

수태지 정자의 운동성, 생존성 및 체외수정 능력에 대한 시판 액상 정액 보존액과 보존 기간의 영향

사수진¹ · 김명직¹ · 조규호¹ · 김두완¹ · 소경민¹ · 정기화² · 손중호³ · 김인철^{1,†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 양돈과, ²경남과학기술대학교 동물소재공학과, ³노아바이오테크

Effect of Storage in Different Commercial Semen Extenders on the Motility, Viability and Fertility *In Vitro* of Boar Spermatozoa

Soo Jin Sa¹, Myung Jick Kim¹, Kyu Ho Cho¹, Du Wan Kim¹, Kyoung Min So¹,
Ki Hwa Chung², Jung Ho Son³ and In Cheul Kim^{1,†}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Seonghwan 330-801, Korea

²Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

³Noah Biotech. Inc., Cheonan 331-858, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of semen extenders on the motility, viability and fertility *in vitro* of spermatozoa during storage of fresh boar semen diluted in different commercial extenders used for pig artificial insemination (AI). In this experiment, semen were diluted in Androhep plus, Beltsville Thawing Solution (BTS), Modena, Seminark and Vitasem LD. Five ejaculates were collected from three Duroc boars and sub-samples were diluted (30×10^6 spermatozoa/ml) in different extenders. Semen was stored at 17°C for 10 days. Sperm motility and viability was assessed using Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) and flow-cytometry on 1, 3, 5 and 10 day post collection. The motility of spermatozoa stored in different extenders was gradually decreased by increasing the duration of storage of semen. However, there was not significantly different in the sperm motility and viability among other extenders. On the other hand, the *in vitro*-matured oocytes were fertilized and cultured *in vitro* to assess the fertility of boar spermatozoa stored for 3 and 10 days in different extenders. The percentage of morula and blastocyst were taken as indicators of fertility *in vitro* of spermatozoa. Therefore, there were no differences in the rate of embryos developed to the molular and blastocyst stage. There were no differences in the motility and fertility *in vitro* among 5 kinds of commercial boar semen extenders.

(Key words : Boar semen extender, Motility, Viability, Fertility *in vitro*, Spermatozoa)

서 론

양돈산업에 있어 돼지 인공수정 기술은 돼지 생산성을 획기적으로 향상시키는 결과를 가져온 가장 중요한 기술 중 하나로써 1994년도에 '정액 등 처리업에 대한 허가 규정'에 의해 상업용 인공수정센터 5개소가 농림부 허가를 받아 정액을 판매하면서 본격적으로 보급이 확대되기 시작하여 지난 15년간 급속한 발전을 이뤄왔다(김, 2005). 한국의 돼지 인공수정의 보급률은 80% 이상으로 농장에서 이용되는 액상 정액의 대부분이 돼지 인공수정센터에서 공급되고 있으며, 전국 돼지 인공수정센터 보유 종모돈은 3,000여두에 달하는 것으로 추정하고 있다(김, 2005). 소와 달리 돼지의 인공수정의 경우는 신선한 회석정액

(fresh diluted semen)을 이용하는 것이 일반적이기 때문에, 돼지 인공수정센터뿐만 아니라 비육돈 생산 농장주들도 액상 정액의 보존 기간 연장에 관심을 두고 있다. 수태지 정자의 수정 능력을 평가하기 위해서는 다양한 방법이 이용될 수 있다. 정자의 형태(morphology)는 정자의 생존성과 수정 능력을 판단하는 중요한 지표가 되며, 정액의 성상 평가를 위해 일상적으로 사용된다(Britt *et al.*, 1999). 정자의 운동성은 활발한 대사 활동과 정자 원형질막 상태에 대한 지표(Johnson *et al.*, 2000)로 쓰일 뿐 아니라 정자의 수정 능력을 판정할 때 가장 중요한 기준으로 이용된다. Britt 등(1999)은 정자의 운동성이 60% 이하인 정액을 인공수정에 이용할 경우, 수태율과 분만율이 떨어뜨리는 원인이 된다고 보고하였다. 인공수정용 정액을 보관하는데 사용되는 액상 정액 보존액은 정액 보존

[†] Corresponding author : Phone: +82-41-580-3440, E-mail: kickic@korea.kr

보존 기간 동안 정자의 운동성뿐만 아니라 생존성을 유지하는 것이 무엇보다 중요하며, 액상 정액 보존액은 정액보존 보존기간에 따라 장기 보존액(long-term extender)과 단기 보존액(short-term extender)으로 분류되기도 한다.

