

## 돼지정자의 동결응해 후 활력 및 생존성에 대한 보존액, 동해보호제, 예비동결 및 동결처리시간의 영향

이 장 희 · 김 인 철  
농촌진흥청 축산기술연구소

### Effect of Cryodiluents, Cryoprotectants, Pre-freezing Method and Total Time Required for Freezing on Post-thaw Viability of Boar Spermatozoa

Lee, J. H. and I. C. Kim

Department of Livestock Improvement, NLRI

#### SUMMARY

Boar semen can be frozen successfully. However, there is a large variability in the extent of damage boar semen samples experiences during cryopreservation. This experiment was undertaken to find out factors that affect a post-thaw viability of boar spermatozoa. For this purpose, cryodiluents(BF5, LEY, Soejima and M-Soejima), cryoprotectants(glycerol, ethylene glycol, and propylene glycol), pre-freezing method(dryice-pellet, dryice-straw and LN<sub>2</sub> vapour-straw) and total time required for freezing(2, 5, and 7 h) were compared as a factors. To investigate quality of semen during freezing process, motility(%), normal apical ridges(% NAR), and proportion of living sperm(%) by flow cytometric analysis were assessed after collection, cooled, pre-frozen and post-thawing.

Post-thaw motility of semen diluted with M-Soejima was 52.0%, respectively. When heparin, caffeine or heparin+caffeine was added to 2nd cryodiluent of M-Soejima during freezing process, the highest motility after thawing was shown at the addition of caffeine(2mM), with 61.7±2.9% of motility. M-Soejima with heparin or caffeine was significantly higher than that of control( $p < 0.05$ ). The result using glycerol(Gly), ethylene glycol(EG), propylene glycol(PG), and their mixture(Gly+EG and Gly+PG) as cryoprotectants, the highest motility was shown at the mixture treatment with Gly plus PG. However, the highest proportion of live spermatozoa was shown at Gly+EG, there was no significantly difference among treatments( $p > 0.05$ ). When semen was pre-frozen with three manners(dryice-pellet, dryice-straw, and LN<sub>2</sub> vapor-straw), motility(%) of post-thaw spermatozoa was the highest in the LN<sub>2</sub> vapor-straw pre-freezing method of M-Soejima cryodiluent with 57.5% of motility. For a simple, economical and timesaving approach to freezing boar semen, total time required for freezing were 2, 5, and 7 hours, post-thaw motility were 43.8, 45.0 and 38.8%, NAR were 19.5, 22.7 and 28.5%, and viability were 20.8, 19.9 and 22.1%, respectively.

This data suggests that boar semen diluted with M-Soejima cryodiluent contained caffeine, using mixture of glycerol and propylene glycol or ethylene glycol as cryoprotectants, frozen with 2 hours, can be taken better motility, NAR, and proportion of live spermatozoa.

(Key words : Boar, Cryodiluents, Cryoprotecyants, Pre-freezing, Motility, NAR, Viability)

## I. 서 론

동결정액의 질을 개선하는 것은 성공적인 인공수정이나 체외수정을 성취하는데 필수적이다. 정액의 질이 활력이나 생존성에 영향을 미치는 요인은 다양하다. 일반적으로 정자세포는 물리적 환경보다는 이화학적 환경에 매우 민감하기 때문에 정자의 동결용해 후 생존성을 높이기 위하여 이화학적 환경의 개선에 많은 연구가 이루어져 왔다(Mazur, 1977; Niwa와 Ohgoda, 1988; Woelders와 Den Besten, 1993; Pizzi 등, 1997). 정자의 동결용해 후 생존성 또는 활력에 영향을 미치는 요인으로는 보존액, 동해보호제, 냉각 또는 동결방법 등이 있으나 아직까지도 돼지정액의 경우에는 다른 가축에 비해 동결보존성이 다소 낮은 수준이며 동결정액을 이용한 인공수정 후 번식성적은 액상정액에 비해 10% 정도 낮게 보고되고 있다(Johnson, 1985). 이러한 돼지정액의 동결용해 후 생존성을 높이기 위해서는 동결보존액의 종류 및 조성, 냉각, 예비동결 및 포장 등의 방법이 함께 개선되어야 한다. 동결보존액에 첨가되어지는 동해보호제의 종류에 대해서는 분자량이 적어서 세포내로 침투되는 투과성 동해보호제와 세포내로 침투되지 않는 비투과성 동해보호제로 구분되어지며, 투과성 또는 비투과성 동해보호제의 첨가 방법 및 첨가수준은 연구자들마다 다소 차이가 있으나, 일반적으로 glycerol이 가장 널리 이용되고 있는 동해보호제이다(Scheid 등, 1980; Gilmore 등, 1996). 그러나 Dalimata와 Graham(1997)은 동해보호제로 glycerol은 다소 독성이 있는 것으로 보고하였으며, Fiser와 Fairfull(1990)은 glycerol의 첨가수준이 0~4%일 때 동결용해 후 활력이 개선되었으나, 6% 이상의 수준에서는 활력이 감소되었다고 보고한 바 있다. 동결방법 또는 동결속도는 정액의 생존성에 영향을 크게 미치기 때문에 돼지 정액의 동결방법은 다양한 형태로 연구되어져 왔으나 크게 두가지로 구분되고 있다(Kovachev 등, 1994; Eriksson과 Rodrig-

