

## Trehalose에 의하여 동결 건조된 정자의 돼지 난자 내 직접주입 후 체외 배발달

강화형 · 이지웅 · 강만중 · 김광현 · 문승주<sup>†</sup>

전남대학교 동물자원학부

### *In Vitro* Development of Porcine Oocytes Following Intracytoplasmic Injection of Freeze-Dried Spermatozoa with Trehalose

Hwa-Hyung Kang, Ji-Woong Lee, Man-Jong Kang, Kwang-Hyun Kim and Seung-Ju Moon<sup>†</sup>

Department of Animal Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

#### ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate the effects of trehalose as a cryoprotectant for porcine freeze-dried spermatozoa, to find the optimal freeze-drying time and storage periods of freeze-dried spermatozoa, and to find out pronuclear formation rates, cleaved rates, and embryo development through intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa on porcine oocytes. The survival rates of spermatozoa after freeze-drying with trehalose treatment were significantly higher than those of them without trehalose treatment ( $p < 0.05$ ). The highest survival rates were found at 75 mM trehalose treatment. The longer storage periods after freeze-drying seemed to have a lower survival rates. Development in culture of pig by ICSI with trehalose treatment were significantly higher than those of them without trehalose treatment ( $p < 0.05$ ). Shorter freeze-drying time of spermatozoa was resulted in the highest cleaved rates and embryo development.

(Key words : trehalose, porcine, freeze-dried spermatozoa, survival rates of spermatozoa, cleaved rates, and embryo development)

#### 서 론

Polge와 Rowson(1952)이 소 정자를 동결 보존하는데 성공함으로써 오늘날 대부분의 가축에서 동결 정액이 실용화되어 경제 형질이 우수한 가축 개량과 보존에 활용되고 있다. 그러나 동결 정액 제조와 보존 시 고도의 기술과 비용이 발생하여, 정액을 동결시킨 후 동결 건조기에 건조시켜 분말 상태로 제조한 정자의 동결 건조 기술이 동물 개량과 새로운 유전자원 유지 방법으로 많은 연구자들에 의해 연구되고 있다. Sherman(1954)은 사람의 정자를 동결 건조한 결과를 보고하였고, Uehara와 Yanagimachi(1976)는 실험동물인 햄스터를 이용하여 동결 건조 정자를 연구하였으며, Katayose 등(1992)도 추가 연구를 통하여 햄스터 동결 건조 정자의 이용 가능성을 확인하였다. 또한 Hoshi 등(1994)은 토끼, 그리고 Ward 등(2003) 및 Kaneko 등(2003)은 mouse 동결 건조 정자에 대해 보고하였으며, 소 정자의 동결 건조 연구(Keskintepe 등, 2002)와 돼지 정자의 동결 건조 연구(Kwon 등, 2004)등이 보고되어 산

업동물 정자 동결 건조의 새로운 가능성을 제시하였다.

정자의 동결 보존이나 동결 건조 보존 시 동결을 최소화하기 위해 사용되는 동결 보호제에 관한 연구는 최초로 닭 정자의 동결 시 glycerol의 효과를 보고(Polge 등, 1949)한 후, 동결 보호제에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 동결 보호제는 동결 시 세포내로 침투하여 세포 용적의 변화를 감소시키고, 세포내 빙정 형성을 감소시키는 침투성 동결 보호제와 동결 전 세포내 탈수를 용이하게 하여, 동결 시 세포 손상을 줄여주는 비 침투성 동결 보호제로 구분된다. 비 침투성 동결 보호제로 동물 세포에 무독성인 trehalose는 다른 비침투성 동결 보호제보다  $Ca^{2+}$ 를 억제하고, 정자의 두부 끝에서 hydrogen과 결합하여 정자막 파괴가 일어나는 것을 보호해 주며, glass matrix를 만들어서 동결 시 형성되는 빙정으로부터 세포를 보호한다. 또한 다른 비침투성 동결 보호제보다 탈수 효과가 높고, 세포의 단백질과 세포막 인지질과 수소 결합을 하여 건조 상태에서도 정자 구조를 유지시키는 정자 보호 효과를 높일 수 있는 장점이 있다(Crowe 등, 1989; Bakas와 Disalvo, 1991;

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : sjmoon@jnu.ac.kr

Aisen 등, 2000).

