

## 두록의 동결정액의 운동학적 특성과 ESR1 유전자의 SNP(*g.35756T>C*)와 연관성 분석

조은석\* · 김기현\* · 우제석\* · 이미진 · 고준호 · 김영주 · 사수진†

농촌진흥청 국립축산과학원

### Association with Post-Thawed Semen Motility and Kinematic Characteristics of *g.35756 T>C* on Estrogen Receptor 1 (ESR1) Gene in Duroc Pigs

Eun-Seok Cho\*, Ki-Hyun Kim\*, Jae-Seok Woo\*, Mi-Jin Lee, Jun-Ho Ko, Young-Ju Kim and Soo-Jin Sa†

National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

#### ABSTRACT

Cryopreservation of boar semen is continually researched in reproductive technologies and genetic resource banking in breed conservation. For evaluating the boar semen quality, sperm motility (MOT) is an important parameter because the movement of spermatozoa indicates active metabolism, membrane integrity and fertilizing capacity. Various researches have been trying to improve the quality of semen Post-thawed in boar. Recently, polymorphism (*g. 35756 T>C*) of Estrogen Receptor 1 (ESR1) gene reported to be significant association with MOT. This study was conducted to evaluate the ESR1 gene as a positional controlling for motility and kinematic characteristics of post-thawed boar semen. To results, The *g.35756 T>C* SNP of ESR1 was significantly associated with frozen semen motility and kinematic characteristics. The *g.35756 T>C* SNP was high significantly associated with MOT, VCL, VSL and VAP ( $p<0.001$ ). The SNP was also significantly associated with ALH ( $P<0.05$ ). Therefore, we suggest that the *g. 35756 T>C* polymorphism in the intron 1 region of the porcine ESR1 gene could potentially be applied in frozen semen programs to improve MOT trait, but only after validation in other populations.

(Key words: estrogen receptor 1, boar semen quality, polymorphism)

#### 서 론

인공수정은 자연 교배와 달리 질병의 위험을 최소화 하여 우수한 유전자를 전달할 수 있는 아주 유용한 기술이다(Maes *et al.*, 2008). 인공수정을 하기 위해서는 정액이 필요한데, 정액의 제조방법에 따라 액상정액과 동결정액으로 나뉘어진다. 현재 우리나라의 95% 이상은 액상정액을 사용하고 있다. 동결정액의 경우, 가격과 주입시간, 주입정자수, 주입횟수, 개체에 따른 동결성 및 품종, 동결보존기간, 동결보존 형태 등 쉽게 결정할 수 있는 판단이 어려웠기 때문이다. 하지만 이러한 이유에도 불구하고 질병전염과 탄력적으로 대처할 수 있는 돈군 운영과 동시에 비용대비 높은 유전능력의 확보로 액상정액을 대처하려고 하는 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 동결정액의 방법은 현재까지 지속적으로 개발되면서 현재의 동결방

법으로 개발되었다(Johnson, 1998). 그러나 여전히 수태율이 현저하게 떨어지면서 사용량이 극히 한정되었다. 특히 돼지의 동결정액은 다른 가축에 비해 상대적으로 내동성이 떨어진다. 돼지의 정액은 다른 가축과 달리 정자의 세포막에 불포화지방산이 높아 낮은 온도에 매우 민감하다. 그래서 정액의 운동성은 매우 감소하고, 이에 따라 수태율도 현저하게 떨어진다(Mazur, 1984). 최근에는 유전자 변이에 따라 정액의 내동성을 판별하고, 돼지의 동결정액 품질을 향상시키고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다(Gunawan *et al.*, 2012; Kaewmala *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2014; Diniz *et al.*, 2014).

최근 Estrogen Receptor 1(ESR1) 유전자의 35756번째 염기가 T에서 C로 변이가 일어남에 따라 정액 품질에 변화가 있다는 논문이 보고되었다(Gunawan *et al.*, 2012). ESR1 유전자는 호르몬 결합, DNA 결합 및 전사의 활성화에 관하여 중요한 몇

This work was supported by Grant No. PJ01094002 from Rural Development Administration, Republic of Korea; and the 2015 Post-doctoral Fellowship Program of the Rural Development Administration, Republic of Korea.