uez-Martinez, 1996). Pellet(정제화) 동결방법은 Pursel과 Johnson(1975) 및 Hashizume 등(1990)에 의하여 연구되어져 왔으며, straw 동결방법은 Westendorf 등(1975), Almlid 등(1987) 및 이 등(1994)에 의해 연구되어져 왔다. 그러나 straw 동결방법도 동결용해 후 정자 활력이 39~56%로 다른 가축보다는 낮은 수준으로 아직도 개선되어야 할 부분이 많이 남아 있다(Mello 등, 1999). 또한 동결과정 중 정액의 냉각 및 동결방법은 처리시간에 영향을 미치기 때문에 이에 관한 연구는 많은 동물들에서 보고되어져 왔다(Woelders 등, 1996; Mohammad 등, 1997). 특히 돼지정자의 냉각속도에 관한 연구로 Fiser와 Fairfull(1990)은 돼지정자의 냉각속도가 5~100°C/min 일 때 NAR율이 감소하고 1°C/min에서는 증가하여 빠르게 냉각시키는 것이 유리하다고 보고한 바 있다. 한편 돼지정액의 질을 평가하는데 있어서 가장 보편적인 방법으로 활력이나 형태학적 평가에 의한 NAR(normal apical ridge)율이 일반적인 정액질의 평가수단으로 이용되어져 왔으나(Pursel 등, 1972; Hashizume 등, 1990), 최근 flow cytometry에 의한 생존을 평가가 객관적인 수단으로 이용되어지고 있다(Althouse와 Hopkins, 1995; Garner 등, 1995; Maxwell와 Johnson, 1997b; Lee 등, 1999).

그러므로 본 연구에서는 돼지 정자의 동결용해 후 생존성을 개선하기 위하여 동결보존액, 동해보호제, 예비동결방법 및 동결처리소요시간이 활력, NAR 및 생존율에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 정액채취

USDA-ARS 종돈사육장에서 사육중인 체중 120Kg이상인 8두의 종모돈으로부터 주당 2회씩 수압법으로 정액을 채취하였다. 채취된 정액은 보온병에 보관하여 30분 이내에 실험실로 운반하였다.

## 2. 정액의 동결 및 융해

운반된 정액은 즉시 같은 온도의 BTS(Alexopoulos 등, 1996; Johnson 등, 1988)로 1차 희석 후(1:1) 정액의 일반성상을 조사하고 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 1차 동결보존액으로 재부유하여 정자농도가 0.5ml straw당  $5 \times 10^7$  sperm이 되도록 조정하였다. 처리별 사용된 동결보존액의 조성은 Table 1과 같으며, M-Soejima보존액의 경우에는 2차 동결보존액에 caffeine, heparin 또는 이들의 1/2씩을 혼합하여 첨가하였다. 동결방법으로 펠렛 동결은 Pursel과 Johnson(1975)의 방법에 준하였으며, straw 동결은 Soejima 등(1983) 및 이 등(1994)의 방법에 준하였다.

Straw 동결시 동결시간을 단축하기 위하여 Fig. 1과 같이 채취에서부터 동결완료까지 소요되는 시간을 각각 2, 5 및 7시간으로 하여 1, 2차 희석을 조정하여 실시하였다. 즉, 2시간이 소요되는 Group III의 경우 채취 직후 30분 이내에 BTS와 1:1로 희석하고 원심분리하여 상층액을 제거하고 1차 보존액으로 적정농도

로 재부유하였으며, 1시간 20분간 냉각되어지는 동안 같은 온도의 2차보존액을 15분 간격으로 동량 희석하였다. 최종 희석된 정액은 별도의 평형시간 없이 straw내 포장하였다. 포장된 정액은 액체질소 표면 5cm 위 종이 rack에 정치시킨 후 10분간 예비동결하여 액체질소 내 침적시켜 동결시켰다. 동결된 정액의 융해는 straw의 경우에는 38℃ 항온수조에서 20초간 융해시켰고, pellet의 경우에는 Pursel과 Johnson(1975)의 방법에 따라 실시하였다.