한편, 정자의 동결 건조는 일반적인 동결 정액 제조 방법에 비해 정자의 수정 능력과 운동성이 떨어지며, ICSI와 같은 특정한 기술이 있어야 수정이 가능하다는 단점이 있지만, 정자 제조비용이 저렴하고, 액체 질소나 드라이아이스 없이 저장과 운반이 가능하다(Kaneko와 Nakagata, 2006)는 장점이 많다. 마우스의 경우, 동결 건조 정자를 난자의 세포질 내에 직접 주입하여 산자 생산을 보고하고 있으나(Ward 등, 2003), 산업 동물인 돼지나 소의 경우, 산자 생산에 성공했다는 보고는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 돼지 정자 동결 건조 시 동결 보호제인 trehalose의 효과와 동결 건조 후 냉장 보관 기간에 따른 동결 건조 정자의 생존율과 난자의 세포질 내 직접 주입 후 전핵 형성과 동결 건조 시간별로 처리한 동결 건조 정자를 돼지 체외 성숙 난자의 세포질에 직접 주입 시 난할율과 배발달 성적을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 정액의 채취와 희석

정액의 채취는 전남대학교 동물사육장에서 사육 중인 Large White 종으로부터 맨손 채취 방법으로 채취하였고, 채취 즉시 실험실로 운반한 뒤 정액 성상 검사를 실시한 후 5 ml 원정액과 동량의 TL-Hepes-PVA를 혼합 원심 분리(1,200 rpm, 10분) 후 1.5 ml의 마이크로 튜브에 150  $\mu$ l씩 분주, 정자 농도가  $1 \times 10^6$ /ml가 되도록 희석하였다.

### 2. 정자의 동결 건조와 Rehydration

1.5 ml의 마이크로 튜브에 분주된 정자는 액체 질소에서 약 20초간 동결시킨 후, 마이크로 튜브 뚜껑을 열고, parafilm으로 입구를 봉하여 주사침으로 수분의 통로를 만들고,  $-80^{\circ}\text{C}$ 로 조절된 동결 건조기에서 각각 4시간, 12시간 그리고 24시간 동안 동결 건조시킨 다음 냉장 보관( $4^{\circ}\text{C}$ )하였으며, 동결 건조 정자에 150  $\mu$ l의 mili-Q water를 혼합하여 rehydration하였다.

### 3. 정자의 염색과 검사

에탄올과 에테르 혼합액(2:1)으로 슬라이드를 세척하여 건조시킨 슬라이드에 정자를 충분히 도포한 뒤, 20분간 건조시킨 후 Carnoy's solution에서(methanol:acetic acid=3:1) 2~24시간 동안  $\text{CO}_2$  배양기( $39^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ )에서 고정하였으며, acridine orange 0.1g에 0.1% 증류수를 혼합한 acridine orange stock solution 10 ml에 0.1 M citric acid 40 ml와 0.3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 ml를 혼합한 염색약을 슬라이드에 도포하여 염색하였다. 정자 염색 후, 형광 현미경(Nickon, Japan) 하에서 녹색 빛

을 나타내는 정자를 생존한 정자로, 붉은 빛을 나타내는 정자를 죽은 정자로 판단 조사하였다 (Tejada 등, 1984).

### 4. 미성숙 난포란의 채취

도축장에서 도살 직후 난소를 적출하여 생리식염수가 들어 있는 보온병에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하였고, 난소를 생리식염수로 3~4회 세척한 후, 18-G 주사 바늘이 부착된 10 ml 주사기를 이용하였으며, 난포 직경이 3~6 mm인 난포를 흡입하여 난포란을 채취하였다. 채취된 난포란은 실험 현미경하에서 난구 세포의 부착이 견실하고, 세포질이 충실한 것만을 선별 사용하였다.

