

최 종
연구보고

돼지 인공수정 효율향상을 위한 정액품질
평가, 동결정액생산 및 발정동기화기술 개발

Technological Improvement in Evaluating Semen
Quality, Freezing Semen and Synchronizing Estrus
for Efficiency-Promotive Swine Artificial Insemination

연구기관
중앙대학교

농 립 부

최 종
연구보고

돼지 인공수정 효율향상을 위한 정액품질
평가, 동결정액생산 및 발정동기화기술 개발

Technological Improvement in Evaluating Semen
Quality, Freezing Semen and Synchronizing Estrus
for Efficiency-Promotive Swine Artificial Insemination

연구기관
중앙대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지 인공수정 효율향상을 위한 정액품질 평가, 동결정액 생산 및 발정동기화 기술 개발” 과제(세부 1과제 “돼지 정액품질의 평가 및 향상 기술 개발” : 세부 2과제 “전업 양돈농가 중심의 최적 인공수정 및 발정동기화 기술 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 일

주관연구기관명 : 중앙대학교

총괄연구책임자 : 김 창 근

세부 1과제 연구책임자 : 김 창 근

연구원 : 정영채 정영호 윤종택

이종완 서경덕 류재원

김 일 서상욱 이주형

협동연구기관 : 축산기술연구소

세부 2과제 협동연구책임자 : 김 인 철 이 장 희

연구원 : 손동수 유충현 류일선

김명직 백순화 진현주

정경용 김상운 서상교

지달영

위탁연구기관 : (주)다비인티

위탁연구책임자 : 윤 희 진

연구원 : 민동수 강 권 이일주

요 약 문

I. 제 목

돼지 인공수정 효율향상을 위한 정액품질 평가, 동결정액 생산 및 발정동기화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내에서 액상정액을 공급하는 인공수정센터는 영세성과 지역성을 벗어나지 못한 실정이며, 또한 보유 종모돈의 활용도가 낮고 정액수요와 공급의 불일치에 따른 정액낭비가 심한 실정이다. 이러한 낭비정액을 최소화하고 수송비용을 절감하기 위해서 동결정액의 생산 공급 기술의 개발이 시급히 요구되고 있다. 한편 정액의 품질 고급화로 수태율을 높이고 인공수정 효율을 극대화 할 수 있는 기술개발도 매우 절실한 현실이다.

액상정액 생산에서 공급자는 품질을 높이고 생산 원가를 줄여야 하며 수요자인 농가 단위에서는 정액의 이용효율을 높이고 정액의 품질을 판별할 수 있는 기술의 향상이 요구되고 있다.

양돈장에서는 자연종부를 인공수정으로 전환하여 종모돈의 능력개량 촉진과 종모돈 유지시설과 사육비 절감으로 생산성 효율을 높여야 한다.

돼지 인공수정의 기반조성은 국내 종돈개량과 번식효율의 향상을 위해서 조속히 이뤄져야 한다. 인공수정기술은 자연종부에서 기인되는 양돈장의 만성질병 발생율을 줄일 수 있다. 국내 인공수정기술과 동결정액 활용이 산업화되고 국제경쟁력을 확보할 경우 돼지 액상 및 동결정액의 수출과 함께 관련산업의 해외 진출도 유리하게 촉진 될 것으로 전망된다.

현재 국내 번식 가능한 암돼지 보유두수는 약 95만두(02년 하반기)이며 인공수정 보급율은 60%로 추정되고 있다. 또한 양돈산업의 경영형태가 전업화 되고있다. 인공수정의 보급률이 가속적으로 증가되지 못하는 이유를 여러 가지로 생각할 수 있겠으나 전업규모에 알맞도록 인공수정업무가 효율화되지 못한 이유도 있다. 인공수정의 번식성적을 향상시키고 업무수행의 효율성을 극대화 할 수 있는 전업양돈규모에서 실시 가능한

발정 및 배란동기화법의 개발과 실용화가 시급한 과제가 되고 있다. 국내 양돈산업의 발전을 위해서 돼지 인공수정기술의 선진화와 인공수정 보급율의 확대 방안이 시급히 요구되고 있다. 따라서 본 연구는 고품질의 정액생산기술과 동액의 동결화 및 발정동기화 기술을 개발하는데 목적을 두고 수행하였다.

Ⅲ. 연구개발의내용 및 범위

본 연구의 목적을 달성하기 위하여 2개의 세부과제와 1개의 위탁과제로 나누어 연구를 수행하였으며 세부연구과제별 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 정액 품질평가 및 향상기술 개발 (제 1 세부과제, 주관연구기관)

- 1) 간편, 정확한 정액성상 평가법 개발
- 2) 세균부재(위생적) 정액생산 기술 개발
- 3) 고품질 동결정액생산 기술 개발
- 4) 체외수정에 의한 종모돈의 수정능 및 수태율 예측평가(간접)법 개발

2. 전업 양돈장 중심의 최적 인공수정 및 발정동기화기술 개발

(제 2 세부과제, 협동연구기관)

- 1) 최적 발정동기화기술 개발
- 2) 최적 인공수정(중부) 형태 및 주입정액 형태 결정
- 3) 발정동기화 후 최적 인공수정시기(특정요일, 시각) 결정
- 4) 색도에 의한 액상정액의 간편 품질식별기술 개발

3. 종모돈 정자의 염색질구조 특성과 번식성적과의 상관 연구

(위탁과제, 위탁연구기관)

- 1) 품종, 개체간 정자염색질구조 특성의 차이 비교
- 2) 정자염색질구조검사(sperm chromatin structure assay, SCSA) 특성과 종모돈의 정액생산능력 및 정액성상과의 관계
- 3) SCSA 특성과 수태성적과의 관계

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

○ 정액품질 평가와 향상기술개발 및 정자 염색질구조 특성과 번식성적과의 상관 연구

본 연구는 경기와 충남지역에 소재한 5개 AI 센터에서 보유하고 있는 Landrace, Yorkshire 및 Duroc 종모돈으로부터 생산된 원정액과 액상정액을 공시하여(세부 1과제와 위탁과제) 정액의 품질평가와 동결정액 제조 및 체외수정 시험을 수행하였으며 종모돈의 정액생산기록과 수태기록을 근거로 하여 정액성상, 체외수정 및 수태성적간의 상관관계를 조사하였다. 또한 세부 2과제에서는 협동기관(축산기술연구소)의 AI센터 보유 종모돈으로부터 생산된 정액을 이용하여 발정동기화와 수태실험이 수행되었다.