## 3. 정액검사

정자의 활력은 직진운동하는 정자의 비율을 100분율로 판정하였으며, 침체의 형태 판정은 Pursel 등(1972) 및 Zheng 등(1992)의 방법에 따라 Normal Apical Ridge(NAR), Darnaged Apical Ridge(DAR), Missing Apical Ridge(MAR) 및 Loose Acrosomal Cap(LAC)로 구분하여 판정 및 조사하였다. 정자의 생존율은 Lee 등(1999)과 Johnson 등(1994)의 방법에 따라 SYBR-14/PI(propidium iodide) 염색액으로 2중 형광염색하여 EPICS III Coul-

**Table 1. Chemical composition of cryodiluent for the boar frozen semen** (per 100ml)

Ingredient	Soejima	M-Soejima	LEY	BF5
<b>1st extender</b>				
Tes-N-Tris	1.2 g	1.2 g	11% lactose	1.2 g
Tris	0.4 g	0.4 g	solution(80ml)	0.2 g
Glucose	3.0 g	3.0 g		3.2 g
Sodium lauryl sulfate	0.16 g	0.16 g		
Catarase(159IU/ml)		0.91mg		
Penicillin(500IU/ml)	0.061 g			
Streptomycin	0.1 g	0.1 g		
Gentamycin(25µg/ml)		2.5mg		20 ml
Egg yolk(v/v)	20 ml	20 ml	20 ml	
<b>2nd extender</b>				
Glycerol(4%,v/v)	4.0%	4.0%	4.0%	
OEP(Ovrus ES Paste, v/v)		1.0%	1.0%	
BSA(%, w/v)		0.1%		
Caffeine		2mM		
Heparin		100mg/ml		
pH		7.2	7.0~7.2	7.2
Osmolity		290~310		

	Group I	Group II	Group III
<b>Processing Step</b>			
<b>Pre-treatment</b>	<b>1st dilution</b>	<b>1st dilution</b>	<b>1st dilution</b>
<b>Collection &amp; dilution(1:1)</b>	<b>Room temperature</b>	<b>Room temperature</b>	<b>Centrifuge(15 min)</b>
<b>(Required time)</b>	<b>( 1 h )</b>	<b>Centrifuge(30 min.)</b>	<b>Room temperature</b>
		<b>( 1 h )</b>	<b>( 30 min )</b>
<b>Cooling</b>	<b>To 17 °C for 1.5 h</b>	<b>To 5 °C for 2 h</b>	<b>To 5 °C for 1 h 20min.</b>
	<b>Centrifuge(30min.)</b>		<b>* 2nd dilution during</b>
<b>(Required time)</b>	<b>To 5 °C for 2.5 h</b>	<b>( 2 h )</b>	<b>cooling</b>
	<b>( 4 h )</b>		<b>(1h 20min)</b>
<b>2nd Dilution</b>			
<b>(Required time)</b>	<b>( 1 h )</b>	<b>( 1 h )</b>	<b>None</b>
<b>Equilibration time &amp; Packing</b>	<b>( 50 min )</b>	<b>( 50 min )</b>	
<b>Pre-freezing</b>			
<b>(Required time)</b>	<b>( 10 min )</b>	<b>( 10 min )</b>	<b>( 10 min )</b>

\* It took about 30 minutes loose time in processing of each group.

Fig. 1. Schematic illustration of the processing time for freezing of boar semen.

ter(Miami, USA)로 생존정자의 비율을 조사하였다.

#### 4. 통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과는 최소 유의차 검정(Least Significant Difference test)을 실시하여 통계처리하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 보존액이 돼지정액의 동결융해후 생존성에 미치는 영향

돼지정액을 LEY, Soejima, m-Soejima 및 BF5 보존액을 사용하여 straw포장 또는 정제화하여 동결하였을때 융해 후 정자활력은 Table 2에서 보는 바와 같이 각각  $30.0 \pm 7.9$ ,  $38.3 \pm 5.8$ ,  $52.0 \pm 10.0$  및  $23.3 \pm 5.8\%$ 로 M-Soejima보존액이 가장 높은 정자활력을 나타냈으며, BF5보존액이 가장 낮은 활력을 나타

냈으나 처리간에 유의적인 차이는 없었다( $p > 0.05$ ). BF5보존액으로 pellet(정제화)법으로 동결된 경우 융해 후 활력이  $23.3 \pm 5.8\%$ 로 가장 낮게 나왔으나 본 실험에 사용된 4가지 보존액의 경우 예비동결 후의 정자 활력 수준이 낮은 경우에는 동결융해 후도 낮은 경향을 나타냈다.