### 5. 미성숙 난포란의 체외 성숙

미성숙 난포란의 체외 성숙용 배양액은 NCSU-23을 사용하였으며, 4 well dish에 각 well당 배양액 500  $\mu$ l를 분주하고, 미성숙 난포란 50개씩을 넣고, 배양시켰다( $39^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). 배양 시간은 22시간 동안 호르몬이 첨가된 배양액에서 배양한 후, 다시 22시간 동안 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서 배양하여 총 44시간 동안 배양하여 체외 성숙을 유기하였다.

### 6. ICSI

체의 성숙 후 난자는 0.1% hyaluronidase를 사용하여 난구 세포를 제거한 후, 세포질이 균질한 난자를 선별하여 사용하였으며, 정자 주입용 microinjection pipette은 내경 6~7  $\mu\text{m}$ , 난자 고정용 holding pipette은 내경 10~15  $\mu\text{m}$ 로 제작하여 사용하였다. 체외 성숙 난자의 세포질 내 정자의 주입은 micro-manipulator가 부착되어 있는 도립 현미경(Nickon, Japan)하에서 동결 건조 정자 한 마리를 입용 피펫으로 흡입하여, 성숙된 난자의 제 1극체가 6시 또는 12시 방향으로 향하게 하고, 고정용 피펫으로 난자를 고정시킨 다음, 정자 주입용 피펫을 고정된 난자의 3시 방향에서 난자의 세포질 속으로 진입시켰다. 그 후 세포질 내용물을 소량 흡인하여 흡인된 세포질의 내용물과 함께 동결 건조 정자를 세포질 내에 주입시켰다.

### 7. 난할율과 배발달을 조사

ICSI 후 10% FBS가 혼합된 NCSU-23 배양액에서 체외 배발달을 유기하였으며, 난할율과 배발달율을 조사하였다.

### 8. 실험 설계

본 연구의 실험 설계는 다음과 같다. 실험 1은 정자의 동결 건조 시 동결 보호제인 trehalose를 각각 25 mM, 75 mM, 125 mM로 처리하여 24시간 동안 동결 건조한 정자를 1, 3, 6개월 동안 냉장 보관한다. 그 후 정자의 생존율과 ICSI 후 전핵 형성을 조사하였고, 실험 2는 정자의 동결 건조 시간을 각각 24시

간 12시간, 4시간 처리하고, ICSI 후 배발달 성적을 조사하였다.

9. 통계 처리

3회 이상 반복 실험을 실시한 본 연구 결과의 통계 처리는 SAS package를 이용하여 분산 분석(ANOVA)을 실시한 후, Duncan의 다중 검정법에 의하여 처리구간 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 동결 건조 후 정자의 생존율

동결 방지제인 trehalose를 각각 25 mM, 75 mM 그리고 125 mM을 첨가하여 동결 건조 후, 1개월, 3개월 그리고 6개월 동안 냉장보관하면서 동결 건조 정자의 생존율을 정자의 형태적 특징을 효과적으로 조사할 수 있는 acridine orange(AO) 염색법으로 조사하였다. 염색 후 형광 현미경하에서 관찰하여 Fig. 1의 C와 같이 정자 두부가 녹색으로 염색되면 생존 정자, 빨간색으로 염색되면 죽은 정자(Fig. 1D)로 판정하였다(Tejada 등, 1984). AO 염색법으로 비교한 결과는 Fig. 2에 제시한 바와 같이, trehalose 무첨가구에 비해 trehalose를 첨가한 처리구에서 높은 생존율을 보였으며, trehalose를 75 mM 첨가하여 동결 건조한 정자들의 생존율이 가장 높은 것으로 나타났다. 또한, 저장 기간이 길어질수록 생존율이 낮아지는 경향이 있었지만, trehalose 75 mM를 첨가한 구에서는 저장 기간과 상관없이 높은 생존율을 보였으나, 처리구 간의 유의적 차이는 없었다( $p < 0.05$ ). 이와 같이 정자 동결 건조 시 trehalose와 같은 동결 방지제를 첨가하지 않는 경우, 정자 생존율이 낮은

