

TES 보존액이 미니돼지 동결 용해 정자의 생존성 및 성상에 미치는 영향

김상환¹, 강현아², 이명섭³, 서강석⁴, 윤종택^{1,5,*}

¹한경대학교 유전공학연구소, ²한경대학교 생물환경정보통신 전문대학원 동물생명공학 전공, ³메디키네틱스(주),
⁴순천대학교 동물자원과학과, ⁵한경대학교 동물생명환경과학부 동물생명공학전공

Effect of TES Extender on Sperm Characteristics and Viability of Frozen Semen in Miniature Pig

Sang-Hwan Kim¹, Hyun-Ah Kang², Myeong-Seop Lee³, Kang-Suk Seo⁴ and Jong-Taek Yoon^{1,5,*}

¹Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

²Major in the Animal Biotechnology the Graduate School of Biology & Information Technology, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea

³Medikinetics Co., Ltd, Pyeongtaek 451-833, Korea

⁴Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea.

⁵Department of Animal Life Science, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea.

ABSTRACT

The objective of this study is to estimate the effect of adding TES to LEY and FGE freezing extender for the sperm viability, acrosomal morphology and DNA fragmentation from miniature pig sperm, we evaluated sperm characteristics in TFGE, TLE and LEY with various thawing condition (37°C for 20 sec, 45 sec and 75°C for 5 sec, respectively), and in different concentration of glycerol at 1%, 1.5%, 3%. The sperm viability and normal acrosome intact(NAI) in TFGE (Viability : 60.3±2.4, NAI : 58.6±2.2%), TLE (61.3±2.4, 62.2±2.2%) extender significantly($p<0.05$) increased than that in LEY (50.2±2.4, 54.5±2.2%) extender thawed at 75°C for 5 sec. According to the results from glycerol concentration, the viability and NAI of miniature pig sperm in 1.5% glycerol TLE (66.1±3.2, 66.2±1.0%) was highest among the experimental groups. In accordance with this, DNA fragmentation rates was the lowest in TLE (43.3±0.5%) while that in LEY (63.5±2.3%) is the highest. Therefore, these results suggest that TLE extender method for freezing-thawing of miniature pig sperm increased the viability after thawing.

(Key words : miniature pig, glycerol, extender, sperm viability, DNA fragmentation)

서 론

실험동물과 장기 이식 동물로 주목 받고 있는 미니돼지(miniature pig)는 각종 바이오산업에 있어 그 수요가 증가되고 있으나, 현재 자연 교배에 의하여 생산되어 개량 효과가 크지 못하고, 우수한 유전 형질의 고정과 대량 생산에 문제점이 있다. 유전자원의 보존 및 유전 형질 우수 개체의 대량 생산을 위하여 가축의 정액 동결에 관한 연구가 진행 중에 있으나, 돼지정자의 동결과 용해 과정에서 돼지 정자는 내동성에 민감하고, 정자 세포막의 지질 과산화와(Cerolini 등, 2001), 첨체에 심각한 손상을 받는 것으로 알려져(Potter, 1979), 동결보존에 어려움이 있다. 동결보존액으로 Lactose Egg-Yolk (LEY) 동결보존액(Westendorf 등, 1973; Roca 등, 2004; Fraser 등, 2007; Sancho 등 2007)이 많이 사용되고 있으며, 정액의 동결

효율성을 높이기 위하여 냉각속도(Shim 등, 2005)와 동결용기(Dai 등, 2009)등에 대한 연구가 진행 중에 있다. 하지만 돼지 정자의 경우, 동결 보존 후 용해과정에서 세포내 빙결 재형성을 만들어 미토콘드리아 손상이 나타나며(Courtens와 Paquignon, 1985), 동결 시 glycerol과 당류에도 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Pursel 등, 1972; Wilmut와 Polge, 1977).