조사된 정액성상 평가법으로는 CASA 측정치, 정자생존율(SYBR-14와 PI, FITC-PSA 법), 정상침체율(Spermac staining, FITC-PSA) HOST, 미토콘드리아 기능(rhodamine 염색법), 정자 acrosin 수준, 정자염색질구조 검사법(SCSA)이 조사되었으며 돼지 난포란과의 체외수정 실험이 이뤄졌다.

발정동기화 실험에서는 미경산돈과 경산돈에서 4가지 발정과 배란 유도법의 발정동기화 효율 및 주입 정액의 형태와 주입정자수, 정액주입시기 등의 실험이 정액보급 양돈장을 중심으로 이뤄졌다.

국내 시판용 액상정액의 질적 평가에서 액상정액의 CASA-운동성은 보존 2일부터 크게 저하되었으며 그 외의 CASA 측정치는 정액 보존기간에 따라 AI 센터간에 차이가 많았다. 정자생존율은 제조 당일 80-90%에서 보존 4일 이후 70%로 크게 감소되었으며 정상침체율은 제조 당일 60%에서 4일과 6일에 각각 32%와 21%로 크게 감소하였다. HOST 결과는 보존 2~3일에 제조 당일의 60~70%로 현저히 저하하였다. 미토콘드리아 기능도 보존 4일에 현저히 낮았다. 보존기간 중 정자생존율은 정자활력, HOST 결과 및 미토콘드리아 기능 변화와 매우 높은 (+)상관이었다.

정액내 세균오염도에 관한 조사에서 원정액 중에 검출빈도가 50% 이상인 세균은 *Bacillus sp.*(75.0%), *Pseudomonas sp.*(67.9%), *Proteus sp.*(53.8%) 및 *Staphylococcus*

sp.(53.6%)였고 검출세균 중 가장 검출빈도가 높은 세균은 *Bacillus sp.*(30.0%)였다. 희석정액(1:1)의 세균오염도도 원정액과 유사하나 *E. coli*, *Klebsiella sp.* 와 *Enterobacter sp.*가 원정액보다 많았다.

원정액과 희석정액(1:1)내 세균수는 $24.4 \pm 29.5 \text{cfu} \times 10^2 \text{ml}$ 와 $10.4 \pm 18.2 \text{cfu} \times 10^2 \text{ml}$ 였으며 희석정액 보존 6일에는 $3 \sim 104 \text{cfu} \times 10^2 \text{ml}$ 로 크게 증가되었다. 8종의 항생제에 대한 감수성 조사에서 *Staphylococcus sp.*는 모든 항생제에 대해 저항성을 가졌고 *Pseudomonas sp.*는 일부 AI 센터에서 Penicillin, streptomycin 및 erythromycin에 저항성이 있었다. *Corynebacterium sp.*는 spectinomycin, polymyxin B 및 erythromycin에 저항성을 가졌다. Linco-spectinomycin, gentamycin 또는 amikacin 단독 투여에서는 보존 6일에서 정자활력과 생존율의 저하없이 세균 증식을 억제할 수 있었으며 이들 항생제의 복합처리에서는 일부 개체에서 정자활력의 저하가 있었으며 적절한 첨가농도가 필요함을 알 수 있었다.

동결정액 제조시 1차 희석액에 항산화제로서 taurine(40mM)과 α -tocopherol(500 μ m)의 단독 또는 복합투여에서 정자활력, 생존율 및 정상침체율에서는 처리간에 차이가 없었으나 복합처리에서 활성산소계(ROS)의 발생과 지방과산화(lipid peroxidation)가 유의적으로 감소하였다. 정액동결전 12시간의 방치시간 동안에 sialic acid(0.04mM)의 첨가로 용해 후 정자활력의 개선이 있었다. 정액 1차 희석액에 1과 3M pentoxifylline의 첨가에서는 3M 첨가에서 용해 후 정자생존율과 HOST 결과의 상승이 있었으며 또한 용해 후 3M 첨가에서도 정자활력의 증가가 있었다. 1차 희석액에 이당류인 0.05~0.2M trehalose 첨가에서는 0.05와 0.1M에서 냉각후에서는 영향이 없었으나 용해 후 정자활력이 현저히 상승되었고 특히 정상침체율의 상승도 있었다. Trehalose 단독처리보다 EDTA(2와 5mM)와의 병행처리에서 효과의 상승이 있었다. Trehalose 0.025~0.2M 처리에서 정자내 ROS가 현저히 감소하였다.

정액품질 개선을 위한 정액평가법 중에서 HOST시 150mOsm/kg, 30분 검사가 최적조건이었으며 HOST 결과는 액상보존 3일부터 크게 감소되었다. 종모돈간의 HOST 결과의 변이는 원정액보다 희석정액(1:1)과 액상정액에서 더 컸으며 HOST 결과가 낮은 개체에서 그 변이는 더 컸다. 정자 acrosin 수준의 측정은 25℃에서 60분간이 최적조건이었

다. 원정액과 희석정액에서 종모돈 개체변이가 높았으며 acrosin 수준은 원정액이 액상 정액보다 1.2배 높았으며 동결정액의 수준은 원정액과 희석정액의 각각 63와 84%로 크게 저하되었다.

종모돈 개체의 정액보존 중 acrosin수준의 저하율에 개체 차이가 크게 나타났다. 원정액의 정자 acrosin 수준은 HOST 결과 및 동결융해정자의 acrosin 수준과 높은 (+)상관, 융해 후 정상침체율과는 (-)상관이었다. 원정액과 동결융해정액의 정자 acrosin 간에는 높은 (+)상관이었다.

액상정액 정자의 체외수정율은 정자 acrosin 수준, 정자활력과 높은 상관($r=0.88, 0.97$)이었고 HOST와는 유의성은 없으나 (+)상관이었다. 정자 acrosin 5.6mU이상인 정자에서 체외수정율과 배반포 발달율이 높았다.

SCSA에서 COMPat, SDat가 높은 경우가 유의성은 없으나 체외수정율과 (-)상관이 있었다. 종모돈의 수태율은 acrosin 수준 및 HOST 결과와 유의적 상관($r=0.80, 0.87$)이 있었다. 체외수정율이 배반포 발달율과 유의적 상관이 있었고 1차 실험에서는 특히 배반포 발달율과 산자수간에 (+)상관($r=0.77$)이 있었다.

