

Percoll에 의한 미니돼지 정액내 세균 제거가 정자 성상과 수정란 분할에 미치는 영향

유한준¹ · 전준명¹ · 이용승¹ · 정희태² · 양부근¹ · 김대영³ · 박춘근^{1,†}¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의학부대학, ³가천의과대학교 생명과학부

Effect of Bacteria Eliminated Sperm by Percoll Method on Sperm Quality and Embryo Cleavage in Miniature Pig

Han-Jun Yoo¹, Jun-Myeong Jeon¹, Yong-Seung Lee¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹, Dae-Young Kim³ and Choon-Keun Park^{1,†}¹College of Animal Life Science and ²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea³Division Biological Science, Gachon University of Medical and Science, Incheon 406-799, Korea

ABSTRACT

The objectives of this study was to evaluate the efficiency of the bacteria eliminated sperm by percoll gradient method on sperm quality and embryo cleavage *in vitro* in pig. The semen of miniature pig collected by gloved-hand method pre-warmed (37°C) in thermos bottle, and separated by 65% percoll. Analysis of sperm ability was estimated by examining viability, capacitation and acrosome reaction using chlortetracycline (CTC) and the abnormality. Also, fertility of sperm was monitored with cleavage rate of embryo after IVF using separated and un-separated sperm by percoll. The result, viability of separated sperm was significantly ($p < 0.05$) higher (83.6±2.0 vs 59.0±4.4%) than un-separated sperm. The results of CTC analysis showed the percentage of F- and B-patterned separated sperm was higher in separated than un-separated sperm. On the contrary, the percentage of AR-patterned form un-separated sperm was significantly ($p < 0.05$) higher (13.6±0.8 vs 8.1±0.6%) than separated sperm. Also, abnormality of un-separated sperm was significantly ($p < 0.05$) higher (20.2±0.4 vs 16.8±2.8%) than separated sperm. However, the cleavage rates of embryo using separated sperm by percoll and un-separated sperm had not significantly difference on 2 cell stage (9.25 vs 11.88%), 4 cell stage (26.76 vs 24.51%) and >4 cell stage (63.99 vs 63.61%) at 48h of IVF. Therefore, the sperm separated by percoll method showed improvement in sperm quality than un-separated sperm in miniature pig.

(Key words : Miniature pig, Spermatozoa, Percoll, Sperm quality, Cleavage)

서 론

인공수정에 이용되는 종모돈의 정액에는 바이러스 또는 세균성 질병 10종 이상이 포함되어 있으며, 국내에서 정액을 통해 문제가 될 수 있는 질병으로 PRRS, 돈열(HC), 돼지췌코바이러스(PMWS 원인균), 돼지파보, 오제스키, 브루셀라 등이 있다. 이들 질병에 감염되었을 시 질병 전파 및 수태율 저하 등의 문제점이 나타나게 된다. 또한, 오염되거나 전염성 세균에 감염된 경우 질병의 빠른 확산을 이룰 수 있는 큰 단점을 안고 있다. 이와 같이 정액 중에 상당수의 세균이나 바이러스가 발견되는 원인에는 정액채취용 종모돈이 질병에 감염되어 나타나거나 또는 종모돈의 피부나 포피 그리고 주위환경의 오염에

기인되고 있다. 특히 정액 채취과정이나 정액의 희석 및 제조과정에서 많은 세균들이 오염되게 되며, 이러한 세균은 생존과 증식을 위해서 여러 가지 대사기질을 사용한 후 대사산물을 축적함으로써 정자의 생존기간을 단축시킬 뿐만 아니라 인공수정을 통하여 자궁내로 들어가 수정란의 생존에 영향을 미칠 수 있으며, 생식기 질병의 원인이 될 수 있다. 때문에 정액 내 세균으로부터 정자를 분리시킴으로써 세균의 오염이 없는 정액의 생산이 필요하다고 생각된다.