이러한 결과는 Woelders 등(1996)이 1992년부터 1995년까지 조사한 동결정액의 융해 후 38~56%의 활력 수준보다는 다소 낮았으며, Persel과 Johnson(1975)이 BF5 보존액으로 2.5시간 냉각시킨 후 동결 융해하여 얻은 16%의 활력보다는 높았다. Straw법으로 동결된 LYE, Soejima 및 M-Soejima보존액의 동결융해 후 활력은 정제화법으로 동결한 BF5 보존액보다 높은 활력을 나타내었다. 이러한 결과로 동결보존액과 동결방법은 돼지 정자의 생존성에 밀접한 영향을 미치기 때문에 동결보존액의 선택이 돼지동결정액의 생산성을 더 향상시킬 수 있음을 시사하였다.

**Table 2. Effect of cryodiluents on the motility of spermatozoa during freezing-process (Mean±SD)**

Cryodiluents	Motility (%)			
	After collection	After cooling	After Pre-freezing	After thawing
LYE	80.0 ± 3.5 (n=5)	64.0 ± 15.0	33.0 ± 14.8	30.0 ± 7.9
Soejima		65.0 ± 15.0	43.3 ± 2.9	38.3 ± 5.8
Modified-Soejima		72.0 ± 11.0	65.6 ± 9.7	52.0 ± 10.0
BF5		55.0 ± 20.0	38.3 ± 10.4	23.3 ± 5.8

**Table 3. Effect of addition of heparin, caffeine and combination to 2nd cryodiluent of M-Soejima on the survival of spermatozoa after thawing**

Addition	Motility (%)			
	At collection	After cooling	After pre-freezing	After thawing
Control	80.5 ± 5.8 (n = 5)	70.0 ± 6.3	33.3 ± 7.6	26.7 ± 5.8 <sup>a</sup>
Heparin(100ug /ml)		73.3 ± 5.6	52.5 ± 15.0	40.0 ± 14.1 <sup>b</sup>
Caffeine(2mM)		81.7 ± 7.2	66.7 ± 2.9	61.7 ± 2.9 <sup>b</sup>
Heparin+Caffeine		76.7 ± 4.6	55.0 ± 15.0	50.0 ± 10.0 <sup>b</sup>

\* <sup>ab</sup> Values with different superscripts are significantly different (p<0.05).

한편 M-Soejima 보존액에서 동결과정 중 2차회석 시 heparin, caffeine 및 이들의 혼합첨가한 Group III (Fig. 1)의 방법으로 동결하였을 때 용해 후 정자활력은 Table 3에서 보는 바와 같이 각각 40.0±14.1, 61.7±2.9 및 50.0±10.0%로 caffeine을 첨가한 경우에서 가장 높게 나타났다. Heparin 및 caffeine의 단독 또는 혼합첨가는 첨가하지 않은 대조구보다는 유의적으로 높은 정자 활력을 나타내었다 (p<0.05).

이러한 결과는 동결과정동안 정자의 세포막상태의 변화를 조사하여 동결용해 후 30~35%의 활력을 얻었다고 보고한 Maxwell과 Johnson(1997a)의 결과보다는 다소 높은 수준이었다. 이와 같이 보존액에 caffeine 또는 heparin의 첨가는 이 등(1994)이 정자 처리가 체외성숙된 난포란의 분할에 미치는 영향에 관한 연구에서 caffeine 및 heparin으로 처리된 정자의 경우가 첨가되지 않은 대조구(32.5%)보다 분할율이 높게 나타났다(36.3%와 50.1%)고 보고한 결과와 Handrow 등(1986)이 소에서 이들의 첨가가 정자세포 내 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 증가시킴으로써 보존성과 활력 증가에 유리하다고 보고한 결과와 같이 2차 회석시의 동결보존액 내에 이들의 단독 또는 혼합 첨가가 동결

용해 후 정자활력을 증진시켰다. 그러나 Kusunoki 등(1989)은 돼지와 산양에서 caffeine의 첨가는 정자의 활력증진에는 효과적이지만 부적절한 시간 이상의 노출은 활력 및 생존성을 오히려 크게 저하시킨다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 Soejima보존액에 첨가된 caffeine 및 heparin은 용해 후 돼지 동결정자의 생존성을 다소 개선할 수 있는 것으로 사료되었다.