SCSA 결과는 15~17개월령 종모돈이 다소 높았고 측정치들의 변이 계수는 14개월에서 높았다. 개체내 변이계수는 13개월령 이하보다 17개월령 이상에서 더 컸다. 4~5의 COMPat 값과 50이하 %PeakR에서 정액량과 액상정액 생산(병)이 많았으며 SDat 20이하에서 정자농도와 액상정액 생산량이 많았다. COMPat, SDat 및 %Redrks에 상관은 유의적으로 높았으며 SCSA가 불량할 경우 정액성상도 불량한 경향이 있었다.

종모돈의 수태율과 산자수는 COMat 3~4, SDat 21~40 그리고 %Red 5~6에서 다소 많은 경향이였으며 %PeakR 50이하에서는 수태율이 다소 높았다. 그러나 SCSA 측정치가 수태율과 산자수와 유의적 상관은 없었다.

○ 전업양돈 농가중심의 최적 인공수정 및 발정동기화기술 개발

가. 돼지의 발정동기화 및 인공수정기술 개발

1) 동일 종모돈의 액상 및 동결정액의 분만율은 각각 81.5~87.3% 및 76.6~80.5%로서 액상정액이 동결정액보다 분만율이 다소 높았다.

2) 종부형태에 따른 수태율은 미경산돈의 경우 AI 2회가 85.4%, 자연종부(NS) 2회가 72.9% 및 1차 자연종부 + 2차 인공수정(NS + AI) 형태가 83.4%였으며, 경산돈의 수태율은 2회 AI에서 86.2%로 다소 높았다.

3) 후보돈에서 Regumate(progesterone제제)을 14일간 사료에 첨가하거나 또는 Ring-CIDR를 질내 14일동안 장치 종료후 24시간에 hCG(300~500IU)를 주사하고 108시간후에 GnRH(300ug/두)를 주사하여 발정 및 배란동기화(GnRH 주사) 후 26시간때에 1차 인공수정하고 1차수정 후 12시간때에 2차인공수정을 실시한 결과

이유 모돈에서는 이유 후 24시간후에 hCG를 주사하고 80시간후에 GnRH를 주사하여 발정 및 배란을 유도하고 GnRH주사 후 24시간때에 1차 인공수정하고 1차수정 후 18시간때에 2차인공수정을 실시한 결과 Regumate(처리 1구)와 Ring-CIDR(처리 2구)처리시 수태율은 각각 89.1%와 88.0%였다. Regumate(처리 3구) 처리구 90.9%, Ring-CIDR(처리 4구) 처리구가 93.3%의 수태율을 나타내었다. 분만율은 처리 1, 2, 3 및 4구가 각각 86.7%, 82.6%, 88.6% 및 91.1%였다.

나. 돼지인공수정의 수태율 향상기술

1) 인공수정시 1회 주입 정자농도(활력이 70%이상 정자수 기준) 30.0, 25.0, 20.0, 17.5, 15.0, 12.5, 10.0 및 $7.5 \times 10^8 / 80\text{ml}$ 로 각각 조절하여 2회 인공수정시 분만율은 72.3% ~ 89.3% 범위였고 정자농도간에 통계적인 유의차는 인정되지 않았다. 총산자수는 $30.0 \sim 20 \times 10^8 / 80\text{ml}$ 농도시 11.29 ~ 11.02두로 유의적인 차이가 없었다.

2) 액상정액의 보관온도 및 보관기간에 따른 메칠렌블루 환원시간 및 pH 변화에서 보존기간이 길어질 수록 pH가 알카리성으로 변하였으며 메칠렌블루 환원시간은 길어지는 경향이 뚜렷하였다. 제조당일 정액의 메칠렌블루환원시간은 17℃ 및 5℃에서 각각 2.4 ± 0.9 분 및 2.6 ± 1.2 분으로 차이가 없었으나 7일째에는 17℃에 보관정액의 pH가 평균 0.2정도가 높았다. 보관온도에 따른 pH 변화는 17℃보다 5℃에서 적게 나타나 정액보관에 다소 유리함을 보여주었다.

3) 액상정액을 17℃에서 1, 3 및 5일 동안 각각 보관하였을 때 정자 활력은 71.9%, 59.8% 및 53.9%였으며, 이 때 pH는 각각 6.89, 6.84 및 7.06으로 페놀레드용액에 의한 표준칼라코드의 적정 범위내 색상을 나타내었다.

4) 정액의 pH가 낮을 때(6.84) 수태율이 약간 높았다(93.7%)

2. 결과 활용에 대한 건의

○ 정액품질 평가와 향상기술 개발 및 정자염색질 구조특성과 번식성적과의 상관 연구

본 연구결과에서 시판용 액상정액에서 품질의 개선이 더욱 요망됨을 알 수 있었으며 AI센터간 품질의 차이가 많았기 때문에 우리나라 돼지 인공수정 산업의 안정적 발전과 양돈산업의 국제경쟁력을 높이기 위해서 우수 종모돈의 활용과 관리의 체계적 운용이 요망되었다. 그리고 정액내 세균 오염도로 보아 AI센터 시설 전반의 위생관리 특히 종모돈 시설과 종돈의 관리가 보다 위생적이고 선진화 할 수 있도록 정부적 차원의 지원과 협조가 요망되었다.

국내 종모돈의 정액 생산능력과 수태성적을 높이기 위하여 종모돈 선발 계획과 방법이 더욱 기술적 근거하에 운영되도록 기초적 연구가 필요하며 이 분야 연구의 촉진을 위해서 각 연구비 지원기관의 지원과 협조가 있어야 할 것이다.

AI 센터에서 조사 얻어지는 각종 연구자료는 산학협력 체제하에서 서로 공유하면서 문제점 해결에 노력해야 할 것이며 새로운 정보와 연구결과는 여러 매체 또는 협회, 교육기관을 통해서 적극 활용될 수 있도록 정책개발이 요구된다.

○ 전업양돈농가 중심의 최적 인공수정 및 발정동기화기술 개발

가. 돼지 인공수정기술의 농가 및 가축인공수정사 등에 기술 전수 필요

나. 돼지 인공수정에 의한 농가단위 개량 및 능력검정 수행 필요

다. 인공수정산 자돈의 친자확인을 위한 연구 수행 필요

SUMMARY

CASA-sperm motility of liquid semen produced in commercial pig AI centers sharply dropped after 2 days of storage. Changes in other CASA-parameters during 17°C storage varied among the AI centers. Sperm viability(80~90%) at the first day of storage decreased under 70% at the 4 days of storage. A sharp drop in percentage of acrosome-intact sperm occurred with the time of storage, with only 32% and 21% left by 4 and 6 days from 60% at the first day of storage. HOST result and mitochondria function in liquid semen also greatly decreased from the 4 days of storage.