특히 미니돼지는 일반돼지와 생리학적 특성이 다르고(Halley과 Lee, 1993; Jin 등, 2001), 정자의 성숙에 미치는 정소 내 호르몬 기전과 정자 생성에 따른 생합성 경로(Biosynthetic pathway)(Carreau, 2001)와 스테로이드 합성(Steroidogenesis)의 역할에 차이가 있다(Jin 등, 2001). 또한 동결 용해시킬 때 일반 돼지와 다르게 고온에서 단시간 용해하는 것이 높은 생존율을 보이며(최 등, 2007), 정자 원형질막의 콜레스테롤에 관련된 지질 과산화에 대한 연구에서도 차이가 있다(Cerolini 등, 2001;

* 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호:2-0090188-03-2-CG000)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

* Correspondence : E-mail : jtyoon@hknu.ac.kr

김 등, 2011). 정자 동결에 다양한 당류의 첨가가 정자의 원형 질막 손상을 줄여 생존율 향상시키며(Pursel 등, 1972), TES (N-Tris[Hydrioxymethyl]methyl-2-aminoethane-sulfonic acid)의 첨가가 동결-융해 후 정자의 생존율을 향상시켜(Hanada, 1980; Watson, 1990), 정자의 원형질막의 보호 및 대사 작용에 영향을 주어 세포막을 보호한다(Garde 등, 2003)다고 알려져 있다.

따라서 본 연구는 미니돼지 정자의 생존성 향상과 우수 종축의 유전자 보존을 위하여 TES가 첨가된 TLE (TES+LEY), TFGE (TES+Fructose+Glucose+Egg Yolk)와 LEY를 사용하여 정자의 생존성 및 DNA 손상도를 분석하여 미니돼지에 최적화된 동결보존액을 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시 정액

본 실험에 사용된 정액은 경기도 평택시에 위치한 메디칼 네틱스(주)의 Midget miniature pig에서 의빈대를 이용한 음경 수압법으로 정액을 채취하여 전체 정자의 70% 이상의 정상 움직임과 80% 이상의 생존율을 현미경하에서 확인한 후 미리 제조된 1차 동결보존액(TLE, LEY, TFGE)으로 4×10^7 정자/ml 이 되도록 희석한 후 37°C로 가온한 보온병에 담아 2시간 이내로 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다.

2. 동결보존액 준비

실험에 사용된 1차 동결 보존액인 LEY는 Westendorf 등(1975)의 방법을 보완하여 제조하였고, TES 첨가는 Garde 등(2003)의 방법을 참조하였다. TLE의 제조는 9% α -lactose에 TES 100 mM과 Tris 50mM 및 Streptomycin과 Gentamycin 25 ug/ml를 첨가하였으며, TFGE는 3% D-fructose와 5% D+glucose에 TLE와 같이 TES와 Tris를 첨가하여 제조하였고, 제조된 1차 동결보존액에 각각 egg yolk 20%를 혼합하고 원심분리(4,000 rpm, 30min, 4°C)하여 상층액만을 사용하였다. 2차 동결보존액은 동결시 Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)와 glycerol의 최종농도를 0.5%와 각 1%, 1.5%, 3%로 하였다. 특별하게 언급 또는 기술하지 않는 한 본 실험에 사용된 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

3. 정액 동결 및 동결 정액 융해

1차 동결보존액으로 희석되어 운반된 정액은 37°C에서 4°C까지 2시간 동안 냉각하였다. 그 후 2차 동결보존액을 총 용량의 1/2로 첨가하여 0.5 ml straw에 넣어, 액체 질소가 담겨 있는 용기에서 액체질소 표면위로부터 5 cm 위 -180°C에서 10분간 정지한 후 액체 질소에 침지하여 동결 보관하였다. 동결 융해는 항온 수조를 이용하여 각각 37°C에서 20초, 45초 및 70°C에서 5초 동안 융해하였다.

4. 생존율 평가 및 활력도 분석

정자의 생존율은 computer assisted sperm analysis system (Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, Spain)을 이용하여 평가하였다.