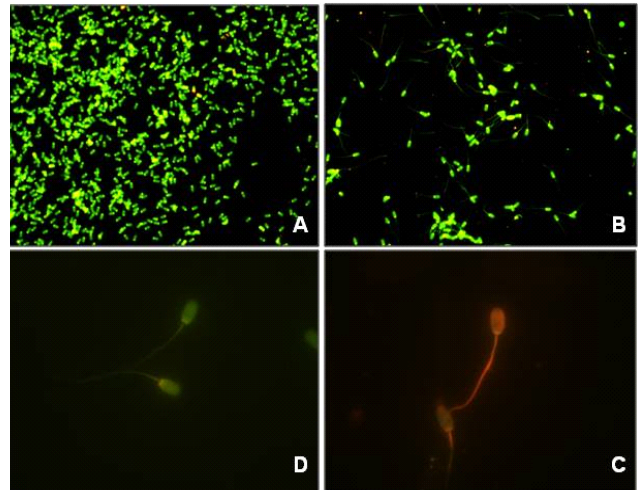


Fig. 1. Fluorescence micrographs of spermatozoa. (A) porcine fresh spermatozoa by acridine orange staining, (B) porcine freeze-dried spermatozoa by acridine orange staining, (C) live sperm, (D) dead sperm

이유는 정자의 DNA와 acrosome 등이 동결 건조 과정 동안 큰 손상을 입기 때문(Kusakabe 등, 2001)이라 생각된다.

한편, Martins 등(2007)은 소정자 동결 시 정자의 DNA 손상은 0.5%이고, 소 정자를 동결 건조할 때 정자의 DNA 손상은 4%, 그리고 0.2 M trehalose를 첨가하여 소 정자를 동결 건조시킬 때 손상율은 2%, EGTA를 첨가한 소 동결 건조 정자의 손상율이 1% 정도라고 보고하고 있어, 본 연구의 생존율의 결과가 다른 연구자들의 결과보다 낮았는데, 이는 동물종의 차이 때문이라고 생각된다.

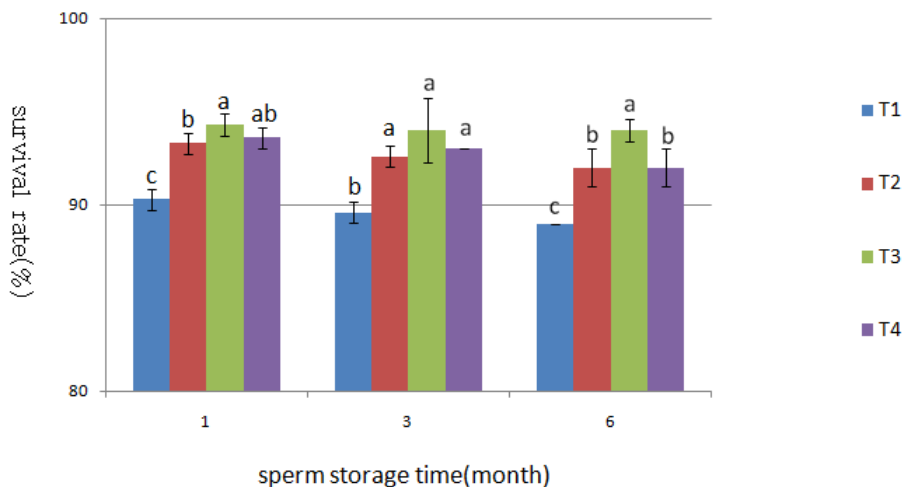


Fig. 2. Survival rates of pig freeze-dried spermatozoa for various trehalose concentrations and storage periods. T1 : HEPES with 10% FBS, T2 : HEPES with 10% FBS and 25 mM Trehalose, T3 : HEPES with 10% FBS and 75 mM Trehalose, T4 : HEPES with 10% FBS and 125 mM Trehalose. <sup>a-c</sup> Percentages with different superscripts are significantly different( $p < 0.05$ ).