Various species of nonpathogenic bacteria were isolated in raw and diluted(1:1) semen and the most frequently isolated contaminant bacteria in the raw semen were *Bacillus sp.*(75.0%), *Pseudomonas sp.*(67.9%) and *Staphylococcus sp.*(53.6%). *Bacillus sp.* in these bacteria counted for 30% of all contaminant bacteria. Bacteria contaminated in the diluted semen was similar to the raw semen, but *E. coli*, *Klebsiella sp.* and *Enterobacter sp.* was much more than in the raw semen. The degree of contamination in the raw and diluted semen varied among the AI Centers.

The number of bacteria isolated in the raw and diluted semen averaged $24.4 \pm 29.5 \text{cfu} \times 10^2 / \text{ml}$ and $10.4 \pm 18.2 \text{cfu} \times 10^2 / \text{ml}$. Bacterial counts in the diluted semen ranged from 3 to $104 \text{cfu} \times 10^2 / \text{ml}$ after the 6 days of storage. *Staphylococcus sp.* were found to be resistant to all 8 antibiotics and *Pseudomonas sp.* in some AI centers showed resistance against penicillin, streptomycin and erythromycin, a common preservative antibiotics used in commercial pig semen extender. *Corynebacterium sp.* in semen samples was found to be resistant to polymyxin B, erythromycin and spectinomycin. Treatment of linco/spectinomycin, gentamycin or amikacin alone into the semen samples were quite effective against predominant

contaminant bacteria. From the combined treatments with several antibiotics including the above antibiotics, no bacterial colonies yielded in semen and no decrease in sperm motility and sperm viability were appeared during the 6 days of storage.

Sperm freezing by using the extender supplemented with taurine(40mM) or α -tocopherol(500 μ M) alone and combined with these two antioxidants was not found to improve sperm viability, sperm motility and acrosome integrity. However, the combined supplementation greatly decreased generation of oxygen reactive species(ROS) and lipid peroxidation in frozed-thawed spermatozoa. Addition of sialic acid as an antioxidant into freezing extender during holding time of 12h before semen freezing slightly improved sperm motility after thawing. Pentoxifylline treatment before freezing showed improved sperm viability and HOST value after thawing and the treatment both before freezing and after thawing was found to improve the percent of acrosome-intact sperm as well as the sperm motility. Addition of 0.025~0.2M trehalose as a cryoprotectant substance into freezing extender increased sperm the viability after thawing, although there was not improved after cooling. The treatment of trehalose combined with 2~5mM EDTA significantly increased the viability and acrosome integrity of frozen sperm. In addition, trehalose treatment alone into extender greatly decreased in the generation of ROS in sperm.

HOST of boar semen was more relieable method to measure at 150mOsm/kg for 60min than at other hyoosmotic solutions and incubation times. HOST result in the liquid semen stored at 17°C was greatly decreased after the 4 days of storage. Individual variation in the HOST data among boars was more greater in the diluted semen(1:1) than in the raw semen and a great variation of HOST data occurred in the boars showing low HOST result than in the boars with high HOST result.

The most optimal time and temperature for measuring sperm acrosin activity was

found to be 60min at 25°C. A great variation in sperm acrosin activity was observed among the boars in raw and diluted(1:1) semen and the acrosin activity of sperm in raw semen was high 1.2 times that in diluted semen. Changes in sperm acrosin activity during semen storage was more smaller at 17~25°C than at 5°C and was greatly decreased in the semen collected in Aug than in that collected in May. The sperm acrosin activity of frozen semen greatly decreased to 63~84% of the raw and diluted semen. Decreasing rate of acrosin activity during semen storage varied among the individual boars. Sperm acrosin activity of raw semen was significantly positive correlations with HOST data of raw semen and acrosin activity of frozen semen and negative correlation with acrosome integrity after thawing. While the HOST result of raw semen showed positive correlation with the acrosin activity after thawing.

Sperm-IVF rates of liquid semen was significantly correlated with their acrosin activities and sperm motilities($r=0.88, 0.97$). In addition, sperm having $\geq 5.6\text{mU}$ acrosin activity resulted in high IVF rate and blastocyst development. The sperm with COMPat and SDat tended to yield low IVF rate, although there was not significant. Boar fertility was significantly correlated with their acrosin activity($r=0.80$) and HOST data($r=0.87$). In the first experiment, IVF rate of sperm was highly correlated with blastocyst development rate and the blastocyst development was correlated with litter size.

Variation in SCSA parameters was found to be related to boar age. Boars of 15~17 months of age showed high SCSA values and Larger variation in SCSA parameters were obtained for boars of <14 months of age and also in ejaculates from same individual boars was appeared from boars ≥ 17 months of age than those from <13 months of age.

In general, the boars having COMPat value of 4~5 and %peakR value ≤ 50 tended to be yield much more semen volume and semen dose per ejaculates than

the other boars group, respectively. Boars with ≤ 20 SDat value showed high sperm concentration and semen dose per ejaculate. As a result, these SCSA was therefore found to be valuable method for evaluating semen quality and production, since the boar group showing poor SCSA parameters seemed to be poor semen quality.

In addition, relatively high fertility and large litter size were obtained in boars group with COMPat value of 3~4, SDat value of 21~40, and %Red value of 5~6, respectively. However, these relationships were not significant.

Farrowing rate of liquid boar semen (81.5~87.3%) was higher than those of frozen-thawed boar semen (76.6~80.5%).

The non-return rates of mating types in gilt were 85.4% in artificial insemination treatment that was performed twice at 24 hours and 36 hours after injection of hormone, 72.9% in natural service treatment performed twice and 83.4% in natural firstly and artificial insemination secondly. Sows were showed 86.2% of non-return rate that was somewhat high reproductive result.