5. 침체 정상성 평가

정자의 침체 정상성은 Larson과 Miller (1999)의 방법을 보완하여 수행하였다. 3×10^6 정자/ml의 최종 농도의 정자를 800×g로 원심분리 후 상층액을 제거하고, 1 ml의 1×PBS를 섞어 2회 500×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3.7% formalin 2 ml를 첨가하여 40분간 고정하고, 500×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 sperm pellet에 1 ml의 1×PBS를 첨가하여 희석한 다음, 그 중 100 ul를 slide glass에 도말하여 실온에서 건조시킨 후, 0.25% CBB (Coomassie Brilliant Blue) 용액으로 5분간 염색시켜 위상차 현미경으로 400배하에서 정자의 침체 정상성을 판단하였다. 판단 기준은 두부 전체에 푸르게 염색된 정자는 침체 정상 정자로 판단하였고, 두부의 주변 및 염색되지 않은 정자는 이상 정자로 판단하였다. 400마리의 정자를 세어 백분율로 환산하여 분석하였다.

6. 정자 DNA 손상도 분석

동결보존액에 따른 정자 chromosome DNA의 손상도 분석은 McConkey 등(1989)의 방법을 수정·보완하여 검사하였다. 각 동결보존액으로 동결된 정액을 융해한 후 70% percoll에서 원심분리(2,000 rpm 10 min, RT)하여 가온된 BTS 희석액으로 1×10^6 정자/ml로 희석하여 4 ml의 DNA fragment lysis buffer(50 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA(pH 8.0), 1% SDS, 500 mg/ml proteinase K)를 첨가하여 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 DNA는 PCI solution(phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)) 추출 방법을 이용하여 추출하고, 100% ethanol로 침전시켜 DNA 완충액인 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 녹인 후 1.5% agarose gel에서 100V로 전기영동 하였다. 전기영동 후 agarose gel을 Etbr staining solution(1 mg/ml of ethidium bromide)에 넣어 발색하여 UV transilluminator에서 확인하였고, DNA 밴드의 fragmentation를 alpha ease FC(version 4.0)으로 분석하였다. 실험결과, 분석은 DNA fragmentation된 band의 수를 세어 percentage로 표시하였으며, 4반복하여 평균±S.D로 분석하였다.

7. 통계처리

실험 결과는 SAS package(version 9.1)를 이용하여 ANOVA와 GLM(Generalized linear model)를 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 통계적 유의성($p < 0.05$)을 분석하였다.

결 과

1. 동결보존액과 용해 방법에 따른 생존성과 정상성

미니돼지의 정액을 TFGE, TLE, LEY 동결 보존액으로 동결한 후 37℃에서 20초, 45초와 75℃에서 5초 동안 용해하였을 때 생존성 및 정자의 침체 정상성은 Table 1과 같다. 37℃에서 20초간 동결 용해하였을 때 TLE 동결보존액은 동결 용해 후 정자의 생존율이 57.4±1.8%이었고, 정자의 침체의 정상성은 58.5±1.8%이었다. TFGE 보존액은 정자의 생존율이 42.4±1.8%, 침체 정상은 50.5±1.6%이었고, LEY 보존액은 정자의 생존율이 38.6±1.8%, 침체 정상성은 44.2±2.6%이었다. 37℃에서 45초간 동결 용해하였을 때 TLE 동결보존액은 동결 용해 후 정자의 생존율이 58.3±2.1%이었고, 정자의 침체 정상성은 57.3±1.4%이었다. TFGE 보존액은 정자의 생존율이 43.2±2.1%, 침체 정상은 48.3±1.4%이었고, LEY 보존액은 정자의 생존율이 38.4±2.1%, 침체 정상성은 41.5±1.4%이었다. 75℃에서 5초간 동결 용해하였을 때 TLE 동결보존액은 동결 용해 후 정자의 생존율이 61.3±2.4%이었고, 정자의 침체의 정상성은 62.2±2.2%이었다. TFGE 보존액은 정자의 생존율이 60.3±2.4%, 침체 정상은 58.6±2.2%이었고, LEY 보존액은 정자의 생존율이 50.2±2.4%, 침체 정상성은 54.5±2.2%이다. 동결 보존액이나 용해 방법간에 있어서 TLE 동결보존액이 다른 동결보존액에 비하여 동결 용해 후 생존성이나 정자의 침체 정상성이 유의적으로($p<0.05$)을 높은 결과를 나타내었다.