사정된 정액으로부터 정자분리과정을 통해 정상 형태와 운동성을 가진 정자들을 분리할 수 있는데, 이미 알려져 있는 정자분리법은 분리방법에 따라 washing 방법, sperm migration 방법, density gradient 방법, 그리고 adherence 방법 등으로 나눌 수 있다(Mortimer, 2000). 이

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

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

중 Washing 방법은 가장 많이 사용되는 방법으로 정액을 배양액과 원심분리를 실시하여 정자를 분리한다. 하지만 죽은 정자나 세포 잔여물은 분리되지 않는 단점을 가지고 있는 방법으로 이러한 죽은 정자나 세포 잔여물은 reactive oxygen species (ROS)를 유발할 수 있다(Aitken과 Clarkson, 1987). ROS는 정자 세포막의 과산화를 유발시키기 때문에 이는 세포막의 유동성을 낮추고, 정자의 기능과 DNA 또한 손상시킨다(Lopes 등, 1998; Ollero 등, 2001). Sperm migration 방법은 정자를 이동시키는 방법으로 swim-up 방법이 대표적이다(Lopata 등, 1976). 이 방법은 운동성 있는 정자들이 배양액 상층부로 이동하도록 하는 방법으로 정자 회수율이 높고 정상 정액상을 가지는 경우 가장 널리 사용되고 있다(Ohashi 등, 1992). Density gradient 방법은 Percoll, PureSperm, Silselect 및 SpermGrad 등과 같은 콜로이드 입자를 가진 용액의 농도 구배와 원심분리를 통하여 각각의 밀도차를 이용하여 정자와 세포파편 그리고 세균을 분리하는 방법으로 기계적인 충격이나 삼투압적인 충격을 줄일 수 있는 방법이다. 마지막으로 Adherence 방법은 유리판 내에 접성이 강한 물질을 입혀 정자를 분리하는 glass-wool column filtration method나 Sephadex gel column method가 여기에 속한다(Drobnis 등, 1991). 정자 분리 방법 중 Per-toft 등(1978)이 소개한 percoll을 이용한 성 분리 연구가 활발히 진행되어 원래 목적인 성 분리 면에서는 큰 효과는 없었지만 DNA 나선형 구조의 파괴를 줄여주고, nuclear integrity를 높여 주며, 세균의 오염을 감소시킨다고 보고된 바가 있다(Sakkas 등, 2000; Nicholson 등, 2000). 또한, Park 등(2008)은 percoll이 돼지 정액내의 세균 분리에 효과적이라고 보고한 바 있다. 하지만 percoll을 정자 분리에 사용할 경우, 내독소에 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). 이에 본 연구는 Park 등(2008)의 지속적인 연구의 일환으로 percoll을 이용한 정자 분리가 정자의 성상에 미치는 영향을 확인하고 또한 정자분리방법의 효율성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

정액채취 및 Percoll 분리

MHC Miniature Pig로부터 의빈대를 이용하여 음경수압법으로 채취한 원정액은 1차 회석 후 실험실로 운반되어 사용되었다. Percoll에 의해 세균분리 될 정액은 65% percoll 위에 분주하여 원심분리(1,500 rpm, 20 min)후, 최하단의 정자 pellet을 0.4% BSA가 첨가된 m-Modena B로 2회 세척한 후 정자 정상검사와 체외수정에 이용하였다.

생존율 검사

생존율은 Live/Dead kit(Maxwell과 Johnson, 1997)로 정자를 형광 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. SYBR-14와 PI로 구성된 Live/Dead kit는 형광색소의 살아 있는 세포막 투과성의 차이로 생존율을 알아보는 방법으로 그린

색 형광을 띠는 SYBR-14는 살아 있는 세포막을 투과하여 핵이 형광 염색되고, 붉은색 형광을 띠는 PI는 세포막 투과성이 없어 죽은 세포나 막 손상을 입은 세포의 핵에만 형광 염색되는 특징을 이용하여 Flow cytometry로 형광의 발현 차를 분석하였다.