\* These authors contributed equally to this paper.

† Correspondence : soojinsa@korea.kr

몇 도메인들로 구성된 리간드 활성 전사 인자로 에스트로겐 수용체가 부호화된 것이다. ESR1 결핍 쥐에서 수컷의 번식력이 손상됨이 입증되어(Eddy *et al.*, 1996) 웅성번식기관에서 에스트로겐의 역할에 관하여 관심이 증가되었다. 웅성 번식기관의 다른 조직들에서 ESR1의 흔적은 정자형성과정 및 정자 성숙에서 생리학적인 역할을 한다고 제안하였다. ESR1 knockout 시킨 쥐는 정상적으로 정자형성과정을 유지함으로 에스트로겐의 중요한 역할을 제시하는데 상당한 증거가 되었다(Eddy *et al.*, 1996). ESR1는 정소에서 정자가 정소상체 저장되는 동안에 정자의 생존 및 성숙에 관하여 중요한 정소상체 두부까지 정자가 이송되는 동안에 luminal fluid의 재흡수에 관여했다(Couse and Korach, 1999). 또한 ESR1의 부재는 정소상체 정자의 함량을 감소시키며, 정자 운동성 및 번식능력을 감소시키는 것을 이끌었다(Eddy *et al.*, 1996). 최근 연구들은 인간에서 ESR1이 정액의 품질 및 번식력과 상당한 연관성을 보였다(Suzuki *et al.*, 2002; Lazaros *et al.*, 2010; Safarinejad *et al.*, 2010). Suzuki는 남자의 무정자증 또는 극심한 정자감소증과 연관된 2가지 ESR1 polymorphism을 보고했다(Suzuki *et al.*, 2002). ESR1의 mRNA는 rat에서 정소상체, 정소, 뇌하수체, 자궁, 신장 및 부신에서 높게 발현된 것을 보고했다(Kuiper *et al.*, 1996). 돼지에서 SSC1p24-25에 위치한 ESR1는 사출정액 당 총 정자의 관한 QTL(quantitative trait loci) 영역으로써 증거가 되며, 정자 운동성의 관한 QTL과 관련이 있었다(Xing *et al.*, 2008). 그러므로, ESR1는 돼지의 웅성 번식에 관한 위치상 후보유전자일뿐만 아니라, 기능적인 후보유전자라 할 수 있다. 하지만 수태지 정자의 품질 및 번식형질과 ESR1의 연관성을 보는 것에 대한 연구는 아직 없었다.

따라서 본 연구에서는 돼지의 정액과 관련성인 높을 것이라고 판단되어지는 ESR 유전자의 유전적 다형성을 확인하여 유전자형을 분석하였고, 본 연구에서 사용된 동결정액의 운동성 및 운동학적 형질과의 연관성 분석을 하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 정액 채취

수태지들은 한국 농촌진흥청 국립축산과학원에서 균등한 먹이 및 취급 조건들에서 사육되었다. 본 연구에서 모든 정액은 2011년에서 2015년까지 1.5~2년생의 성숙한 수태지들로부터 수압법에 의해 채취되었다. 본 연구에서는 정자의 운동성이 80% 이상이고, 정상적인 형태의 정자가 80% 이상인 사출정액만을 이용했다. 채취 후 사출된 정액은 젤리형태의 물질들을 제거하기 위해 필터페이퍼를 이용하여 필터하여 37°C BTS(Beltsville thawing solution)와 1 : 1 비율로 희석시킨 뒤 신속히 실험실로 옮겼다.