2. Glycerol 농도에 따른 생존성과 정상성

Glycerol 농도가 미니 돼지정자의 동결-용해 후 생존성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각의 동결보존액에 glycerol 농도를 1%, 1.5%, 3%하여 동결한 후 75℃에서 5초 동안 용해하여 생존성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 1.5% glycerol 첨가된 TLE 보존액에서 동결-용해 후 66.1±3.2%의 생존율과 66.2±1%의 침체 정상성을 나타내었다. TFGE 보존액에서 동결-용해 후 63.2±3.2%의 생존율과 61.2±1%의 침체 정상

성을 나타내었다. LEY 보존액에서 동결-용해 후 60±3.2%의 생존율과 58.6±1%의 침체 정상성을 나타내었다. 동결보존액에 따른 결과에서 TLE 동결보존액이 다른 동결보존액보다 정자의 생존성과 침체 정상성이 유의적($p<0.05$) 높았으며, glycerol 첨가 농도에서는 모든 결과가 유의적인 차이를 보이지는 않았으나, 1.5% 첨가 농도가 1%와 3% 첨가 농도에 비하여 높았다.

3. 동결보존액에 따른 DNA 손상도

동결보호제가 정자 두부에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DNA fragmentation을 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 동결보존액에 따라 미니돼지 정자의 chromosome DNA상의 손상을 분석한 결과, TLE의 경우 43.3±0.5%의 유의적($p<0.05$)으로 가장 낮은 손상을 보였고, LEY에서 약 63.5±2.3%의 높은 손상을

Table 2. Effect of glycerol concentration on the survival ability of frozen thawed miniature pig spermatozoa

Type of extender	Glycerol concentration	Viability (%)	NAI (%)
TFGE	3%	58±4.5	57.5±1.8
	1.5%	63.2±3.2*	61.2±1.0*
	1%	43.2±2.1	47.1±2.1
TLE	3%	61.3±4.5*	61.3±1.8*
	1.5%	66.1±3.2**b	66.2±1.0**a
	1%	53.3±2.1	54.2±2.1
LEY	3%	56.2±4.5	52.2±1.8
	1.5%	60±3.2*	58.6±1.0*
	1%	51.2±2.1	50.1±2.1

NAI : Normal Acrosome Intact.

***,a,b Different letters within same treatments represent significantly difference ($p<0.05$).

Table 1. Effect of freezing extender and thawing method on the survival ability of frozen miniature pig spermatozoa

Type of extender	Survival ability					
	37℃ for 20sec		37℃ for 45sec		75℃ for 5sec	
	Viability (%)	NAI (%)	Viability (%)	NAI (%)	Viability (%)	NAI (%)
TFGE	42.4±1.8	50.5±1.6*	43.2±2.1*	48.3±1.4*	60.3±2.4*	58.6±2.2*
TLE	57.4±1.8*	58.5±1.8**	58.3±2.1**	57.3±1.4**	61.3±2.4**a	62.2±2.2**a
LEY	38.6±1.8	44.2±2.6	38.4±2.1	41.5±1.4	50.2±2.4	54.5±2.2

NAI : Normal Acrosome Intact.

***,a Different letters within the same column represent a significant difference($p<0.05$).

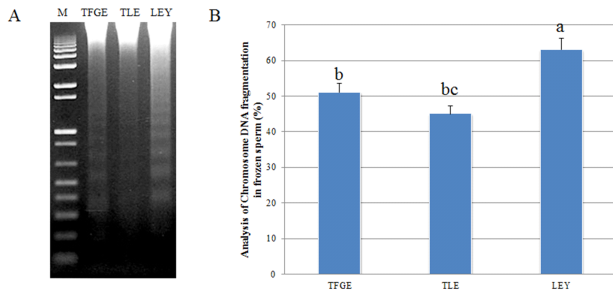


Fig. 1. Effects of chromosome DNA fragment on various frozen extenders (TFGE, TLE and LEY) in miniature pig sperm. A: photography of electrophoresis, B: percentage of DNA fragmentation. ^{a-c} Different letters within the same column represent a significant difference ($p < 0.05$).

보였다. TFGE의 경우 약 $51.5 \pm 1.3\%$ 의 손상을 보이고 있어, LEY보다는 적은 손상을 나타냈다.