이 연구의 목적은 수태지 정자의 운동성, 생존성 및 체외수정 능력에 대한 시판 액상 정액 보존액과 보존 기간의 영향을 검토하기 위한 것이다. 보존액 간의 정액 보존성을 비교하기 위해서 총 5가지의 정액 보존액이 사용되었으며, 희석정액을 10일 동안 보관하면서 정자의 운동성, 생존성 및 체외수정 능력의 변화를 분석하였다.

재료 및 방법

시약 및 보존액

달리 언급이 없는 한 이 연구에 사용된 모든 시약은 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 액상 정액 보존액 제조용 희석제는 Androhep plus (Minitube of America, INC, USA), BTS(KRUUSE), Modena(Cambridge, IA 50046 USA), Seminark(Noah Biotech., Korea), Vitasem LD(Magapor S.L., Spain) 등 총 5 종류를 사용하였다.

정액의 준비

농촌진흥청 국립축산과학원 양돈과에서 사육중인 듀록종 수태지 3두가 시험을 위한 공시동물로 이용되었다. 정액의 채취는 의빈대를 이용한 수압법을 이용하였으며, 정액 필터를 통해 1차적으로 걸러진 정액을 37°C의 가온된 병에 옮겨 2시간 이내로 실험실로 운반하였다. 채취된 원정액은 Androhep plus, BTS(Beltsville Thaw Solution), Modena, Seminark 및 Vitasem LD 총 5개의 액상 정액 보존액과 1:1의 비율로 1차 희석한 다음, 각각의 보존액을 이용하여 정자의 농도가 30×10^6 spermatozoa/ml이 되도록 2차 희석을 실시하였다. 희석을 마친 액상 정액은 시험에 이용될 때까지 17°C 액상 정액 보관고에서 보관하였다.

희석정액의 운동성 및 생존성 평가

정액의 운동성을 검사하기 위해서 15 ml conical tube (Corning, USA)에 5 ml씩 sample을 취하여 37°C 항온 수조에서 30분간 가온하였으며, 정자자동분석기(CASA; computer-assisted semen analysis, Medical Supply, Korea)를 이용하여 활력을 측정하였다. 정자의 생존을 검사를 위해서는 SYBR-14와 propidium iodide(PI)로 구성되어 있는 Live/Dead kit(Maxwell과 Johnson, 1997)를 이용해 정자를 형광염색하는 방법을 사용하였으며, Flow-cytometry (FACS ARIA, B.D., Sanzose Ca., USA)를 이용해 형광의 발현차를 분석하였다.

난자의 수집 및 체외성숙

도축장에서 도살된 암태지로부터 난소를 회수하여 30~35°C의 생리식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하여 직경 2~6 mm 난포로부터 18 게이지 주사침이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채

취된 난자는 실체현미경 하에서 세포질이 균질하고 난구 세포가 균일한 난자만을 선별하여 난자 체외성숙용 배양액(TCM-199; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)으로 수회 세척 후 성숙배양을 실시하였다. 난자의 체외성숙은 기본배양액 TCM-199에 10% pFF(porcine follicular fluid), 5 ug/ml LH, 0.5 ug/mlFSH, 10 IU/ml hCG, 0.01 ug/ml EGF를 첨가한 IVM-1 용액을 사용하였으며, 인큐베이터 내에서 5% CO₂, 39°C 온도 조건으로 22시간 동안 1차 성숙 배양 후 TCM-199에 10% pFF와 0.01 ug/ml EGF만을 첨가한 IVM-2 용액을 이용해 동일한 배양 조건(5% CO₂, 39°C)으로 22시간 동안 추가로 성숙배양을 실시하였다.

체외수정 및 체외배양

체외수정을 위한 기본배양액은 mTBM(113.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂·2H₂O, 11 mM glucose, 5 mM pyruvic acid, 0.57 mM L-cysteine, 20 mM Tris, 20 mM penicillin G, 3.4 mM streptomycin sulfate)을 사용하였다. 성숙된 난자는 0.1% hyaluronidase 용액을 이용해 난구세포를 제거한 후 0.02% BSA(Sigma A-6003)가 첨가된 mTBM 소적으로 옮겼다. 정자의 최종농도를 2×10^6 spermatozoa/ml로 맞춘 다음, 난자가 들어있는 체외수정용 소적에 정자를 투입하여 체외수정을 한 후 인큐베이터 내에서 5% CO₂, 39°C 온도 조건으로 배양을 실시하였다. 배양 6시간 후 수정된 난자 주위에 붙어있는 난구 세포와 정자를 제거한 다음 PZM-3(108 mM NaCl, 10.00 mM KCl, 0.35 mM KH₂PO₄, 0.40 mM MgSO₄·7H₂O, 25.07 mM NaHCO₃, 1 mM glutamine, 2 mM Ca(lactate)₂·5H₂O, 5 mM hypotaurine, 0.05 mg/ml gentamicin sulfate)에 0.03% BSA(bovine serum albumin)를 첨가한 체외배양액을 이용해 5% CO₂, 39°C 인큐베이터 내에서 배양하며 난자의 발달을 관찰하였다.