### 2. 동결정액 제조

정액 동결보존하기 전에, 정액 샘플들은 24시간동안 17°C에서 보관되었다. 액상정액이 17°C에서 보관된 후에 17도에서 15분 동안 800 ×g로 원심분리했다. 원심분리 후, 상층액은 진공펌프를 사용하여 조심스럽게 제거하여 정자 펠렛만을 남겼다. 정자 펠렛들은 1차 LEY(lactose egg-yolk) 희석제(11% [v/v] β-lactose, 20% [v/v] hen egg yolk)로 최종 정액농도  $1.5 \times 10^9$  cells/ml로 만들기 위해 천천히 희석되었고, 그 다음 1.5 시간 동안 5°C에서 냉각시켰다. 그 뒤에, 정액은 LEY 희석제의 2:1의 비율로 89.5 ml LEY에 9 ml 글리세롤 및 1.5 ml Orvus Es Paste (OEP, Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA)가 함유되어 있는 희석제로 5°C에서  $1 \times 10^9$  cells/ml의 최종 농도로 만들기 위해 조심스럽게 혼합되었다. 정액 샘플들은 filling & sealing machine(IMV, L'Aigle, France)으로 0.5 ml 스트로우(IMV, L'Aigle, France) 포장되었고, 글리세롤 평형을 위해 1시간 동안 5°C에 두었다. 동결하기 위하여, 정액 샘플들은 정액 동결기(SY-LAB Gerate GmbH, Austria)를 사용하여 6분 동안 5°C에서 -5°C까지 냉각시키고, 빙결 형성을 유도하는 동안에 30초 동안 -5°C에 두었다. 그 다음 40분 동안 -5°C에서 -80°C까지 냉각시켰고, 60분 동안 -80°C에서 -150°C에 냉각시켰다. 정액 스트로우는 액체질소에 담가서 보관했다. 스트로우는 분석하기 위하여 용해되기 전까지 액체 질소 탱크에 보관되어졌다. 그 후에 스트로우들은 20초 동안 38°C의 항온수중에 스트로우를 담가서 용해시켰고, 각 스트로우의 내용물들은 즉시 BTS에 1:4(v/v) 비율로 부유시킨 후 정자의 운동성을 평가하기 위하여 30분 동안 38°C에 가온시켰다.

### 3. 정자 운동학적 특성 분석

운동성(MOT, Motility)은 정자자동분석기(CASA, Computer-assisted semen analysis system; SAIS SI-100, Medical Supply, Korea)를 사용하여 객관적으로 평가되었다. 정자 샘플은 BTS로 희석하여  $30 \times 10^6$ 의 농도로 만들어서 검사하였다. 5 μl의 정자 샘플은 pre-wormed markler counting chamber(Sefi-Medical Instruments, Israel)에 두었고, 샘플 당 최소 100마리의 정자를 평가하기 위하여 38°C에서 약 5번 이상 분석하였다. 각 정자 샘플의 전체 운동성(TMS, Total motile spermatozoa, %), 곡선속도(VCL, Curvilinear velocity, um/s), 직선속도(VSL, Straight-line velocity, um/s), 평균이동속도(VAP, Average path velocity), LIN(e.g., the ratio between VSL and VCL), STR(percentage of straightness(e.g., the ratio between VSL and VAP))를 포함하는 운동학적 특성들을 측정했다. 78두에 대한 결과는 Table 1에 제시하였다.

### 4. Genomic DNA 분리 및 유전자형 분석

Table 1. Means, standard deviation (S.D.), sample size, ranges of traits in semen parameters of Duroc boars

Traits	Mean	SD	Min	Max
MOT (%)	31.58	16.19	3.82	89.37
VCL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	52.89	0.19	33.41	16.17
VSL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	25.98	3.38	14.17	56.72
VAP ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	4.43	1.91	20.69	81.74
LIN (VSL/VCL)	26.51	4.16	37.11	77.58
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2.28	0.59	1.14	4.11

Abbreviations: SD, standard deviation; MOT, yielded sperm motility; VCL, curve linear velocity; VSL, straight line velocity; VAP, average path velocity; LIN, linearity; ALH, amplitude of lateral head displacement.