고 찰

돼지의 정액은 다른 가축에 비하여 정자의 농도가 낮고, 내동성과 온도 저하에 대한 내성이 약하다(Maxwell과 Johnson, 1997). 이로 인해 정자는 저온 충격에 약하며, 삼투압에 의한 전해질 대사의 변화, 정자 세포내의 원형질 및 DNA 손상을 가져오게 된다(Salisbury 등, 1978). 돼지 정액은 다른 포유류에 비해 정자의 동결 용해 후 생존율이 낮아 Glucose Egg-Yolk (Baier, 1962; Polge 등, 1970), Lactose Egg-Yolk(Westendorf 등, 1975), Beltsville F3(BF3; Pursel과 Johnson, 1973) 등이 많이 쓰이며, 그 중 간편하고 효율성이 높은 LEY보존액이 많이 이용되고 있다. 미니돼지 정자의 동결에 있어 이 등(2011)은 LEY를 이용한 정액 동결이 미니돼지 정자의 생존 및 활력이 상승되고 수정률이 높다고 하였다. 본 실험에서 미니돼지 동결 정자의 생존성과 정자의 침체 정상성을 개선하고자 침체와 핵막을 보호하는 것으로 알려진 TES(Garde 등, 2003)를 첨가한 TLE 그리고 TFGE를 사용하여 미니돼지 정액을 동결-용해한 후 정자의 생존성과 침체 정상성을 분석한 결과, TLE 동결보존액이 TFGE와 LEY에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 높은 결과를 나타내어 LEY가 미니돼지 정자의 동결에 높은 영향을 미친다는 연구 결과(이 등, 2011)보다 TES의 첨가된 동결보존액이 동결 용해 후 좋은 결과를 나타냈다. 또한 미니돼지 동결정자의 용해 온도와 관련한 실험에서 37°C 로 20초, 45초 동안 용해한 결과보다 75°C 로 5초 동안 용해한 결과가 Almlid와 Johnson(1988) 및 최 등(2007)의 결과와 같이 활력 및 침체 정상성이 향상되는 것을 확인할 수 있었으며, 높은 온도에서의 용해가 정자의 생존율 및 정자의 활력과 침체 정상성을 개선시키며(Eriksson과 Rodrigues-Martinez, 2000), 빠른 용해 속

도가 세포내 빙결 재결정을 줄여 미토콘드리아의 손상을 최소화 하는 것으로 사료된다(Fiser 등 1986). 본 연구에서 미니돼지 정액을 TLE로 동결한 후 75°C 에서 5초 동안 용해한 결과가 LEY와 TFGE에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 높은 활력 및 침체 정상성의 향상을 나타냈다. 따라서 TES의 사용이 정자의 원형질막의 손상을 줄이고 생존율에 영향을 미쳐(Rasul 등, 2000) 미니돼지 정자 동결에 있어 중요한 역할을 할 것이라 사료될 수 있다. Glycerol의 농도에 따른 동결성 및 생존율 분석에서 3% glycerol 첨가 군보다 1.5% 첨가 군에서 약간 높은 활력 및 침체 정상성을 보이는 것으로 확인할 수 있었는데, 이는 Almlid와 Johnson(1988)에서 밝힌 3% glycerol 첨가가 높은 침체 정상성을 보인다는 결과와 차이가 있었으며, Wilmut와 Polge(1977)에서 밝힌 정자의 생존율은 glycerol의 농도에 따라 정상침체에 영향을 미친다는 보고에서처럼 낮은 농도에서는 활력 및 생존율이 저하되었지만, 적정 수준의 농도에서는 오히려 정자에 침체 정상성 및 생존율에 영향을 주는 것으로 사료된다(Shim 등, 2005). 또한 본 연구에서 사용된 정액은 percoll에 의한 분리방법(Sakkas 등, 2000)을 사용하지 않고 정장이 포함된 원정액을 사용하여 동결함으로 인해, 삼투압 및 glycerol의 영향에 안정적인 효과를 미치는 것으로 사료될 수 있다. 정자의 원정액에는 galactose를 비롯한 citric acid와 fructose, glucose 등 과당이 일정량 함유(Grizard 등, 2000)되어 있어 원정액 사용에서 따로 당류를 첨가하지 않아도 동결에 대한 효과를 얻을 수 있을 것이라 사료된다. 이러한 결과는 Pursel 등(1972)의 연구 결과에서처럼 일정량의 당류가 돼지정자 동결성에 영향을 준다는 결과와 같았다. 또한 동결보존액에 따른 미니돼지 정자의 DNA 손상을 분석한 결과에서 1.5% glycerol의 첨가로 동결한 후 75°C 로 5초 동안 용해한 후 정자의 chromosome DNA 손상을 분석한 결과, TLE가 LEY나 TFGE보다 낮은 chromosome DNA 손상을 보여, 동결-용해 방법(Kalludi 등, 2011) 및 첨가 물질에 따라 정자의 DNA 손상 정도가 달라지는 것으로 볼 수 있었다. 따라서 TES의 첨가가 미니돼지 정자의 보존에 있어서 두부의 손상률을 줄일 수 있을 것이라 사료된다. 본 연구를 종합한 결과, 미니돼지 동결보존액에 있어서 LEY의 단독 사용보다 TES의 첨가가 동결성에 긍정적인 효과를 줄 수 있을 것이라 사료되며, glycerol 첨가의 농도의 조절 및 고온 용해 방법이 미니돼지 정자 성상에 좋은 영향을 줄 것으로 사료된다.