## 2. 동해보호제가 용해 후 정자의 생존성에 미치는 영향

M-Soejima 동결보존액에 동해보호제로서 glycerol(Gly), ethylene glycol(EG) propylene glycol(PG), Gly+EG 및 Gly+PG를 처리하였을때 용해 후 활력은 Table 4에서 보는 바와 같이 각각 23.8±43.8, 26.3±4.8, 27.5±2.9, 28.8±4.8 및 31.3±5.1%로 Gly+PG 혼합첨가가 다소 높았다. 그러나 동해보호제 첨가종류에 따른 flow cytometric 분석에 의한 동결용해 후 생존율(proportion of live spermatozoa)은 처리간에 유의적인(p>0.05) 차이가 없었으나 죽은 정자의 비율은 glycerol 단독 첨가구가 75.0±8.5%로 다른 처리구에 비해 다소 높게 나타

**Table 4. Effect of cryoprotectants on motility, NAR, and the proportion of live spermatozoa after thawing of frozen boar semen(Mean±SD)**

Cryo-protectants	Motility (%)	Acrosome morphology (NAR, %)	Proportion of live spermatozoa(%) by flow cytometry	
			live	Dead
Glycerol(Gly)	23.8±4.8	28.5±6.2	18.5±5.8	75.0± 8.5
Ethylene glycol(EG)	26.3±4.8	33.3±6.7	19.6±8.1	72.4±14.5
Propylene glycol(PG)	27.5±2.9	35.5±5.8	19.9±5.6	70.7±14.3
Gly + EG	28.8±4.8	37.5±5.1	21.2±5.4	72.3±10.5
Gly + PG	31.3±5.1	39.5±5.7	21.1±8.2	72.2±12.3

났다. 한편 용해 후 정상침체비율(NAR)은 활력이나 생존율의 평가방법과 같은 경향을 나타내었으나 이들 보다 다소 높게 평가되는 경향이 있었다.

이러한 결과는 동해보호제로서 ethylene glycol 및 propylene glycol(PG)이 glycerol보다 생존율이 높게 나타났으며, glycerol과 이들을 혼합 첨가한 경우는 단독첨가한 경우보다도 높았다. 정자 동결시 동해보호제 첨가수준에 관한 연구로 Gilmore 등(1996)이 ethylene glycol(2mM)을 첨가하여 3분동안 평형시켰을 때 세포내 침투력은  $7.59 \pm 0.78 \times 10^{-3} \text{cm/min}$ 로 돼지정자의 보존에 효과적으로 이용될 수 있다고 주장한 바 있으며, Yang과 Leibo(1999)는 소 수정란의 미세 소적내 동결에서 EG는 빠른 냉각속도의 동결에서 유리하다고 하였으며, Ali와 Shelton(1993)은 생쥐 수정란의 동결보존을 위한 초자화용액에 관한 연구에서 glycerol과 ethylene glycol의 혼합은 세포내 독성을 줄일 수 있다고 보고한 바 있다.

이러한 결과로 미루어 본 실험의 결과는 다소 같은 경향을 나타내었지만 이에 관한 연구보고가 매우 적기 때문에 ethylene glycol 및 propylene glycol의 첨가 방법과 수준 및 혼합첨가에 대해서는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료되었다.

### 3. 예비동결방법이 동결 용해 후 정자 생존성에 미치는 영향

M-Soejima보존액의 straw동결법과 BF5보존액에 의한 pellet(정제화)법으로 동결하는 동안 예비동결 방법을 dryice-pellet, dryice-straw 및 LN<sub>2</sub> vapour-straw법으로 하였을 때 동결용해 후 활력은 Table 5에서와 같다. Table 5에서 보는 바와 같이 예비동결을

**Table 5. Effects of pre-freezing methods on the motility(%) after thawing of boar semen frozen with 2 different cryodiluent**

Pre-freezing manner	Motility(%)	
	BF5	M-Soejima
After collection	85.0	85.0
After 2nd dilution	67.5	75.0
After thawing		
- Dry ice - pellet	22.8	42.5
- Dry ice - straw	47.5	47.5
- LN <sub>2</sub> vapour - straw	52.5	57.5

M-Soejima보존액으로 LN<sub>2</sub> vapour-straw법으로 하였을 때의 용해 후 활력은 57.5%로 다른 처리구보다 다소 높았다. 또한 BF5보존액의 경우에도 pellet법보다는 straw법이 동결용해 후 활력이 높게 나타났다.