### 2. 동결 건조 정자 ICSI 후 전핵 형성을

Table 1은 농도별로 trehalose를 첨가하여 24시간 동안 동결 건조한 정자를 난자에 직접 주입한 뒤 전핵 형성은 Table 1과 같다. 동결 처리하지 않고 신선 정자를 난자에 직접 주입한 대조구의 전핵 형성은 64.5%로 처리구보다 유의적으로 높았으며( $p<0.05$ ), trehalose 무 첨가구의 전핵 형성은 17.1%로 trehalose 첨가구의 전핵 형성율보다 유의적으로 낮은 결과를 보였다( $p<0.05$ ). 또한 trehalose 첨가구에서 각각 36.6%(T2), 33.3%(T3), 35.4%(T4)로 전핵 형성은 처리구간 유의적 차이가 나타나지 않았다. Martine 등(2007)이 보고한 0.2 M trehalose를 처리한 후 동결 건조시킨 소 정자를 난자 내에 직접 주입 한 뒤 전핵 형성은 45.0%와 Keskinetepe 등(2002)이 보고한 소 동결 건조 정자를 난자 내 직접 주입한 뒤 전핵 형성이 56.0%라는 보고보다 본 연구 결과가 낮은 경향을 보였는데, 이는 동물종의 차이 때문이라고 생각된다. 한편, 24시간 동안 동결 건조한 돼지 동결 정자를 난자 내 직접 주입 후 전핵 형성이 16.7%라고 한 Kwon 등(2004)의 결과보다 본 연구 결과가 높은 전핵 형성을 보였다.

### 3. 정자 직접 주입(ICSI) 후 난할율과 배발달 성적

Table 2는 농도별로 trehalose를 첨가하여 24시간 동안 동결 건조한 정자를 난자에 직접 주입 후 난할율과 배발달 성적을 보여주고 있다. 동결 건조 처리하지 않은 신선한 정자를 난자에 직접 주입한 대조구는 처리구보다 유의적으로 높은( $p<0.05$ ) 난할율과 배발달율을 보였으며, trehalose 첨가구는 난할율과 배발달율 모두다 trehalose 무첨가구에 비하여 유의적으로 높았으며( $p<0.05$ ) 상실배 이상의 배발달은 대조구와 처리구 모두에서 나타나지 않았다.

Table 1. Pronuclear formation of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa

Treatment*	No. of oocytes examined	1PN	2PN	3PN
Control	31	6(19.3) <sup>c</sup>	20(64.5) <sup>a</sup>	0(0.0)
T1	35	18(51.4) <sup>a</sup>	6(17.1) <sup>c</sup>	0(0.0)
T2	30	9(30.0) <sup>bc</sup>	11(36.6) <sup>b</sup>	0(0.0)
T3	27	10(37.0) <sup>ab</sup>	9(33.3) <sup>b</sup>	0(0.0)
T4	31	10(32.2) <sup>abc</sup>	11(35.4) <sup>b</sup>	0(0.0)

<sup>a-c</sup> Percentages with different superscripts are significantly different( $p<0.05$ ).

\* T1 : HEPES with 10% FBS.

T2 : HEPES with 10% FBS and 25 mM Trehalose.

T3 : HEPES with 10% FBS and 75 mM Trehalose.

T4 : HEPES with 10% FBS and 125 mM Trehalose.

농도별로 trehalose를 첨가하여 12시간 동안 동결 건조한 정자를 난자에 직접 주입한 뒤, 난할율과 배발달 성적은 Table 3과 같다. Table 2와 같이 대조구가 처리구에 비해 유의적으로 높은 난할율과 배발달율을 보였으며( $p<0.05$ ), 처리구의 경우, 125 mM trehalose 첨가구(T4)의 난할율이 50%로 다른 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다( $p<0.05$ ). 또한 상실배까지 제외 발달 성적은 trehalose 무첨가구에서 나타나지 않았으나, trehalose 첨가구에서는 10%의 발달율을 보였다.