실험설계

정자의 운동성, 생존성 및 체외수정 능력에 대한 액상 정액 보존액의 종류와 보존 기간의 영향을 평가하기 위해서 듀록종 수태지 3두에서 채취된 원정액을 개체별로 각각 5개의 용기에 나누어 담은 후 실험대상인 5개 보존액(Androhep plus, BTS, Modena, Seminark 및 Vitasem LD)과 희석을 실시하였다. 이 때 1차적으로 1:1 희석을 실시한 후, 각각의 보존액을 이용하여 정자의 농도가 30×10^6 spermatozoa/ml가 되도록 2차 희석을 실시하였다. 희석을 마친 정액은 17°C 액상 정액 보관고에서 10일 동안 보관하면서 1, 3, 5 및 10일차에 보관된 액상 정액의 정자 운동성(CASA)과 생존성(flow-cytometry)을 측정하였으며, 보관 3일 및 10일차의 액상 정액을 이용해 체외수정을 실시한 후 상실배(moluar)와 배반포(blastocyst)까지의 발달율을 검사하는 방법으로 체외수정률을 측정하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.1을 이용하여 최소 유의차 검정(Least Significant test; LSD test)과 General linear model(GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의차($p < 0.05$)를 검정하였다.

Table 1. Percentage of total motile spermatozoa, as assessed by computer-assisted sperm analysis, in semen from three fertile boars, stored for up to 10 days in Androhep plus, BTS, Modena, Seminark or Vitasem LD at 17°C

Storage duration (day)	Androhep plus	BTS	Modena	Seminark	Vitasem LD
1	64.7±14.9 ^a	74.4±11.4 ^{ab}	76.9±9.0 ^b	65.5±13.3 ^a	77.3±10.0 ^b
3	57.5±16.6 ^a	70.6±10.7 ^{ab}	73.4±7.8 ^b	64.8±16.6 ^{ab}	70.5±14.0 ^{ab}
5	47.2±10.1 ^a	64.8±10.8 ^b	67.6±8.3 ^b	61.1±14.3 ^{ab}	65.7±12.7 ^b
10	42.3±15.8 ^a	55.7±10.0 ^a	51.0±13.8 ^a	45.9±12.9 ^a	52.9±18.7 ^a

Value are expressed as mean ± SEM.

^{ab} Values in the same row with different letters superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

Table 2. Sperm viability assessed by flow-cytometry, in semen from three fertile boars, stored for up to 10 days in Androhep plus, BTS, Modena, Seminark or Vitasem LD at 17°C

Storage duration (day)	Androhep plus	BTS	Modena	Seminark	Vitasem LD
1	77.8±6.3	77.0±7.7	79.5±8.4	79.6±7.3	79.1±7.2
3	72.4±7.8	71.4±8.6	74.1±7.9	72.7±7.7	73.4±8.1
5	72.0±9.3	72.5±8.1	75.7±7.9	74.3±7.7	75.0±8.1
10	71.2±9.0	66.5±8.3	77.3±8.2	71.8±10.7	72.4±10.4

Value are expressed as mean ± SEM.