침체 상태 검사

침체 상태 분석은 Wang 등 (1995)의 방법을 수정·보완하여 CTC 염색을 통한 정자의 침체 상태를 분석하였다. 실험 방법은 일반 회석 정자와 percoll에 의해 분리된 정자를 원심분리(1500 rpm, 5 min)하여 정자 부유액 792 μ l에 8 μ l의 Hoechst 33258을 첨가하고 어두운 실온에서 3분간 배양시킨 후, 3%(w/v) polyvinyl-pyrrolidone(PVP-40; Sigma) 4 ml로 첨가시켜 실온에서 원심분리(1500 rpm, 5 min)하였다. 상층액 제거 후 재부유시킨 45 μ l와 45 μ l의 CTC solution를 첨가하여 염색하고 12.5%(w/v) paraformaldehyde 8 μ l로 고정 후 slide glass에 10 μ l를 떨어뜨려 10 μ l의 DABCO와 혼합해 표본을 제작하였다. 제작된 표본은 형광현미경(400 \times)하에서 정자 두부 전체가 주황색으로 염색된 것은 수정능 획득 및 침체 반응이 일어나지 않은 정자(F pattern)로, 침체 부위만 염색된 것은 수정능 획득은 일어났거나 침체 반응이 일어나지 않은 정자(B pattern)로, 염색이 희미하거나 두부 적도 부위에 band가 형성된 것(AR pattern)은 수정능 획득과 침체 반응이 일어난 정자로 판정하였다.

기형을 검사

기형을 검사는 Rose-Bengal 염색 방법을 이용하여 정자의 이상형태를 관찰하고 분석하였다. 실험 방법은 회석 정액 1 ml와 생리식염수에 5%의 FBS가 첨가된 용액 5 ml를 혼합시킨 후 500 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거시킨 후 재부유시켰다. 정자 부유액의 200 μ l를 취하여 slide glass 위에 각각 50 μ l의 정자 부유액을 옮겨 도말하고, 실온에서 완전히 건조시킨 후, 0.5 μ l의 Rose-Bengal 염색액을 떨어뜨려 염색한 후 위상차 현미경(400 \times) 하에서 기형정자를 관찰하였다.

체외수정을 통한 수정란의 분할을 평가

기존의 항생제 처리 정액과 본 연구를 통하여 생산된 무균정액의 수정능력을 간접적으로 평가하기 위하여 도축장에서 공수해온 일반돼지 난소에서 채란된 난자를 이용하여 체외수정을 통해 초기배의 분할 능력을 평가하였다. 도축장으로부터 회수한 난소로부터 채란된 난자는 TCM-199에서 22시간씩 2차에 걸쳐 총 44시간 동안 성숙과정을 걸친 후 수정에 이용하였다. 수정액은 m-TBM을 이용하였으며, 난자는 0.1% hyaluronidase를 사용하여 난구세포를 적당히 제거시켜 준비한 후 percoll 처리한 정자와 일반 회석 정자를 체외수정하여 PZM-3로 48시간 동안 배양 후 분할률을 평가하였다.

결 과

생존율 평가

Percoll에 의해 분리된 정자와 일반희석정액의 생존율을 Flow cytometry로 분석한 결과(Fig. 1) 채취 1일 후의 정자를 percoll로 분리한 결과 더 높은 비율을 나타냈지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. 정액 3일 이상 보존 후 percoll로 분리한 결과에서는 일반희석정액(59.0±4.4%)에 비해 percoll로 분리한 정자(83.6±2.0%)가 유의적으로 ($p<0.05$) 생존율이 높게 나타났(Fig. 2).

정자첨체 상태의 평가

정자의 수정능력과 직접적인 연관성이 있는 정자의 첨체막의 상태를 분석하기 위하여 CTC 형광 염색 방법을 이용하여 분석한 결과 percoll로 분리한 정자(8.1±0.6%)의 AR pattern에서 percoll 비처리 정액(13.6±0.8%)에 비해 유의적으로($p<0.05$) 낮게 나타났다. 그러나 F와 B pattern에서는 percoll로 분리한 정자가 percoll 비처리 정자에 비해 높게 나타났으나, 유의차는 인정되지 않았다(Fig. 3).