이러한 결과는 Maxwell과 Salamon(1979)이 돼지 정자를 dryice 위에서 pellet형태로 동결한 경우와 straw형태로 동결한 경우 활력이 28.5~35.2 수준으로 예비동결방법간에는 용해 후 활력에 유의적인 차이가 없었다고 보고한 결과보다는 다른 경향을 나타내었으며, 동결용해 후 활력수준은 본 실험의 LN<sub>2</sub> vapour-straw방법에 의한 예비동결 방법이 다소 높았다. 이러한 예비동결방법은 Mohammad 등(1997)이 사람 정자의 동결과정동안 정자손상을 조사한 결과 0℃ 이하의 온도에서는 -30℃~-40℃로 동결된 정자가 -70℃ 또는 그 이하의 온도에서 동결된 정자보다 손상이 적었다고 보고한 결과와 같은 경향이었으나 Evenson 등(1994)이 돼지정자를 dryice 및 LN<sub>2</sub>에서

**Table 6. Effect of total time required from collection to freezing on the quality of sperm after thawing of frozen boar semen**

Total required Time in freezing process(h)	Motility(%)	NAR(%)	Proportion of live spermatozoa(%)
(n=4)			
2	43.8	19.5	20.8
5	45.0	22.7	19.9
7	38.8	28.5	22.1

동결하였을 때 생존성은 처리간에 차이가 없었다고 보고한 결과와는 다소 차이가 있었다.

결국 dryice 위에서 pellet형태로 동결시키는 것보다 액체질소표면 위에서 예비동결시키는 것이 오히려 후정자의 생존성에 유리함을 시사하였으며 예비동결시 포장방법에 있어서도 기존의 pellet(정제화) 보다도 straw법이 유리하며 보존액도 M-Soejima보존액이 BF5보존액 보다도 동결융해 후 정자활력을 개선한 효과를 나타내었다.

#### 4. 동결소요시간이 동결융해 후 정자의 생존성에 미치는 영향

M-Soejima 보존액으로 1차 희석하고 냉각시킨 후 caffeine이 포함된 2차 보존액으로 희석하여 Fig. 1에서 언급한 바와 같이 straw법으로 액체질소 표면에서 예비동결하여 최종 동결시까지 소요시간을 2, 5 및 7시간으로 하였을 때 동결융해 후 평균활력은 Table 6에서 보는바와 같이 각각 43.8, 45.0 및 38.8%였으며, SYBR-14/PI로 2중 형광염색하여 flow cytometry로 분석한 생존율은 각각 20.8, 19.9 및 22.1%로 7시간 소요된 동결방법이 높았으나 각 처리간에 유의적인 차이는 없었다( $p > 0.05$ ).

이러한 결과는 Pedersen과 Borge(1996)가 돼지 정액의 희석에 있어서 온도의 영향에 관한 연구에서 채취된 정액을 35℃에서 1차 희석한 후 30℃/30℃, 30℃/20℃ 및 20℃/20℃의 온도에서 각각 최종 희석시켰을 때 48~96시간 후의 정자활력 감소(19.6~34.05)는 처리간에 차이가 없었다고 보고한 결과와 같은 경향이였다. 그러나 Robertson 등(1988, 1990)은 동결과정동안 돼지정자가 cold shock에 의하여 침체 손상이 일어나지만 phospholipase A<sub>2</sub>의 첨가에 의하여 4℃까지 냉각되는 동안의 cold shock의 발생은 줄

일 수 있다고 보고하였다.

한편 Westendorf 등(1975)은 구체적 근거에서 glycerol을 5℃ 또는 15℃에서 첨가하여도 동결융해 후 정자 활력에는 아무런 차이가 없었다고 보고한 결과와 마찬가지로 본 실험의 2시간 동결처리시 냉각과정 중 glycerol 첨가와 평형을 동시에 이루어지게 첨가한 방법은 정자의 활력 또는 손상율에 차이가 없었던 결과와 유사한 경향을 나타내고 있다. 그러나 본 연구에서 조사된 NAR율은 Almlid와 Johnson(1988)이 동결융해 후 생존성에 대한 glycerol 첨가 온도 및 농도와 평형시간의 영향에 관한 연구에서 보고한 융해 후의 NAR율이 30~59% 수준이었던 결과보다는 다소 낮은 수준이었다.

## IV. 적 요

본 연구는 동결융해 후 정자의 생존성에 영향을 미치는 요인을 찾기 위하여 수행하였다. 동결융해 후 생존성에 대한 요인으로써 동결보존액, 동해보호제, 예비동결 및 동결소요시간을 비교하였다. 동결과정중 정액의 질을 평가하기 위하여 활력, NAR 및 생존율을 조사한 결과는 다음과 같다.