Genomic DNA는 Wizard Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 제조사의 방법을 약간 변형하여 분리하였다(Promega, Madison, WI, USA). Direct sequencing을 위하여 두록돼지 78두의 DNA를 이용하여 PCR(Polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR은 10 pmol의 primer, 0.25 mM dNTP, 10× PCR buffer, 1.25  $\mu$  DNA polymerase(Genet Bio, Chungnam, Korea) 그리고 100 ng의 DNA를 포함하여 20  $\mu$ l의 부피에서 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 30초, 64°C에서 30초 그리고 72°C에서 45초를 수행하였고, DNA Engine Tetrad<sup>®</sup> 2 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 총 35번복으로 PCR을 수행하였다. PCR 수행 후 염기서열 분석을 위하여 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V3.0(Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA)와 ABI PRISM<sup>®</sup> 3730 Genetic Analyzer(Life Technologies Corp.)를 이용하여 염기서열 분석을 하였고, SeqMan program(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 SNP(Sngle nucleotide polymorphism)를 비교하여 유전자형을 결정하였다. 염기서열분석에 이용된 primer는 이전 논문에 나와 있는 5'-GACAGCTCCCTGCAGATTC-3' and 5'-TTCATCATGCCCACTTCGTA-3'를 사용하였다 (Gunawan *et al.*, 2012).

5. 통계 분석

연관성분석은 SAS 9.13(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)

의 generalized linear model(GLM)을 이용하였으며, 유전자형의 효과와 경제형질들에 대해 최소 유의차 검정으로 평균간 차이에 대한 유의성을 조사하였다. 통계분석에 이용한 모형은 다음과 같다.

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + S_j + P_l + e_{ijkl}$$

$y_{ijkl}$ 는 관측치,  $\mu$  전체의 평균,  $G$  유전자형 효과,  $S_j$  성별의 효과,  $P_l$  정액채취기간,  $e_{ijkl}$  임의오차를 나타내며, 유전자형 효과, 성별의 효과, 정액채취기간은 고정효과로 사용되었다. 그리고 유의적 차이는  $P<0.01$ 와  $P<0.05$ 로 표시하였다.

결 과

본 연구에서는 이전에 보고되어 있는 ESR1 유전자의 SNP를 확인하여 유전자형을 분석하고, 두록 78두 동결정액의 운동학적 특성과 연관성을 분석하고자 하였다. PLCz 유전자의 염기서열 분석을 통하여 SNP를 확인한 결과, Fig. 1과 같이 이전 논문과 동일하게 35756번째 염기에서 다형성을 확인할 수 있었다. 두록 78두의 대립유전자와 유전자형의 빈도를 확인한 결과, Table 2와 같이 TT, TC 및 CC 유전자형의 빈도는 각각 0.74, 0.15 그리고 0.11이었다. 그리고 T 대립유전자가(0.82) C 대립유전자(0.18)보다 빈도가 훨씬 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서 확인한 SNP와 두록 78두 돼지 동결정액의 운동학적 특성과 연관성을 비교한 결과, Table 3과 같이 높은 유의성을 보였다. MOT, VCL, VSL 그리고 VAP( $p<0.0001$ ,  $p=0.0003$ ,  $p<$

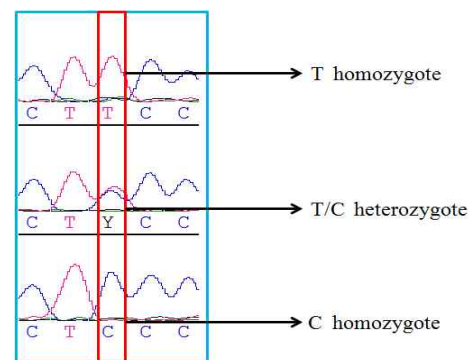


Fig. 1. Sequencing results and polymorphic sites found in the intron 1 region of ESR1 gene in Duroc boars.

Table 2. Allele and genotype frequencies of ESR1 polymorphisms in Duroc boars

SNP position	Genotype frequency (n=78)			Allele frequency	
<i>g.35756T&gt;C</i>	TT (n=58, 0.74)	TC (n=12, 0.15)	CC (n=8, 0.11)	T (0.82)	C (0.18)

The number of genotyped animals and genotype frequency are shown in parentheses.