The gilts of three farms were taken Regumate (a kind of progesterone analogue) with feed stuff for 14 days or inserted Ring-CIDR into virgina for 14 days, and injected with hCG (300~500IU) at 24 hours after final treatment of Regumate or Ring-CIDR for estrus synchronization and injected with GnRH (300 μ g) at 108 hours after removal of Regumate or Ring-CIDR for synchronized ovulation. They were inseminated twice at 26 hours and 38 hours after injection of GnRH. The sows weaned were injected with hCG at 24 hours and then injected with GnRH at 80 hours after weaning. They were inseminated twice at 24 hours and 42 hours after injection of GnRH. The non-return rates in gilts were 89.1 and 88.0% in Regumate and Ring-CIDR and in sows were 90.9 and 93.3%, respectively. The farrowing rates in gilt with Regumate and Ring-CIDR and in sows with Regumate and Ring-CIDR were 86.7, 82.6, 88.6, and 91.1%, respectively.

When a dose of the sperm number was minimized down to 30.0, 25.0, 20.0, 17.5, 15.0, 12.5, 10.0 and 7.5×10^8 sperm/80ml that were above 70% motility, the of twice-AI were not significantly different as 72.3~89.3% of farrowing rates and

11.29~11.02 in litter size. There were not significantly different among the sperm doses.

The diluted semen were added with 0.1ml methylene blue solution and overlaid with liquid paraffin upto 1cm for isolation of oxygen permeation. The mixed solution was incubated in 45°C water bath and the durations of decoloration were examined. The bleaching time and the bleaching degree were evaluated as color index(-5~+5). The semen of good quality reduced methylene blue for 3-6 minutes, but those of poor quality didn't change the blue color for 9 minutes.

When liquid semen were stored for 1, 3 and 5 days at 17°C, sperm motility were 71.9%, 59.8% and 53.9%, respectively. At that time average pH of each group were 6.89, 6.84 and 7.06, respectively color indicator by methylene blue solution was vary useful to evaluate quality of liquid boar semen.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of study	1
Section 1. Necessity of research and development	1
1. Widespread and industrialization of AI	1
2. Improvement and application of AI techniques	2
Section 2. Contents and range of research	4
Chapter 2. Current domestic and outside technical status	5
Section 1. Domestic case	5
1. Quality management of semen	5
2. Supply of liquid and frozen semen	5
3. Relationship between IVF capacity and fertility of sperm	6
4. Research in estrus synchronization	6
5. Fertility of AI types	6
Section 2. Outside case	7
1. Quality management of semen	7
2. Research in liquid and frozen semen	7
3. Research in evaluating boar reproductive potential	8
4. Research in estrus synchronization	8
5. Research results by AI types	9
Chapter 3. Results of research and development	10
Section 1. Research in evaluating quality of commercial liquid semen	10
1. Introduction	10
2. Materials and methods	10

1) Semen samples and its storage	10
2) Evaluating characteristics and function of sperm	10
3) Statistical analysis	15
3. Results and discussion	15
1) CASA-motion patterns	15
2) Viability and acrosome integrity of sperm	18
3) HOST	22
4) Mitochondrial function	23
5) Correlation among semen characteristics	24

Section 2. Research in bacterial contamination in semen and effect of antibiotic treatment	25
1. Introduction	25
2. Materials and methods	25
1) Semen collection and sampling	25
2) Count of bacteria in semen	25
3) Identification of bacteria	25
4) Antibiotic treatment and its effect	26
3. Results and discussion	26
1) Effect of antibiotic treatment	26
2) Effect of holding time before semen freezing	31
3) Effect of trehalose treatment	32

Section 3. Effects of antioxidants and trehalose on semen freezing	35
1. Introduction	35
2. Materials and methods	35
1) Semen used	35
2) Preparing extender for antibiotic experiment	35
3) Preparing freezing extender for trehalose experiment	37
4) Evaluating semen characteristics and sperm function	38
3. Results and discussion	41

1) Effect of antibiotic treatment	41
2) Effect of holding time before semen freezing	48
3) Effect of trehalose treatment	48
Section 4. Semen evaluation for promoting semen quality	56
1. Introduction	56
2. Materials and methods	56
1) Boars and semen used	56
2) Evaluating semen characteristic and sperm function	56
3) Statistical analysis	58
3. Results and discussion	59
1) Optimal condition for HOST	59
2) Factors affecting HOST results	60
3) Correlations among semen characteristics and sperm functions	63
Section 5. Indirect prediction of boar fertility from sperm functional tests and IVF	71
1. Introduction	71
2. Materials and methods	71
1) Boars and semen used	71
2) In vitro maturation and fertilization of oocytes	71
3) In vitro culture of IVF-zygotes	73
3. Results and discussion	75
1) Semen characteristics and IVF rate	75
2) IVF rate and boar fertility	78
Section 6. Research in sperm chromatin structure assay(SCSA)	84
1. Introduction	84
2. Materials and methods	84
1) Boars and semen used	84

2) SCSA	84
3. Results and discussion	87
1) Variation sources in FCM-SCSA	87
2) Relationship between semen characteristics and SCSA results	90
3) Reproductive results and SCSA results	95
Section 7. Research in optimal techniques of AI and estrus synchronization in commercial pig farm	99
1. Introduction	99
2. Materials and methods	99
1) Development of optimized estrus synchronization and weekly	99
2) Development of quality control by simple color detection in boar liquid semen	101
3. Results and discussion	102
1) Optimizing estrus synchronization and weekly reproductive management on sows	102
2) Quality control by simple color detection on boar liquid semen	108
Chapter 4. Attainment of research purpose and contribution to related research field	110
○ Attainment of research purpose	110
○ Section 2. Contribution to related research field	1135
Chapter 5. Application plan of obtained research results	123
Chapter 6. Foreign information collected during research	124
Chapter 7. References	126

<차 례>

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구개발의 필요성	1
1. 돼지 인공수정기술 보급확대와 산업화	1
2. 인공수정기술의 향상과 적용	2
제 2 절 연구개발 내용과 범위	4
제 2 장 국내외 기술개발 현황	5
제 1 절 국내 기술의 현황	5
1. 정액의 품질관리 수준	5
2. 액상 및 동결정액 보급	5
3. 돼지정자의 체외수정 능력과 수태율과의 관계	6
4. 돼지 발정동기화기술 연구	6
5. 인공수정 형태별 번식성적	6
제 2 절 국외 기술의 현황	7
1. 정액의 품질관리	7
2. 돼지 액상 및 동결정액 연구	7
3. 종모돈의 번식능력 평가방법의 연구	8
4. 돼지 발정동기화 기술 연구	8
5. 인공수정 형태에 따른 번식성적	9
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	10
제 1 절 시판 돼지 액상정액의 질적 평가에 관한 연구	10
1. 서 론	10
2. 재료 및 방법	10