돼지정액을 BF5, LYE, Soejima 및 modified Soejima보존액으로 동결하였을 때 동결융해 후 정자 활력은 M-Soejima보존액이 44.5±6.4%로 다소 높았다. M-Soejima보존액의 2차 희석액에 caffeine(2mM), heparin(100 μl/ml) 및 caffeine+ heparin를 첨가하였을 때 동결융해 후 활력은 caffeine첨가구가 61.7%로 가장 높았으며, 단독 혹은 혼합첨가가 첨가하지 않은 대조구보다 유의적으로 높은 활력을 나타내었다( $p < 0.05$ ). M-Soejima보존액에 동해보호제로서 glycerol(Gly), ethylene glycol(EG), pro-

polyene glycol(GP), Gly+EG 및 Gly+PG을 첨가하였을 때 동결융해 후 활력 및 NAR율은 Gly+PG의 혼합첨가시(31.3%/39.5%)가 다른 첨가구보다 다소 높았으며 생존율은 Gly+EG첨가구가 21.2%로 다른 첨가구보다 다소 높았다.

BF5와 M-Soejima보존액으로 straw 및 pellet 동결법으로 동결하는 동안 dry ice-pellet, dry ice-straw 및 LN<sub>2</sub> vapor-straw법으로 예비동결하였을 때 각각 22.8, 47.5, 52.5% 및 42.5, 47.5, 57.5%의 활력을 나타내었다. 또한 M-Soejima보존액의 straw법으로 1차 회석부터 동결완료까지 소요되는 시간을 2, 5 및 7시간으로 하였을 때 동결융해 후 활력 및 생존율은 처리간에 큰 차이가 없었으나, NAR율은 처리시간이 길어질수록 다소 높은 경향을 나타내었다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 동결융해 후 활력, NAR 및 생존율을 높이기 위해서는 caffeine이 첨가된 M-Soejima보존액에 동해보호제로 glycerol과 propylene glycol 또는 ethylene glycol을 사용하여 2시간 동안 빠르게 동결처리된 정액이 다소 유리할 것으로 사료되었다.

## V. 인용문헌

- Alexopoulos, C., C. Boscose, P. H. Saratsish, C. Saoulidis and S. Kyriakis. 1996. The effect of storage time and number of spermatozoa per insemination dose on semen characteristics and fertilizing capacity of boar semen diluted with Beltsville Thaw Solution(BTS) extender. *Animal. Sci.*, 62:599-604.
- Ali, J. and J. N. Shelton. 1993. Design of vitrification solutions for the cryo-preservation of embryos. *J. Reprod. Fert.*, 99:471-477.
- Almlid, T., S. E. Stavne and L. A. Johnson. 1987. Fertility evaluation of the straw freezing technique for boar semen under practical artificial insemination conditions. *Zuchthy*, 22:193-202.
- Almlid, T. and L. A. Johnson. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa. *J. Animal. Sci.*, 66:2899-2905.
- Althouse, G., C. and S. M. Hopkins. 1995. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenol.*, 43:595-603.
- Dalimata, A. M. and J. K. Graham. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, 48: 831-841.
- Eriksson, B. and H. Rodriguez-Martinez. 1996. Assessment of membrane damage in frozen/thawed boar spermatozoa. *Reprod Domestic Anim. Boar semen preservation III*. Ed Rath D., L. A. Johnson, K. F. Weitze, 31(1):285-286.
- Fiser, P. S. and R. W. Fairfull. 1990. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosome integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5ml straws. *Mol. Reprod. Dev.*, 25:123-129.
- Garner, D. L. and L. A. Johnson. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Bio. Reprod.*, 53:276-284.
- Gilmore, J. A., L. E. McGann, A. T. Peter and J. K. Crister. 1996. Permeability of boar spermatozoa to ethylene glycol and its effect on water permeability. *Reprod. Domestic. Anim.*, 31(1):283.
- Gilmore, J. A., L. E. McGann, A. T. Peter, and J. K. Crister. 1996. Permeability of boar spermatozoa to ethylene glycol and its effect on water permeability. *Reprod Domestic Anim.*, 31(1):283.
- Hashizume, T., I. Tanimura, and S. Kanematsu. 1990. Ultrastructures of the acrosome in frozen-thawed boar spermatozoa by the pellet freezing method. *Jpn. J. Anim.*



