 42:153-163.
- Nice L, Ray B, Grant S, Williams J, Mcdermott A, Hull MGR (1991): Use of percoll in IVF: a comparison of sperm dysfunction and tubal patients. *J Reprod Fertil* 7:48.
- 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.
- 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.
- Polge C, Salamon S, Wilmut I (1970): Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Res* 87:424-428.
- Pursel VG, Johnson LA (1973): Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *US-DA ARS Bull* 44-227, 1-5.
- Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB (1972): Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before col shock. *J Anim Sci* 34:273-278.
- Rath D, Niemann H (1997): *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 47:785-93.
- 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.
- 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.
27. 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: 372-81.
 28. 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.
 29. Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp AB, Ivancsics J, Baranyai B, Gocza E, Kovacs A (2003): Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion sperm. *Reprod Dom Anim* 38: 134-140.
 30. Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collodel G, De Santo M, *et al.* (1998): Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa. *Hum Reprod* 13:120-3.
 31. Tea NT, Jondt M, Scholler R (1983): A migration gravity sedimentation method for collecting human motile spermatozoa. *Aylesbury*, pp. 117-120.
 32. Westendorf P, Richter L, Treu H (1975): Deep freezing of boar sperma. Laboratory and insemination results using the Hulsenberger paillete method. *Dtsch Tieraztl Wochenschr* 82(7):261-7.
 33. 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.
 34. Yoshida M, Kojima Y (1989): Male pronuclear formation by boar spermatozoon with hairpin curved tail in zoon-free hamster egg. *J Vet Sci* 51(2):428-430.
- (접수일자: 2011. 2. 25 / 채택일자: 2011. 3. 3)