가. 공시정액과 보관	10
나. 정액 성상 및 정자기능 검사 방법	10
다. 통계분석	15
3. 결과 및 고찰	15
가. CASA의 정자 운동양상	15
나. 정자 생존율과 정상침체율	18
다. HOST(저삼투성 팽창화 검사)	22
라. 정자의 미토콘드리아 기능	23
마. 액상정액 성상간의 상관	24
제 2 절 돼지 정액내 세균오염과 항생제 첨가효과에 관한 연구	25
1. 서 론	25
2. 재료 및 방법	25
가. 정액 채취 및 시료 수집	25
나. 정액내 세균수 측정	25
다. 분리세균의 동정	26
라. 항생제 감수성 조사	26
마. 정액내 항생제 첨가효과 조사	26
3. 결과 및 고찰	26
가. 정액내의 세균오염도	26
나. 정액내 세균의 항생제 감수성	31
다. 정액내 항생제 투여효과	32
제 3 절 동결정액에서의 항산화제 및 Trehalose 첨가효과에 관한 연구	35
1. 서 론	35
2. 재료 및 방법	35
가. 공시정액	35
나. 항산화제 첨가실험을 위한 동결정액의 제조	35
다. Trehalose 첨가실험을 위한 동결정액의 제조 및 용해	37
라. 정액성상 및 정자기능 검사 방법	38

3. 결과 및 고찰	41
가. 항산화제 첨가효과	41
나. 정액 동결전 정액방치시간 효과	48
다. Trehalose의 첨가효과	48
제 4 절 정액의 품질개선을 위한 정액성상 평가법에 관한 연구	56
1. 서 론	56
2. 재료 및 방법	56
가. 공시 종모돈과 정액	56
나. 정액성상 및 정자기능 검사	56
다. 통계처리	58
3. 결과 및 고찰	59
가. HOST의 조건	59
나. HOST 결과에 영향을 주는 요인	60
다. 정자 Acrosin 수준	63
라. 정액성상, 정자 기능측정치간의 상관	68
제 5 절 정자 기능평가 및 체외수정에 의한 종모돈의 수태성적 간접 평가에 관한 연구	71
1. 서 론	71
2. 재료 및 방법	71
가. 공시 종모돈과 정액	71
나. 정액성상 및 정자기능 검사	71
다. 난자의 체외성숙과 체외수정	73
라. 수정란의 체외배양	74
마. 통계처리	74
3. 결과 및 고찰	75
가. 정액성상과 체외수정율	75
나. 체외수정율과 수태율	78

제 6 절 돼지 정자의 정자염색질구조검사(SCSA)에 관한 연구	84
1. 서 론	84
2. 재료 및 방법	84
가. 공시 종모돈과 공시정액	84
나. 정자 염색질 구조검사(SCSA)	84
3. 결과 및 고찰	87
가. FCM-SCSA결과의 변이 요인	87
나. SCSA결과와 정액성상과의 관계	90
다. FCM-SCSA와 종모돈의 번식성적	95
제 7 절 전업 양돈농가 중심의 최적 인공수정 및 발정동기화기술 개발	99
1. 서 론	99
2. 재료 및 방법	99
가. 최적 발정동기화 및 주간 번식관리 유도기술 개발	99
나. 색도에 의한 액상정액의 간편 품질식별기술 개발	101
3. 결과 및 고찰	102
가. 최적 발정동기화 및 주간 번식관리 유도기술 개발	102
나. 색도에 의한 액상정액의 간편 품질식별기술 개발	108
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	110
○ 정액품질 평가 및 향상기술, CASA와 번식성적 상관 연구	110
1. 목표달성도	110
2. 관련분야 기여도	110
○ 최적 인공수정 및 발정동기화기술 개발	113
1. 목표의 달성도	113
2. 관련분야 기여도	114
제 5장 연구개발결과의 활용계획	123
○ 정액품질의 평가 및 향상기술, SCSA와 번식성적 상관연구	123

○ 최적인공수정 및 발정동기화기술 개발	123
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술의 정보	124
1. 정액의 품질관리	124
2. 돼지 액상 및 동결정액 연구	124
3. 종모돈의 번식능력 평가방법의 연구	125
4. 돼지 발정동기화 기술 연구와 인공수정 형태	125
제 7 장 참고문헌	126

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 돼지 인공수정기술 보급확대와 산업화

국내에서 액상정액을 공급하는 돼지 인공수정센터는 영세성과 지역성을 벗어나지 못한 실정이며 현재 공급되고 있는 액상정액은 수송비가 정액 값의 약 30%정도를 차지하고 있다. 또한 보유 종모돈의 활용도가 낮고 정액수요와 공급의 불일치에 따른 정액 낭비가 심한 실정이다. 이러한 정액 낭비를 최소화하고 수송비용을 절감하기 위해서 동결정액의 생산 공급 기술의 개발이 시급히 요구되고 있다. 한편 정액의 품질 고급화로 수태율을 높이고 인공수정 효율을 극대화 할 수 있는 기술개발도 매우 절실한 현실이다.

종돈개량을 위하여 핵군돈에 고능력 종모돈의 동결정액 보급과 이용이 확대되어야 하며 차후 민간부분에서 주도할 수 있는 동결정액 제조가 가능하도록 최적 동결정액 생산기술의 개발이 시급하다. 동결정액은 액상정액이 공급되지 않는 지역이나 요일에도 이용이 가능한 체제로 전환할 수 있다.

액상 및 동결정액 활용의 산업화가 더욱 촉진되기 위해서는 공급자는 생산 원가절감을 위한 물류비용 부담을 줄여야 하고 수요자인 농가단위에서는 정액이용도를 높이고 정액의 품질을 손쉽게 판별할 수 있도록 하고 능동적인 인공수정기술을 적용토록 유도하여 계획교배에 의한 생산성 증대와 개량 속도를 가속화시켜야 한다.

국내의 돼지 인공수정 사업이 지역 간 격차가 매우 심하고 인공수정 비용은 농가에 큰 부담이 되고 있다. 앞으로 인공수정의 이익이 농가에 직접 전달되고 정액 생산비가 절감되어야 하며 농가 보유 종모돈을 국가적 차원에서 계속 줄여나가야 한다. 자연종부를 인공수정으로 전환시 국가 전체에 필요한 종모돈 수를 크게 감소시킬 수 있으며 자연종부를 인공수정으로 전환시 연간 막대한 비용절감 효과를 기대할 수 있다.