4시간 동안 동결 건조한 정자를 난자에 직접 주입한 뒤 난할율과 배발달율(Table 4) 또한 처리구에서 유의적으로 낮은 난할율과 배발달율을 보였으며( $p<0.05$ ), 125 mM trehalose를

Table 2. Development in culture of pig by ICSI using spermatozoa freeze-dried under various trehalose concentrations for 24 hour

Treatment*	No. of oocytes examined	No(%) of cleaved oocytes at 48h	No(%) of embryos that developed to			
			48 h			120 h
			2 cell	4 cell	8 cell	Morular
Control	117	81(69.0) <sup>a</sup>	51(43.5) <sup>a</sup>	20(17.0) <sup>a</sup>	10(8.5) <sup>a</sup>	0(0.0)
T1	103	18(17.4) <sup>c</sup>	9( 8.7) <sup>b</sup>	9( 8.7) <sup>b</sup>	0(0.0) <sup>c</sup>	0(0.0)
T2	117	46(39.3) <sup>b</sup>	36(30.7) <sup>a</sup>	10( 8.5) <sup>b</sup>	0(0.0) <sup>c</sup>	0(0.0)
T3	95	30(31.5) <sup>bc</sup>	28(29.4) <sup>a</sup>	2( 2.1) <sup>b</sup>	0(0.0) <sup>c</sup>	0(0.0)
T4	108	39(36.1) <sup>bc</sup>	28(25.9) <sup>ab</sup>	6( 5.5) <sup>b</sup>	5(4.6) <sup>b</sup>	0(0.0)

<sup>a-c</sup> percentages with different superscripts are significantly different( $p<0.05$ ).

\* T1 : HEPES with 10% FBS.

T2 : HEPES with 10% FBS and 25 mM Trehalose.

T3 : HEPES with 10% FBS and 75 mM Trehalose.

T4 : HEPES with 10% FBS and 125 mM Trehalose.

Table 3. Development in culture of pig by ICSI using spermatozoa freeze-dried under various trehalose concentrations for 12 hour

Treatment*	No. of oocytes examined	No(%) of cleaved oocytes at 48h	No(%) of embryos that developed to			
			48 h			120 h
			2 cell	4 cell	8 cell	Morular
Control	34	24(71.0) <sup>a</sup>	14(41.1) <sup>a</sup>	8(23.5) <sup>a</sup>	2(5.8) <sup>a</sup>	1( 2.9) <sup>ab</sup>
T1	31	9(29.0) <sup>d</sup>	9(29.0) <sup>a</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>	0(0.0) <sup>a</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>
T2	32	13(40.6) <sup>bc</sup>	11(34.3) <sup>a</sup>	1( 3.1) <sup>b</sup>	1(3.1) <sup>a</sup>	2( 6.2) <sup>ab</sup>
T3	27	9(33.3) <sup>cd</sup>	8(29.6) <sup>a</sup>	1( 3.7) <sup>b</sup>	0(0.0) <sup>a</sup>	2( 7.4) <sup>ab</sup>
T4	30	15(50.0) <sup>b</sup>	11(36.6) <sup>a</sup>	4(13.3) <sup>cb</sup>	0(0.0) <sup>a</sup>	3(10.0) <sup>a</sup>

<sup>a~d</sup> percentages with different superscripts are significantly different( $p<0.05$ ).

\* T1 : HEPES with 10% FBS.

T2 : HEPES with 10% FBS and 25 mM Trehalose.

T3 : HEPES with 10% FBS and 75 mM Trehalose.

T4 : HEPES with 10% FBS and 125 mM Trehalose.

첨가하여 동결 건조시킨 정자를 난자에 주입 시 58.0%의 높은 난할율을 보였다( $p<0.05$ ). 또한 trehalose 무첨가구(T1)의 난할율은 32.3%로 25 mM(50.0%), 75 mM(56.2%), 125 mM(58.0%) trehalose 첨가구보다 유의적으로 낮았으며( $p<0.05$ ), 상실배까지 발달율은 대조구에서 6%로 처리구에 비하여 유의적으로 높았고( $p<0.05$ ), trehalose 무첨가구가 trehalose 첨가구보다 유의적으로 낮은 결과를 보였다( $p<0.05$ ).