정자의 기형을 평가

정자의 기형율을 분석한 결과 중 3일간 보존된 정액에서 percoll에 의해 분리된 정자(16.8±2.8%)가 일반 비처리 정자(20.2±0.4%)에 비해 유의적으로($p<0.05$) 낮은 기형율을 보였다. 한편, 채취 1일 후의 정액에서는 percoll로 분리된 정자에서 기형율이 더 낮게 나타났지만 유의적인

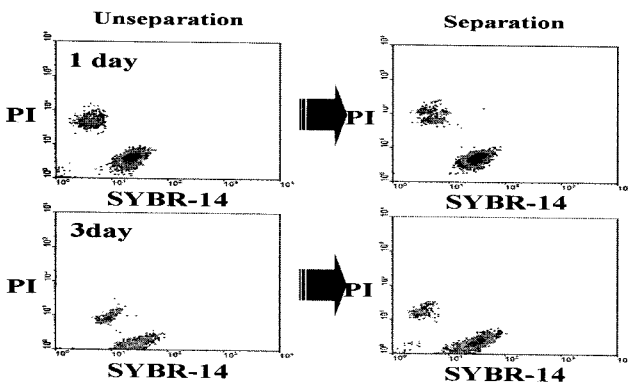


Fig. 1. Flowcytometric density plots showing fluorescence signals generated by boar sperm nuclei stained with PI and SYBR-14 for viability assay of separated sperm by percoll.

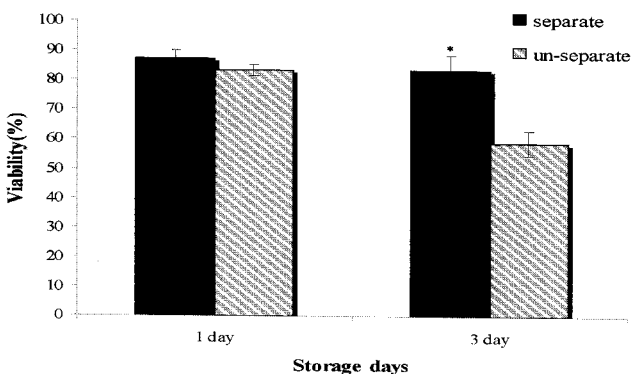


Fig. 2. Difference of viability between the separated sperm by percoll and un-separated sperm after 1 day and 3 days of sperm storage (*: $p<0.05$).

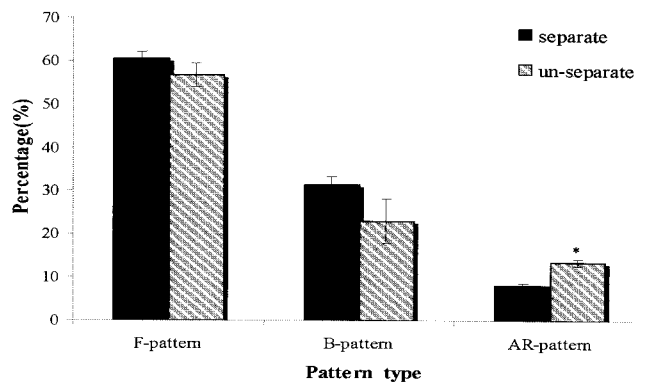


Fig. 3. Compare with each pattern type of un-separated and separated sperm by percoll. F: before capacitation, B: capacitated sperm, AR: non-function sperm (*: $p<0.05$).