돼지 인공수정의 기반이 조성될 경우 국내 종돈개량 및 번식효율이 크게 증진될 뿐만 아니라 규격돈 생산에 따른 돈육수출이 크게 증대될 것이다. 특히 국내 인공수정기술과 동결정액 활용이 산업화되고 국제경쟁력을 확보할 경우 돼지 액상 및 동결정액의 수출과 함께 관련산업의 해외 진출도 유리하게 촉진 될 것으로 전망된다.

돼지 인공수정의 확대보급에 따른 종모돈의 감축효과는 축산폐기물량도 크게 감소시킬 수 있다. 또한 자연종부에서 기인되는 양돈장의 만성질병 발생율을 줄일 수 있다.

따라서 소비자에게 보다 위생적이고 저렴한 돈육의 공급과 소비촉진으로 사회경제와 국민보건 향상에도 크게 이바지하게 될 것이다.

2. 인공수정기술의 향상과 적용

크히 일부의 대형 AI 센터에서는 정액성상 검사와 품질관리를 위한 시설을 다소 구비하고 있으나 많은 영세 AI 센터에서는 광학현미경에 의한 일반성상 평가의 범위를 벗어나지 못하고 있다. 최근에 개발되고 있는 자동정액분석기의 경우 정자농도와 정자 활력의 측정 정확도가 높고 간편하기 때문에 구입 활용이 요구되나 가격이 비싼 단점을 갖고 있다. 특히 정자의 기능과 구조를 평가할 수 있는 새로운 방법들이 최근 많이 개발되고 있는데 이 방법을 이용할 수 있는 형광현미경 또는 flow cytometry 설치도 고품질 정액 생산과 번식성적 향상을 위해서 필요하다.

정액의 세균오염 방지 또는 질병차단을 위한 수단으로 정액내 항생제 첨가가 적절히 행해지고 있는지에 대한 보고가 국내에는 거의 없다. 또한 항생제가 경제적이면서 내성을 줄일 수 있도록 이용되고 있지 못하다. 최근 발생되고 있는 전염병들이 정액을 통한 발생의 가능성도 배제할 수 없는 실정이다.

앞으로 보다 간편하고 정확한 정액품질 관리방법의 개발이 요구되고 있으며 세균억제범위가 넓고 내성을 최소화하고 경제성을 갖는 항생제 투여법도 인공수정의 번식능력을 높이고 질병예방을 위해서 필요한 실정이다.

현재 액상정액용 보존액으로서 국산 및 수입제품이 통용되고 있으나 실제 보존성이 선전만큼 양호하지 못한 실정이다. 국내에서 사용되는 희석액은 1~7일간 보존과 17℃ 보존온도가 주축을 이루고 있다. 그러나 수입제품은 그 조성분에 따라 제조 후 사용시 결과에 많은 차이가 나타나고 있다. 국내 AI 센터의 영세성, 지역한계성 등으로 정액수송상에 어려움과 더불어 보존기간도 1~2일로 짧아 AI 경비부담이 크다. 한편 정액 수요공급의 불일치는 정액의 낭비는 물론 보존상 문제, 수송문제 등의 어려움 때문에 자가생산 정액의 인공수정이 많이 행해지고 있으며 따라서 종돈 개량에도 큰 장애요인이 되고 있다.

최근 돼지에서 체외수정기술에 관한 연구가 많이 행해져 왔다. 그러나 이들 체외수정 결과가 실제 종모돈 정액의 수태율과의 상관관계에 대한보고는 아직 일치된 결과들이

아니다. 그러나 앞으로 많은 연구 수행을 통해서 수태율이 향상이 크게 향상될 것으로 기대되고 있다. 이와 관련된 연구의 하나인 정자염색질구조 검사(sperm chromatin structure assay, SCSA)에 대한 결과가 정액품질평가와 수태율이 우수한 종모돈 선발에 응용될 것으로 기대되고 있다.

국내에서 돼지 발정동기화기술에 대한 연구와 응용은 그렇게 많지 않다. 현재 regumate, PMSG, HCG, altrenoget 등을 병용하여 75-85%의 발정 유기율이 보고 되었고 인공수정 후 수태율은 70-80% 정도이다.

돼지 인공수정의 형태는 자연교배와 인공수정의 복합이용 또는 혼합정액에 의한 인공수정이 행해지고 있으나 인공수정결과를 평가할 수 있는 체계가 확립되어 있지 못한 실정이다.

제 2 절 연구개발 내용과 범위

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
<p>○ 제 1 세부과제 정액품질의 평가 및 향상 기술 개발 (주관기관 : 중앙대학교)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정액품질(정액성상과 정자기능) 평가법과 간편화기술 개발 ○ 세균부재(위생적) 정액 생산기술 개발, 세균 종류별 오염도 및 특성, 항생제와 정액성상 관계 ○ 동결정액 기술개발, 첨가물 개발과 정자 동결손상의 최소화 ○ 종모돈 정액의 수정능 및 수태율 제외 간접평가 기술개발, 수태성적 조사
<p>○ 제 2 세부과제 전업 양돈농가 중심의 최적 인공수정 및 발정동기화 기술개발 (협동기관 : 축산기술연구소)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 발정동기화기술 개발, 방법간의 발정발현, 수태 및 분만성적, 주간 번식관리 유도기술 개발 ○ 최적 인공수정기술 개발, 종부형태와 분만성적, 1회 주입정자수 최소화 , 정액 주입형태와 번식성 적, 특정요일과 예정일공수정기술 ○ 색도에 의한 액상정액의 간편 품질식별 기술 개발, 보존시간중 정액의 색상 및 pH, 색상지시도와 수태율 비교
<p>○ 위탁과제 종모돈 정자의 염색질구조 특성과 번식성적과의 상관 연구(협동기관 : 다비인티)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 품종, 개체간 정자염색질구조검사 (sperm chromatin structure assay, SCSA)특성 비교, 종모돈 정액생산능력 비교, SCSA와 수태성적 비교

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술의 현황

1. 정액의 품질관리 수준

극히 일부의 대형 AI 센터에서는 정액성상 검사와 품질관리를 위한 시설을 다소 구비하고 있으나 많은 영세 AI 센터에서는 광학현미경에 의한 일반성상 평가의 범위를 벗어나지 못하고 있다. 최근에 개발되고 있는 자동정액분석기의 경우 정자농도와 정자 활력의 측정 정확도가 높고 간편하기 때문에 구입 활용이 요구되나 고가의 기기인 단점을 갖고 있다. 특히 정자의 기능과 구조를 평가할 수 있는 새로운 방법들이 최근 많이 개발되고 있는데 AI 센터에서는 이 방법을 이용할 수 있는 형광현미경 또는 flow cytometry 설치도 고품질 정액 생산과 번식성적 향상을 위해서 필요하나 아직 대부분 AI 센터에는 구비되어 있지 않다.