이와 같이 동결 건조 시간이 길수록 난할율과 배발달 성적이 낮은 이유는 오랜 시간 동결 건조하는 동안 정자의 형태와 구조뿐만 아니라, ICSI 후 난자의 활성화에 영향을 미치고, 동결 건조 과정 시 발생하는 정자 내 수분의 과도한 건조때문(Wakayama와 Yanagimachi 등, 1998)이라고 판단되며, trehalose 무

첨가구의 난할율과 배발달율이 trehalose 첨가구의 난할율과 배발달율보다 모두 낮은 결과를 나타냈는데, 이는 동결 방지제인 trehalose의 역할 때문이라고 사료된다. Kwon 등(2004)이 돼지 동결 건조 정자를 난자의 세포질 내 직접 주입 시 상실배와 배반포배 발달율이 각각 26.4%와 16.5%라고 보고하였는데, 본 연구 결과보다 높은 수준이었다. 본 연구에서 배발달율이 낮은 이유는 동결 건조 과정 동안 정자막이 화학적 변화를 받고(Szczygiel 등, 2003), 동결 건조 정자의 nuclear matrix가 수정란의 발달에 나쁜 영향을 미치며, 동결 건조 후 비정상적인 염색체를 갖는 정자의 비율이 높기 때문(Ward 등, 2003)이라고 생각된다.

한편, Martins(2007)의 보고에 의하면, 소 정자를 동결 건조

Table 4. Development in culture of pig by ICSI using spermatozoa freeze-dried under various trehalose concentrations for 4 hour

Treatment*	No. of oocytes examined	No(%) of cleaved oocytes at 48h	No(%) of embryos that developed to			
			48 h			120 h
			2 cell	4 cell	8 cell	Morular
Control	29	23(79 ) <sup>a</sup>	12(41.3) <sup>ab</sup>	6(20.6) <sup>a</sup>	5(17.2) <sup>a</sup>	6(20.6) <sup>a</sup>
T1	34	11(32.3) <sup>c</sup>	8(23.5) <sup>b</sup>	3( 8.8) <sup>a</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>c</sup>
T2	30	15(50.0) <sup>b</sup>	12(40.0) <sup>ab</sup>	3(10.0) <sup>a</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>	1( 3.3) <sup>bc</sup>
T3	32	18(56.2) <sup>b</sup>	15(46.8) <sup>a</sup>	3( 9.3) <sup>a</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>	2( 6.2) <sup>bc</sup>
T4	31	18(58.0) <sup>b</sup>	15(48.3) <sup>a</sup>	2( 6.4) <sup>a</sup>	1( 3.2) <sup>b</sup>	3( 9.6) <sup>b</sup>

<sup>a~c</sup> percentages with different superscripts are significantly different( $p<0.05$ ).

\* T1 : HEPES with 10% FBS.

T2 : HEPES with 10% FBS and 25 mM Trehalose.

T3 : HEPES with 10% FBS and 75 mM Trehalose.

T4 : HEPES with 10% FBS and 125 mM Trehalose.

시켰을 때, 0.2 M trehalose와 EGTA의 첨가가 정자의 구조와 핵의 손상을 효과적으로 피했으며, 동결 건조 정자를 난자에 직접 주입 시 난할율은 동결 보호제 무첨가 시 50.2%와 첨가 시에 57.7%로 동결 보호제의 첨가 시 더 높은 난할율을 보여, 동물종은 다르지만 본 연구 결과와 유사한 경향이였다.

본 연구에서 동결 보호제로 사용한 trehalose는 2당류이고, 동물 세포에 무독성이며, 분자량이 커서 세포의 동결 보호제로 단독이나 다른 동결 보호제와 혼합하여 동결 보호제로 이용하고 있다. Crow 등(1987)에 의해 동물과 식물에서 동결과 탈수에 대응하는 물질로 발견된 trehalose는 세포의 단백질과 세포막 인지질과 수소 결합을 하여 세포의 구조를 유지시켜 건조 상태가 되어도 세포를 보존한다고 알려져 있으며, 동결 시 형성되는 빙정으로부터 세포를 보호하고, 당류보다  $Ca^{2+}$ 를 억제하며, 정자의 두부에서 hydrogen과 결합하여 정자막 파괴가 일어나는 것을 보호해 주는(Bacas, 1991) 등 동결 보호제로서의 장점이 많아, 다양한 관련 연구와 산업동물 정자의 동결 건조 후 생존율과 ICSI 후 배발달을 개선을 위한 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