결 론

본 연구의 목적은 미니돼지 정액을 동결하기 위하여 동결보존제인 LEY와 FGE에 TES를 첨가하여 동결 용해 후 미니돼지 정자의 생존성, 침체의 정상성 및 DNA 손상에 미치는 영향을 분석하기 위하여 실시하였다. 각 동결보존액에 따른

적정 용해온도와 glycerol의 농도를 측정하기 위하여 37°C, 20초간 37°C 45초와 75°C 5초에서 각각 용해하여 생존율 및 침체 정상성을 분석하였고, glycerol의 농도 평가는 1%, 1.5% 그리고 3%에서 측정하였다. 동결보존액에 따른 동결 용해 후 정자의 생존율과 침체 정상성 분석 결과, 75°C에서 5초 동안 용해한 TLE(생존율 : 61.3±2.4, 침체 정상성 : 62.2±2.2%)가 TFGE (60.3±2.4, 58.6±2.2%) 및 LEY(50.2±2.4, 54.5±2.2%)보다 높은 생존율과 침체 정상성을 나타내었다. Glycerol 농도에서는 1.5% glycerol의 농도의 TLE(66.1±3.2, 66.2±1.0%)에서 3%와 1% glycerol 농도보다 유의적($p<0.05$)으로 높은 정자 생존율과 침체 정상성을 보였다. 동결정액의 DNA 손상도를 평가한 결과, LEY(63.5±2.3%)가 가장 높았으며, TLE(43.3±0.5%)를 이용한 동결보존액에서 가장 낮은 fragment를 보였다. 따라서 본 연구결과 TLE 동결보존액을 사용한 정자 동결 보존 방법이 미니패지 정자 동결에 보다 효과적인 것으로 사료된다.