결 과

시판 중인 5개 보존액으로 각각 희석한 돼지 정액 샘플의 운동성은 정액의 보관일자(1~10일차)가 연장됨에 따

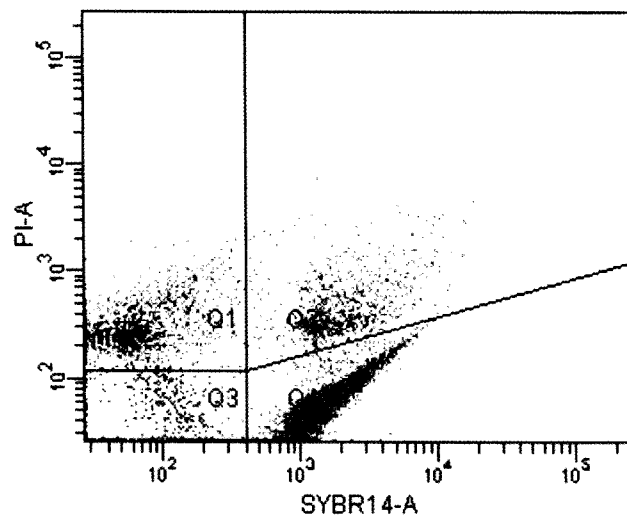


Fig. 1. The cellular integrity of boar sperm was assessed with fluorescent markers and a flow-cytometer. Intact cells were identified with SYBR-14 (green) and cells exhibiting membrane damage were identified with propidium iodide (PI, in red). Q1, dead cells; Q2, alive and damaged cells; Q3, background; Q4, alive and intact cells.

라 점차 감소하는 경향을 보였다. 보관 5일차까지 Androhep plus에서 보관된 정액의 경우 타 보존액에 비해 운동성이 낮게 나타났지만($p < 0.05$), 타 보존액들 사이에서는 정자운동성에 대한 유의적인 차이가 관찰되지 않았다 (Table 1). 정자의 생존성을 분석한 결과, 모든 액상 정액 보존액에서 차이를 보이지 않았으며, 보관 10일차까지 모든 보존액에서 65% 이상의 생존성을 유지하고 있는 것으로 확인되었다 (Table 2). 보존액 종류와 보존 기간에 따른 정자의 수정 능력을 평가하기 위해서 체외수정 후 상실배(moluar)와 배반포(blastocyst)까지 발달한 난자의 비율을 검토한 결과, 정자의 체외수정 능력에 대한 보존액 종류 및 보존 기간에서의 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

고 찰

우리는 시판 중인 5가지 액상 정액 보존액으로 희석된 돼지정액을 10일 동안 보관하면서 각 보존액의 정액 보존성(정자의 운동성, 생존성 및 수정 능력)을 검토하였다. 정자의 운동성은 수태지 정자의 품질을 판단하는 매우 중요한 기준이다(Britt *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000). Britt 등(1999)은 60% 이하의 운동성을 가진 정자에서 수정을 저하를 보고하였으며, Johnson 등(2000)은 60% 이상의 정자운동성이 적절한 수태를 위해 필수적이라고 보고하였다. 우리의 연구에서 정자의 운동성은 희석정액의 보관 기간이 연장됨에 따라 감소하는 경향을 보였다. 우리의

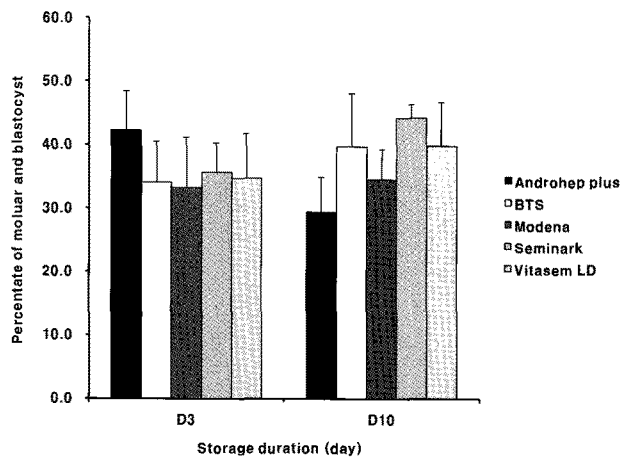


Fig. 2. Effect of different commercial semen extenders and semen storage duration on fertility *in vitro* of spermatozoa in boar semen stored for up to 10 days. Bars represent mean±standard error of the mean.