- Reprod., 36:195-202.
13. Handrow, R. R., J. J. Parrish and N. L. First. 1986. Heparin stimulates calcium uptake by bovine sperm *in vitro*. *J. Androl.*, (Suppl. 1):23.
  14. Johnson, L. A., G. C. David and C. Polge. 1994. Recent advances in sex preselection of cattle : Flow cytometric sorting of X- & Y-chromosome bearing sperm based on DNA to produced progeny. *Theriogenology*, 41: 51-56.
  15. Johnson, L. A., 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa : 1970-1985. *Proc. 1st Int Confer on deep freezing of boar semen.*, Uppsala, pp. 199-222.
  16. Johnson, L. A., J. G. Aalbers and H.J.G. Grooten. 1988. Artificial in semination of swine : Fecundity of boar semen stored in Beltsville Modena(MM), or MR-A and inseminated on one three, and four days after collection. *Zuchthygiene*, 23:49-55.
  17. Kovachev, K. D., D. I. Zagorski, M. G. Ivanova and N. D. Bobadov. 1994. Cryogenic damage to boar spermatozoa frozen in pellets and tubes. *Theriogenology*, 42:1369-1379.
  18. Kusunoki, H., M Sakaue, S. Kato and S. Kanda. 1988. Induction of the acrosome reaction in ejaculated goat and boar spermatozoa by preincubation in isolated rat uterus and elucidation of possible inducing factors. *Jpn. J. Anim. Kepwd.*, 34:225-235.
  19. Lee, J. H., I. C. Kim and L. A. Johnson. 1999. Comparison of flow cytometric and morphological assessment on viability of spermatozoa during freezing process of boar semen. *Korean J. Emb. Trans.*, 14:69-78.
  20. Maxwell, W. M. C. and L. A. Johnson. 1997a. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48:209-219.
  21. Maxwell, W. M. C. and L. A. Johnson. 1997b. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:408-418.
  22. Maxwell, W. M. C. and S. Salamon. 1979. Fertility of frozen-thawed boar semen. *Aust. J. Biol. Sci.*, 32:243.
  23. Mazur, P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14:139-162.
  24. Mello, M. R. B., V. S. Queiroz, M. E. O. Assumpcao, L. M. T. Tavares, A. S. Lima, J. Buratini and J. A. Visintin. 1999. Cryopreservation of mouse morulae : A comparison among slow-freezing, quick-freezing and vitrification methods. *Theriogenology*, 51:170.
  25. Mohammad, C. L., C. L. Barratt, I. F. Cooke and H. D. Moore. 1997. Continuous assessment of human spermatozoa viability during cryopreservation. *J. Androl.*, 18:43-50.
  26. Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30(4):733-741.
  27. Pedersen, P. N. and L. Borge. 1996. Use of different temperatures in bore semen diluents. *Reprod. Domestic Anim.*, 31(1):277-288.
  28. Pizzi, F., B. Biffi, C. Crimella and R. Ghilard. 1997. Effect of boar semen quality on fertility using 3 different extenders. *EAAP -48th Annual Meeting*, Vienna, pp. 365.
  29. Pursel, V. G., L. A. Johnson and G. B. Rampacek. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.*, 34:278-284.
  30. Pursel, V. G. and L. A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa:Fertilizing capacity with concentration and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40:99-102.
  31. Robertson, L., P. F. Watson and J. M. Plummer. 1988. Prior incubation reduces calcium

- uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryo-Letters*, 9:286-293.
32. Robertson, L., J. L. Bailey and M. M. Buhr. 1990. Effect of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:143-149.
  33. Scheid, I. R., P. Westendorf and H. Treu. 1980. Deep freezing of boar semen in plastic tubes : Effect of different glycerol concentration. *Int. Pig Vet. Congr. Copenhagen, Denmark*, p. 38.
  34. Soejima, A., H. Masuda, Y. Waide and Y. Matsukawa. 1983. Effects of dilution rate, pellet volume, packed volume in aluminium-pack, straw volume and freezing methods on the survival of boar spermatozoa. *Jpn. J. Anim. AI. Res.*, 5:6-8.
  35. Westendorf, P., L. Richter and H. Treu. 1975. Fur tiefgefrierung von eber sperma. Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten-Verfahren. *Dtsch Tierarzy. Wochenscher*, 82:261-300.
  36. Woelders, H., A. Matthijs and M. Den Besten. 1996. Boar variation in "Freezability" of the semen. *Reprod. Domes. Ani.*, 31(1) :153-159.
  37. Woelders, H. and M. Den Besten. 1993. Cryopreservation of boar semen with small between-boar variation of post-thaw sperm survaval. *Abstract 106. Cryobiology*, 30:645.
  38. Yang, B. S. and Leibo. 1999. Viability of *in vitro*-derived bovine zygotes cryopreserved in microdrops. *Theriogenology*, 51:78
  39. Zheng, Y. S., P. Fisher and M. A. Sirard. 1992. The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for *in vitro* fertilization of porcine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 38:1065-1379.
  40. 이장희, 김창근, 정영채, 박충생. 1994. 정자처리와 공배양이 체외성숙된 돼지 난포란의 분할에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 9(2):269:277 (접수일자 : 1999. 5. 19. /채택일자 : 1999. 6. 13.)