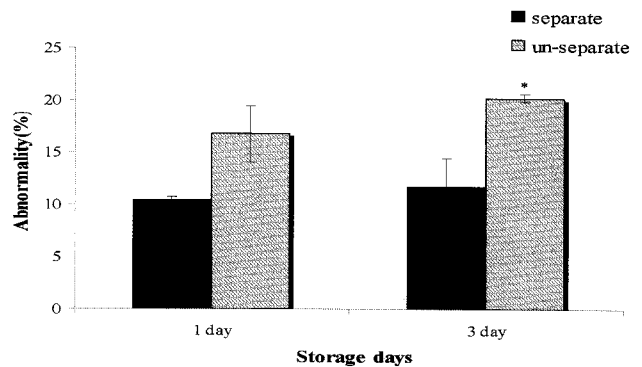


Fig. 4. Percentage of abnormal sperm number in treated percoll and un-separated sperm on the 1 day and the 3days of sperm storage (*: $p<0.05$).

차이는 인정되지 않았다(Fig. 4).

체외수정을 통한 초기배의 분할능력 평가

정자 성장검사를 통하여 percoll에 의해 분리된 정액의 질을 분석한 결과, 효과적으로 좋은 질의 정자를 분리하였다. 분리된 정자의 실질적인 수정능력을 확인하고자 체외수정을 통한 수정란의 분할율을 측정하였다. 그 결과 percoll에 의해 세균분리된 정자와 분리되지 않은 정자를 사용하여 수정된 배아에서 총 분할율(76.68 vs 73.32%)과 2세포기(9.25 vs 11.88%), 4세포기(26.76 vs 24.51%) 및 4 세포기 이상(63.99 vs 63.61%)의 각 분할율에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 1).

고 찰

정액 내의 세균은 정자의 질과 저장성에 악영향을 미친다(Althouse와 Lu, 2005). 지금까지의 방법은 정액의 희석액에 각종 항생제를 사용하여 세균의 활성을 억제하고 있는 실정이다. 이와 같은 항생제는 세균의 방어기전과 단백질 합성에 장애를 유발시켜 세균의 활동을 억제하게 되는데, 이러한 작용들은 정자에게도 영향을 미쳐 항생제의

Table 1. Effect of sperm separated by percoll on the embryo cleavage at 48h of IVF in pig

Treatment percoll	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved (%)	No. of embryos cleavage at 48h (%)		
			2 cell	4 cell	> 4 cell
+	536	411 (76.68)	38 (9.25)	110 (26.76)	263 (63.99)
-	551	404 (73.32)	48 (11.88)	99 (24.51)	257 (63.61)

* The ratios of 2 cell, 4 cell and >4 cell embryos were based on the embryo cleavage at 48 of IVF.

사용은 그 사용량에 있어 주의를 해야만 한다. 때문에 희석액에 사용되는 항생제는 정자에게 영향을 미치지 않을 정도의 정량만을 사용하여 정액 내의 모든 세균을 억제하지 못하였고 이로 인해 인공수정을 통한 질병 입법의 위험을 가지게 되었다. 정액 내의 세균을 제거하기 위해 가장 흔하게 사용하는 gentamicin을 처리하였으나 세균이 완전히 제거되지 못한 반면, percoll을 이용한 density gradient 방법 중 3 step 방법에서는 정액내의 세균이 완전히 제거되는 것으로 나타났다(Park 등, 2008) 이에 본 연구는 percoll을 이용한 정자 분리방법으로 정액 내의 세균을 제거하고 percoll을 통한 정자 분리 방법의 실효성을 검증 하였다.

일반적으로 percoll은 colloid로 점성을 가지고 있는 것이 특징인 물질이다. 이러한 점성을 가지는 특성뿐만 아니라 배양액과 혼합을 하여도 삼투압의 변화가 없다는 장점이 있기 때문에 높은 밀도 구배 방법을 이용한 정자 분리 방법에 많이 사용되었다. 또한, percoll은 질이 좋은 정액뿐만 아니라 질이 낮은 정액에서도 질 좋은 정자의 회수율이 높기 때문에 1980년대 이후 정자 분리에 많이 이용되었다(Jaroudi 등, 1993; Ord 등, 1990). 또한, 폐지에 있어서 사출 직후의 정액 내에서 다양한 종의 세균이 발견되었으며, 이를 percoll로 분리하였을 때, 65% 이상의 percoll에서 효과적으로 제거가 되었다고 보고된 바가 있다(Park 등, 2008). 이에 근거하여 본 연구에서는 65%의 percoll에 의해 정자를 분리하였고 그 성장과 능력을 측정하였다.