참고문헌

- Almlid T and Johnson LA. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.* 66:2899-2905.
- Baier W. 1962. Erfahrungen in der kunstlichen besamung des hausschweines einschliesslich der verwendung von tiefkuhl samen. *Zootec.* 17:94-99.
- Carreau S. 2001. Germ cells; a new source of estrogens in the male gonad. *Mol. Cell Endocrinol.* 178:65-72.
- Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F and Gliozzi TM. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121:395-401.
- Courtens JL and Raquignon M. 1985. Ultrastructure of fresh, frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: Johnson LA, Larsson K (ed), *Deep Freezing of Boar Semen*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, pp 61-87.
- Dai JJ, Wu CF, Zhang DF, Yin FZ, Zhang TY, Liu D, Wu HL, Li LL, Yang ST and Wang L. 2009. Some factors affecting freezing of boar semen in 5 ml maxi-straws. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22:507-515.
- Eriksson BM and Rodriguez-Martinez H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci.* 63:205-220.
- Fiser PS, Pairfull RW, Hansen C, Panich PL, Shrestha JNB and Underhill L. 1993. The effect of warming velocity on motility and acrosome integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol. Reprod. Dev.* 34:190-195.
- Fraser L, Dziekońska A, Strzezek R and Strzezek J. 2007. Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology* 67:994-1003.
- Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso, Gomendio GM and Roldan ERS. 2003. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles. *Bio. Reprod.* 69:602-611.
- Grizard G, Sion B, Bauchart D and Boucher D. 2000. Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 740:101-107.
- Haley CS and Lee GJ. 1993. Genetic basis of prolificacy in meishan pigs. *J. Reprod. Fertil.* 48:247-259.
- Hanada A and Nagase H. 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 60:247-252.
- Jin W, Arai KY, Herath CB, Kondo M, Ishi H, Tanioka Y, Watanabe G, Groome NP and Tayat K. 2001. Inhibins in the male Gottingen miniature pig: Leydig cell are the predominant source of inhibin B. *J. Androl.* 22:953-960.
- Kalludi SN, Kalthur G, Benjamin S, Kumar P and Adiga SK. 2011. Controlled cooling versus rapid freezing of teratozoospermic semen samples: Impact on sperm chromatin integrity. *J. Hum. Reprod. Sci.* 4:121-124.
- Larson JL and Miller DJ. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.* 52:445-449.
- Maxwell WMC and Johnson LA. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
- McConkey DJ, Hartzell P, Jondal M and Orrenius S. 1989. Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264:13399-13402.
- Polge C, Salamon S and Wilmut I. 1973. Fertilization capacity or frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Res.* 87:424-428.
- Potter WL, Upton PC and Dunn BL. 1979. Morphological changes as observed by light microscopy of the acrosome of boar spermatozoa subjected to deep freezing. *Aust. J. Biol. Sci.* 32:575-578.
- Pursel VG, Johnson LA and Schulman LL. 1972. Interaction

- of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 35: 580-584.
- Pursel VG and Johnson LA. 1973. Procedure for the preservation of boar spermatozoa incubated before col shock. *J. Anim. Sci.* 34:273-278.
- Rasul Z, Anzar M, Jalali S and Ahmad N. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 59:31-41.
- Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM and Martinez EA. 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.* 25:397-405.
- Sakkas D, Manucardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D and Bianchi PG. 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.
- Salisbury GW, Van Demark NL and Lodge JR. 1978. *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. W.H. Freeman and Co. 2nd (eds), San Francisco, USA., pp. 428-441.
- Sancho S, Casas I, Ekwall H, Saravia F, Rodriguez-Martinez H, Rodriguez-Gil JE, Flores E, Pinart E, Briz M, Garcia-Gil N, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M and Bonet S. 2007. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction* 134:111-121.
- Shim KS, Kim KS, Seo KD and Song HB. 2005. Studies on the freezing of boar semen I. Effects of cooling rate and extenders on viability and normal acrosome after frozen-thawed of boar semen. *J. Emb. Trans.* 20:43-48.
- Watson PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming G (ed), *Marshall's Physiology of Reproduction* 2:747-869.
- Westendorf P, Richter L and Treu H. 1975. Deep freezing of boar spermatozoa. Laboratory and insemination results using the Hulsenberger paillette method. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 82:261-267.
- Wilmot I and Polge C. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 2. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg-yolk. *Cryobiology* 14:479-782.
- 김동우, 이용승, 유한준, 정희태, 양부근, 박춘근. 2011. 미니돼지 정액의 보존 시 콜레스테롤과 혈청 알부민이 정자 성상과 지질 과산화에 미치는 영향. *J. Emb. Trans.* 26:71-78.
- 이상희, 유한준, 이용승, 정희태, 양부근, 김대영, 박춘근. 2011. Percoll 분리된 미니돼지 정액의 체외 수정 능력에 있어서 동결보존액의 영향. *Reprod. Dev. Biol.* 35:85-91.
- 최원철, 양미혜, 이용승, 정희태, 양부근, 이동석, 박춘근. 2007. 미니돼지 동결정액의 용해 온도가 정자성상에 미치는 영향. *Reprod. Dev. Biol.* 31:175-179.

(접수: 2012. 1. 18 / 심사: 2012. 1. 19 / 채택: 2012. 2. 10)