## 적 요

본 연구는 돼지 정자의 동결 건조 시 동결 보호제인 trehalose의 효과와 동결 건조 시간과 동결 건조 후 저장 기간에 따라 정자의 생존성과 체외 성숙 난자 내 동결 건조 정자를 직접 주입한 후 전핵 형성을, 난할율 그리고 배발달 성적을 조사하였다. 동결 건조 후 정자의 생존율은 trehalose 무첨가구에 비해 trehalose를 첨가한 처리구에서 높은 생존율을 보였으며, 75 mM의 trehalose를 첨가하여 동결 건조한 정자들의 생존율이 가장 높은 것으로 나타났다. 또한, 동결 건조 후 저장 기간이 길어질수록 생존율이 낮아지는 경향이였다. 체외 성숙 난자 내 동결 건조 정자를 직접 주입 후 전핵 형성은 trehalose 첨가구에서 유의적으로 높았으며( $p < 0.05$ ), 난할율과 배발달 성적도 trehalose 첨가구에서 유의적으로 높았으며( $p < 0.05$ ), 정자의 동결 건조 시간이 짧을수록 높은 난할율과 배발달율을 보였다.

## 참 고 문 헌

- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A and Garde JJ. 2000. Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53(5): 1053-1061.
- Bakas LS and Disalvo EA. 1991. Effect of  $Ca^{++}$  on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 28: 347-353.
- Crowe J, Carper J, Crowe L and Anchoroguy J. 1989. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solute with biomolecules. *Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents*. 20th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol.
- Hoshi K, Yanagida K, Katayose H and Yazawa H. 1994. Pronuclear formation, and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei. *Zygote* 2: 237-242.
- Kaneko T and Nakagata N. 2006. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology* 53(2):279-82.
- Kaneko T, Whittingham DG and Yanagimachi R. 2003. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 68:136-139.
- Katayose H, Matsuda J and Yanaginachi R. 1992. The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biol. Reprod.* 24:517-520.
- Keskintepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, Norris K, Curuk MA, Khan I and Brackett BG. 2002. Bovine blastocyst development from oocytes injection with freeze-dried spermatozoa. *Biol. Reprod.* 67: 409-145.
- Kimura Y and Yanagimachi R. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 52: 709-720.
- Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG and Yanagimachi R. 2001. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Poc. Natl. Acad. Sci.* 98: 13501-13506.
- Kwon IK, Park KE and Niwa K. 2004. Activation, pronuclear formation, and development *in vitro* of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol. Reprod.* 71(5): 1430-1436.
- Martins CF, Bão SN, Dode MN, Correa GA and Embrapa RR. 2007. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Genetics Resources and Biotechnology.*
- Martins CF, Dode MN, Bão SN and Embrapa RR. 2007. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Rumpf, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.* 94-104.
- Polge C and Rowson LEA. 1952. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at  $-79^{\circ}C$ . *Nature.* 169, 626-627.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. 1949. Revival of sperma-

- tozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- Sherman JK. 1954. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 5: 357.
- Szell A and Schelton JN. 1986. Role of equilibrium before rapid freezing of mouse embryo. *J. Reprod. Fert.* 78: 699-703.
- Szczygiel MA, Kusakabe H, Yanagimachi R and Whittingham DG. 2002. Intracytoplasmic sperm injection in mouse efficient than *in vitro* fertilization for generating mouse embryos from cryopreserved spermatozoa. *Biol. Reprod.* 67: 1278-1284.
- Szczygiel MA, Moisyadi S and Ward WS. 2003. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. *Biol. Reprod.* 68: 1903-1910.
- Takehito K and David G. 2003. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. Whittingham and Ryuzo Yanagimachi, *Biology of Reproduction* 68(1): 136-139.
- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marick JJ and Friedman S. 1984. A test for the practical evaluation of male fertility acridine orange(A.O.) fluorescence. *Fertil. Steril.* 42:87-91.
- Uehara T and Yanagimachi R. 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.* 15: 467-470.
- Wakayama T and Yanagimachi R. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat. Biotech.* 16: 639-641.
- Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG and Yanagimachi R. 2003. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biology of Reproduction* 69(6): 2100-2108.

---

(접수: 2014. 1. 7/ 심사: 2014. 1. 7/ 채택: 2014. 3. 25)