본 연구에서 percoll에 의해 분리된 정자의 생존율을 일반희석정액과 비교실험한 결과, 채취 3일 후의 정액을 percoll로 분리하였을 때 정자의 생존율이 유의적으로 더 높게 나타났다. 채취 1일 후의 정액에서는 유의적인 차이는 보이지 않았지만 percoll로 분리한 경우의 생존율이 더 높았다. 이 같은 사실은 percoll을 통해서 정자를 분리하였을 때 죽은 정자를 효과적으로 분리할 수 있다는 것을 말해준다. 사람의 정자를 percoll로 분리하였을 때, 분리된 정자가 아래쪽에 위치할수록 높은 운동성을 가진다는 보고(Watkins 등, 1996; Tohyama 등, 1997)와도 유사한 결과이다. 침체상태는 percoll에 의해 분리된 정자에서 AR pattern이 유의적으로 낮게 나타났다. AR pattern의 정자는 침체가 반응을 한 후의 상태를 말하는 것으로 정자가 수정능력을 상실했다는 것을 의미한다. AR pattern의 비율이 총 정자의 수정능력과 질을 간접적으로 판단할 수 있는 지표가 된다는 점을 고려해볼 때, percoll에 의한 정자 분리가 보다 실효성이 높다는 것을 알 수 있다. 이는 가장 대표적인 분리방법인 swim-up 방법의

수정율이 37.8%인데 반해 percoll gradient 방법은 51.3%로 오히려 더 낫은 결과를 나타내었다는 보고(Sapienza 등, 1993)와도 일치하는 결과이다. 마지막 정상 검사인 기형을 검사 결과 또한 percoll에 의해 정자를 분리한 경우에 보다 낮은 수치를 보여주었다. 채취 3일 후의 정자에서 percoll로 분리한 정자와 일반 희석 정액간에 유의적인 차이가 나타났으나, 채취 1일 후의 정액에서는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이와 같은 결과는 기형 정자는 운동성이 거의 없으므로 점성이 있는 percoll을 침전하여 통과하지 못하기 때문이라고 생각된다. 이와 같이 정자 정상 검사 결과를 통해 percoll에 의한 분리방법은 질 좋은 정자의 분리에 보다 효과적이라는 사실을 알 수 있다. 또한, 이 같은 사실은 3일차의 정액에서 보다 확실하게 나타났으므로 저장 기간이 길수록 더 확실한 효과를 얻을 수 있다고 생각된다.

그러나 percoll이 인체에 사용하기에는 독성과 관련된 문제점들이 보고된 바가 있어 인공수정이나 체외수정을 위해서는 적합한 방법이 아니라고 밝히고 있는 연구 결과가 있기 때문에(Andersen와 Grinsted, 1997; De Vos 등, 1997; Scott와 Smith, 1997; Strehler 등, 1998) 이를 확인하고자 체외수정 실험을 실시하였다. 체외수정 실험 결과, percoll과 희석정액에서 총 분할율과 2세포기, 4세포기 및 4세포기 이상의 각 분할율에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이는 percoll에 의한 정자분리 방법이 수정율과 배반포율의 향상에 효과적인 방법(Parrish 등, 1995)이라고 보고한 내용과는 상반되는 결과이다. 하지만 수치상으로 비슷한 결과를 나타내고, 정자가 percoll에 의한 분리 과정에서 percoll내에 존재한다는 독소 물질로부터 해로운 영향을 받지 않는다는 점에서 중요한 결과라고 판단할 수 있다.