예상과 달리 장기 보존액으로 알려진 Androhep에서 보관 5일차까지 운동성이 낮게 나타났지만, 대부분의 다른 보존액의 경우 서로 간에 운동성 차이를 보이지 않았으며, 보관 5일차까지 60% 이상의 정자운동성이 관찰되었다. 한편, 흥미롭게도 단기 보존액으로 알려진 BTS의 경우, 시험의 전 구간에 걸쳐 양호한 수준의 정자운동성을 유지시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 BTS와 Androhep에서 9일차까지 보관한 정액의 정자생존성이 50% 이상이라고 보고한 Huo 등(2002)의 결과와 일치한다. 또한, Vyt 등(2004)은 5개의 돼지 액상 정액 보존액을 시험한 결과 장기 보존액으로 분류되는 Androhep, MINITUB, Tiefenbach 및 Germany 등에 비해 BTS+에서 더 높은 정자운동성이 관찰된다고 보고하였는데, 이는 우리의 연구결과와 유사하다. 이와 반대로 몇몇 연구에서는 BTS+로 희석된 정액의 정자운동성이 장기 보존액으로 희석된 정액에 비해 상대적으로 떨어진다고 보고하였다 (Huo *et al.*, 2002; Kommisrud *et al.*, 2002; Dubé *et al.*, 2004). 우리의 실험에서 17°C 보관고에 보관했던 액상 정액을 37°C 항온 수조에서 30분 동안 가온한 후 보존액별로 운동성을 측정하였는데, 그 결과 장기 보존액으로 알려진 Androhep에서 운동성이 낮게 나타났다. 이는 17°C에 보관되었던 정액이 적절한 정자운동성을 회복하는데 필요한 가온시간이 보존액마다 다르기 때문일 것으로 추측된다. 따라서, 17°C 온도 조건하에서 보관 중인 정액의 운동성에 영향을 미치는 요인에 대한 검토와 보존액별 적정 가온필요 시간 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

정자의 생존성의 경우 보존 기간을 연장하였음에도 불구하고 모든 보존액 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 전체 보존 기간에 걸쳐 높은 수준을 생존성(>65%)을 유지하고 있는 것으로 나타났는데, 이는 장기 보존액인 Androhep과 BTS 사이의 정액 보존성을 비교한 결과, 차이가 없었다는 Dubé 등(2004)의 보고와 일치한다. Huo 등(2002)은 120시간 동안 희석정액을 보관하면서 정자 생존성의 차이를 분석했을 때 Androhep과 BTS+사이에서 차이가 나타나지 않았다고 보고하였다. 이와 관련하여

Boe-Hansen 등(2005)은 보존액에 따른 정자의 생존성이 수태지 품종에 따라 영향을 받는다고 보고한 반면, Marco 등(2006)은 품종에 따른 차이를 발견할 수 없다고 보고하였다. 우리의 실험 결과에서 단기 보존액으로 알려진 BTS에서조차 보관 10일차까지 66.5%의 정자생존성이 관찰되어 정자생존성은 보존액의 종류에 따른 영향을 받지 않는 것으로 사료된다.

다른 한편으로, 보존정자의 수정 능력을 평가하기 위해서 17°C 보관 3일차와 10일차의 정액을 이용해 체외수정 후 상실배(moluar)와 배반포(blastocyst)까지 발달한 난자의 비율을 검토한 결과, 정자의 체외수정 능력에 대한 보존액 종류 및 보존 기간에서의 차이가 나타나지 않았다.

이상의 결과를 종합하면, 인공수정용 액상 정액을 보존하기 위해 사용되는 보존액 중 단기(short-term) 보존액으로 알려진 보존액의 경우도 장기(long-term) 보존액으로 알려진 보존액과 비교해 정자의 운동성, 생존성 및 체외수정 능력에서 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 또한, 정자의 생존성의 경우는 시험에 이용된 모든 보존액에서 10일차까지 높은 수준의 생존율을 나타내는 것으로 확인되어 단기 보존액으로 알려진 보존액의 경우도 장기 보존액으로 알려진 보존액과 유사한 수준의 양호한 액상 정액 보관능력을 가지고 있는 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Greve T, Christensen P (2005): Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 63:2006-2019.
2. Britt JH, Almond GW, Flowers WL (1999): Diseases of the reproductive system. In: Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D (eds), *Diseases of Swine*, 8th edn. Blackwell Science Ltd, Ames, IA, p. 905.
3. Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, Bailey JL (2004): Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* 62: 874-886.
4. Huo LJ, Ma XH, Yang ZM (2002): Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long term storage. *Theriogenology* 58:1349-1360.
5. Johnson LA, Weize KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
6. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle IS (2002): Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43:49-55.
7. Marco DA, Juan B, Fernando S, Ignacio C, Anders J, Margarteta W, Magnus A, Heriberto R (2006): Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and

- chromatin integrity of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology* 29:543-552.
8. Maxwell WMC, Johnson LA (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
 9. Vyt P, Maes D, Dejonckheere E, Castryck F, Van Soom A (2004): Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reproduction in Domestic Animals* 39:8-12.
 10. 김인철 (2005): 돼지 인공수정 현황과 발전방안. 농촌진흥청 축산연구소. pp 8-25.
(접수일자: 2011. 8. 17 / 채택일자: 2011. 8. 24)