Table 3. Associations between SNPs of porcine ESR1 and semen parameters

Gene	Traits	Genotype			P-value
		TT (n=58)	TC (n=12)	CC (n=8)	
PLCz	MOT (%)	37.36±1.68 <sup>a</sup>	17.67±3.70 <sup>b</sup>	10.50±4.54 <sup>b</sup>	<.0001 <sup>**</sup>
	VCL (µm/s)	55.83±1.48 <sup>a</sup>	47.67±3.26 <sup>ab</sup>	39.44±4.00 <sup>b</sup>	0.0003 <sup>**</sup>
	VSL (µm/s)	28.13±0.90 <sup>a</sup>	20.05±1.99 <sup>b</sup>	19.32±2.44 <sup>b</sup>	<.0001 <sup>**</sup>
	VAP (µm/s)	38.67±1.17 <sup>a</sup>	28.33±2.57 <sup>b</sup>	25.19±3.15 <sup>b</sup>	<.0001 <sup>**</sup>
	LIN (VSL/VCL)	56.36±1.09	54.35±2.40	57.67±2.94	0.6521
	ALH (µm)	2.36±0.07 <sup>a</sup>	2.24±0.16 <sup>a</sup>	1.76±0.29 <sup>b</sup>	0.0248 <sup>*</sup>

Abbreviations: MOT, Yielded sperm motility; VCL, Curve linear velocity; VSL, Straight line velocity; VAP, Average path velocity; LIN, linearity; ALH, Amplitude of lateral head displacement.

<sup>1</sup> Values are expressed as least squares means and standard errors.

<sup>ab</sup> Least square means with different superscripts in the same row differ.

<sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$ , <sup>\*</sup>  $p < 0.05$ .

0.0001 and  $p < 0.0001$ , 각각)에서 높은 유의성을 보였고, ALH( $p = 0.0248$ )에서는 낮은 유의성을 확인할 수 있었다.

## 고찰

본 연구에서는 PLCz 유전자의 SNP와 동결정액의 운동학적 특성과 연관성을 확인하려고 하였고 그 결과 ESR1 유전자의 g.35756 T>C SNP은 운동성 및 운동학적 특성들의 거의 대부분과 상당한 연관성이 있었고 TT 유전자형을 가진 돼지가 TC 및 CC 유전자형을 가진 돼지보다 대부분의 형질 값들이 더 높았다. g.35756 T>C SNP은 TT 유전자형을 가진 개체에서 상당히 높게 연관되었다( $p < 0.001$ ). Suzuki *et al.* (2002)는 인간의 idiopathic azoospermia(특발성 무정자증)와 연관된 엑손4의 ESR1의 polymorphism을 보고했다. 정자 후침체영역의 ESR1는 male gamete maturation 및 운동성에서 에스트로겐의 역할을 나타냈다(Solakidi *et al.*, 2005). 그것은 국부적으로 생산된 에스트로겐이 정자의 운동성 조절에 관여하는 것으로 보고되었다(Lazaros *et al.*, 2010). ESR1 polymorphism은 정자 운동성에 관한 영향과 함께 국부적으로 작용하는 에스트로겐 수치에 영향을 미칠 수 있다(Carreau *et al.*, 2002). 기형 정자 생산 및 낮아진 번식력은 transgenic male mice lacking ESR1에서 보고되었다(Eddy *et al.*, 1996). Lacking ESR1의 불임은 고환 조직의 진보적인 변성 및 심각하게 손상된 정자형성과정을 유발시키는 축적된 luminal fluids의 증가된 역압에 의한 수출관의 유동적 재흡수 중단 때문인 것으로 주로 보고되었다(Eddy *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 1997; Couse and Korach, 1999). g.35756 T>C에서 확인된 SNP은 현재로서는 기능을 하지 않는 intron 1에 있으며, ESR1의 기본 구조에 변형을 가져올 수 있고,

그것은 mRNA 안정성을 변화시켜서 ESR1의 기능에 영향을 미칠 수 있다(Capon *et al.*, 2004). 게다가, 유전자 및 조직 특이적 발현 패턴의 발현 수준을 조절하는 인트론들의 역할에 관한 보고서들의 수가 증가하고 있다(Pagani *et al.*, 2004). 본 연구의 결과는 두록 돼지의 운동성에 관련하여 높은 유의성을 보였다. 하지만 이러한 연구들이 앞으로 품종 특이적인 효과와 다른 집단 크기에서도 연구들이 고려되어야 할 것이다. 결론적으로 이러한 연구는 돼지의 동결정액의 품질을 결정할 수 있는 기초적인 자료로 활용이 가능할 것이다.