연구 결과를 총 요약하자면, 정자 성상을 분석한 결과, percoll에 의해 분리된 정자의 경우 일반희석정액에 비해 정자 성상이 좋은 결과를 보였다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 percoll을 이용한 분리효과가 세균 분리 효과뿐만 아니라 질 좋은 정자를 분리 선별하는데 효과적인 것을 알 수 있었다. 또한, 수정된 난자의 분할 정도는 유의적으로 비슷한 수치를 보였다. 이와 같은 결과는 percoll이 정자의 수정능력과 분할율에 영향을 주지 않는다고 판단되며, percoll로 생산된 무균정액의 실용성을 간접적으로 입증할 수 있는 결과라고 생각된다.

본 연구를 통해 percoll에 의해 정액 내 세균을 효과적으로 분리한 정액의 사용은 인공수정 시에 가축으로의 질병입법의 위험을 배제시킬 수 있고, 항생제의 사용을 줄일 수 있어 실제 농가에서의 인공수정과 안전한 축산

물 생산에 도움을 줄 수 있을 것이라 기대된다. 또한, 현장에서 실용성을 확인하기 위해 percoll에 의한 분리 방법을 거친 정액을 이용하여 가축으로의 실제 인공수정을 실시하고 산자를 얻어 개체에 직접적으로 미치는 영향을 확인하는 연구가 필요할 것이라 생각된다.

사 사

본 연구를 수행하는데 있어서 정액의 채취와 분석에 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

인용문헌

- Aitken RJ, Clarkson JS (1987): Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert* 81:459-469.
- 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* 14:624-628.
- 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* 12:1980-1984.
- Drobnis EZ, Zhong CQ, Overstreet JW (1991): Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing, or Percoll gradients. *J Androl* 12(3):201-208.
- Jaroudi KA, Carver-Ward JA, Hamilton CJ, Sieck UV, Sheth KV (1993): Percoll semen preparation enhances human oocyte fertilization in male-factor infertility as shown by a randomized cross-over study. *Hum Reprod* 8:1438-1442.
- Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B (1976): A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril* 27:677-684.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998): Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13:896-900.
- Maxwell WMC, Johnson LA (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
- Mortimer D (2000): Sperm preparation methods. *J Androl* 21:357-366.
- Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE, Bjurulf E (2000): Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. *Hum Reprod* 15:662-666.
- Ohashi K, Saji F, Wakimoto A, Kato M, Tsutsui T, Tamizawa O (1992): Preparation of oligozoospermic and asthenozoospermic semen for intrauterine insemination using the SpermPrep semen filtration column. *Fertil Steril* 57:866-870.
- Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al (2001): Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 16:1912-1921.
- Ord T, Patrizio P, Marello E, Balmaceda JP, Asch RH (1990): Mini-Percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum Reprod* 5:987-989.
- 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.
- 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(6):859-869.
- Pertoft H, Laurent TC, Laas T, Kagedal L (1978): Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal Biochem* 88:271-282.
- Sakkas D, Manicardi 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.
- Sapienza F, Verheyen G, Tournaye H, Janssens R, Pletinckx I, Derde M, Van Steirteghem A (1993): An auto-controlled study in *in-vitro* fertilization reveals the benefit of Percoll centrifugation to swim-up in the preparation of poor-quality semen. *Hum Reprod* 8(11):1856-1862.
- Scott L, Smith S (1997): Mouse *in vitro* fertilization, embryo development and viability, and human sperm motility in substances used for human sperm preparation for assisted reproduction. *Fertil Steril* 67:372-381.
- Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collo del G, De Santo M, et al. (1998): Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa. *Hum Reprod* 13:120-123.
- Tohyama Y, Oshio S, Yotsukura M, Umeda T, Mohri H (1997): Percoll density gradients centrifugation can separate human X-bearing sperm. *J Assist*

- Reprod Genet 14:194s.
23. 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.
 24. Watkins AM, Chan PJ, Patton WC, Jacobson JD, King A (1996): Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous Percoll gradient for sex preselection: computerized analyses. Arch Androl 37:1-5.
(접수일자: 2009. 3. 1 / 채택일자: 2009. 3. 13)