## REFERENCES

- Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN and Trembath RC. 2004. A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Human Molecular Genetics*. 13(20):2361-2368.
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C and Levallet J. 2002. Reproductive system: Aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 193(1): 137-143.
- Chen X, Zhu H, Hu C, Hao H, Zhang J, Li K, Zhao X, Qin T, Zhao K and Zhu H. 2014. Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction*. 147 (3):321-330.
- Couse JF and Korach KS. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endoc-*

- rine Reviews. 20(3):358-417.
- Diniz D, Lopes M, Broekhuijse M, Lopes P, Harlizius B, Guimaraes S, Duijvesteijn N, Knol E and Silva F. 2014. A genome-wide association study reveals a novel candidate gene for sperm motility in pigs. *Animal Reproduction Science*. 151(3):201-207.
- Eddy E, Washburn T, Bunch D, Goulding E, Gladen B, Lubahn D and Korach K. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*. 137(11):4796-4805.
- Gunawan A, Cinar M, Uddin M, Kaewmala K, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C and Schellander K. 2012. Investigation on association and expression of ESR2 as a candidate gene for boar sperm quality and fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(5):782-790.
- Hess RA, Gist DH, Bunick D, Lubahn DB, Farrell A, Bahr J, Cooke PS and Greene GL. 1997. Estrogen receptor( $\alpha$  and  $\beta$ ) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *Journal of Andrology*. 18(6):602-611.
- Johnson L. 1998. Current developments in swine semen: Preservation, artificial insemination and sperm sexing.
- Kaewmala K, Uddin M, Cinar M, Große Brinkhaus C, Jonas E, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C and Schellander K. 2012. Investigation into association and expression of PLCz and COX 2 as candidate genes for boar sperm quality and fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(2):213-223.
- Kuiper G, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson J-A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(12):5925-5930.
- Lazaros LA, Xita NV, Kaponis AI, Zikopoulos KA, Plachouras NI and Georgiou IA. 2010. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  polymorphisms are associated with semen quality. *Journal of Andrology*. 31(3):291-298.
- Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruijff A and Van Soom A. 2008. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*. 70(8):1337-1345.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 247(3):C125-C142.
- Pagani F and Baralle FE. 2004. Genomic variants in exons and introns: Identifying the splicing spoilers. *Nature Reviews Genetics*. 5(5):389-396.
- Safarinejad MR, Shafiei N and Safarinejad S. 2010. Association of polymorphisms in the estrogen receptors alpha, and beta (ESR1, ESR2) with the occurrence of male infertility and semen parameters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 122(4):193-203.
- Solakidi S, Psarra AG, Nikolaropoulos S and Sekeris CE. 2005. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen receptor(AR) in human sperm: Localization of ER $\beta$  and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction*. 20(12):3481-3487.
- Suzuki Y, Sasagawa I, Itoh K, Ashida J, Muroya K and Ogata T. 2002. Estrogen receptor alpha gene polymorphism is associated with idiopathic azoospermia. *Fertility and Sterility*. 78(6):1341-1343.
- Xing Y, Ren J, Ren D, Guo Y, Wu Y, Yang G, Mao H, Brenig B and Huang L. 2009. A whole genome scanning for quantitative trait loci on traits related to sperm quality and ejaculation in pigs. *Animal Reproduction Science*. 114(1):210-218.
- Zeng C, He L, Peng W, Ding L, Tang K, Fang D and Zhang Y. 2014. Selection of optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*. 68(1):113-121.

---

Received September 22, 2015, Revised September 23, 2015,  
Accepted September 24, 2015