정액의 세균오염방지 또는 질병차단을 위한 수단으로 정액내 항생제 첨가가 적절히 행해지고 있는지에 대한 보고가 국내에는 거의 없다. 또한 항생제가 내성을 줄일 수 있도록 이용되고 있지 못하다. 최근 발생되고 있는 여러 질병들이 정액을 통한 발생의 가능성도 배제할 수 없는 실정이다. 앞으로 보다 간편하고 정확한 정액품질 관리방법의 개발이 요구되고 있으며 세균억제범위가 넓고 내성을 최소화하고 경제성을 갖는 항생제 투여법도 정액의 품질개선, 인공수정 비용의 절감 및 질병예방을 위해서 필요한 실정이다.

2. 액상 및 동결정액 보급

현재 액상정액용 보존액으로서 국산 및 수입제품이 통용되고 있으나 실제 보존성은 만족할 수준에 이르지 못하고 있는 실정이다. 국내 AI 센터의 영세성과 지역한계성 등은 정액생산과 보급에 어려움을 가중시키고 있다. 한편 정액 수요공급의 불일치는 정액의 낭비는 물론 정액보존과 정액수송 유통의 어려움 때문에 자가생산 정액의 인공수정이 많이 행해지고 있으며 종돈개량의 효율도 낮은 실정이다.

정액 보존액의 개선을 위하여 윤 등(1986)은 소 혈청 일부민과 당류, 정 등(1986)은 혈장단백질의 첨가에서 신선정액 및 동결정액의 품질을 크게 향상시킨 바 있다.

이와 김 등(1999)은 heparin의 첨가로 동결 용해후 활력이 높게 유지되었고 glycerol 이 다른 동해보호제보다 활력에 유리하다고 보고하였다. 이 등(1998)은 percoll gradients 로 포장된 돼지 동결정자의 이용으로 체외수정율을 높일 수 있었다. Kim 등(1998)은 BTS 보존액으로 1~3일 보존된 액상정액의 수태율 및 산자수는 각각 86.5% 및 10.2두 이었다고 보고하였으며, 액상정액의 1회주입 정자농도가 $1.5\sim 5.0\times 10^9$ 범위 내에서는 농도간에 수태율과 산자수에 차이가 없다고 보고하였다. 정 등(1999)은 돼지 인공수정용 희석액 KpA에서 17℃에서 각각 5일간 보존할 수 있었다.

3. 돼지정자의 체외수정 능력과 수태율과의 관계

최근 돼지에서 체외수정기술에 관한 연구가 많이 행해져 왔으나 이들 정자의 체외수정결과가 실제 종모돈 수태율과의 상관관계를 조사한 보고는 많지 않다. 현재 돼지 인공수정의 수태율과 체외수정율에 대한 기초자료가 축적되고 있으며 수태율 향상에 기여할 것으로 기대되고 있다. 이와 관련된 연구로 정자염색질구조 검사(sperm chromatin structure assay, SCSA)에 대한 연구결과가 국내 가축에서 아직 보고된 바 없다.

4. 돼지 발정동기화기술 연구

국내에서는 이 등(1992)이 regumate와 PMSG, HCG를 병용하여 86%의 발정 유효율을 보고하였으며 장 등(1995)은 altrenogest 투여 중지후 4-12일 사이에 87%의 발정을 보고하였다. 또한 조 등(1999)은 altrenogest의 마지막 투여후 24시간에 PMSG(1000IU) 투여로 84%의 발정과 2회 인공수정에서 84%의 수태율을 보고한 바 있다.

5. 인공수정 형태별 번식성적

자연교배와 인공수정의 복합이용 또는 혼합정액에 의한 인공수정이 행해지고 있으나 아직 국내에서는 인공수정 형태별 장단점 및 효과적인 운영형태 등을 객관성 있게 비교 분석할 수 있는 실증적 보고가 거의 없는 실정이다.

제 2 절 국외 기술의 현황

1. 정액의 품질관리

AI 센터를 중심으로 사용될 수 있는 자동정액분석기(CASA와 flow cytometry)가 개발 활용되면서부터 정액처리 과정과 정액품질 관리가 보다 신속 간편하고 정확하게 수행되고 있다(Farrell 등, 1998). 특히 최근 정자의 구조와 기능을 보다 정확히 평가할 수 있는 방법들이 개발되고 있다. 그 중의 일부는 이미 상품화된 kit들도 있다. 정자의 두부와 세포막 손상 또는 생존성 검사 방법으로서 종전의 염색방법이 아닌 형광염색방법이 많이 연구되고 있다(Malmgren, 1997; Maxwell과 Johnson, 1997, Thomas 등, 1997) 특히 최근 돼지정자의 경우 acrosin 활성(Glogowski 등, 1998), HOST, hypoosmotic swelling test(Vazquez 등, 1997)도 매우 유용한 방법으로 제시되고 있다.

또한 미토콘드리아 기능검사가 최근 정액품질 평가법으로 검토되고 있다(Windsor와 White, 1995; Cummins 등, 1994; Bourgeron, 2000). 정자염색질구조의 이질성 검사는 종모축의 변식력 저하 원인, 수태율 예측, 정액 품질관리의 지표로서 이용될 수 있는 것으로 보고되었다(Ballachey 등, 1988; Andreetta 등, 1995; Evenson과 Jost, 1994). 돼지정액에 오염될 수 있는 세균은 약 13종이상으로 보고되어 있고 그중 E. coli를 포함한 약 5종류의 장내세균은 액상보존시 정자생존성 저하와 침체이상율을 높이는 원인으로 나타나 있다(Sone, 1982). 항생제 첨가도 최근에는 항생제의 새로운 조합에 관한 연구가 진행중이다(Althouse 등, 2000; Glossop, 1991).

2. 돼지 액상 및 동결정액 연구

시판되는 액상정액 희석액은 여러 종류가 있으며 15~20℃의 보존이 주축을 이루고 있다. 돼지 인공수정의 변식성적을 보면 일본의 경우 동결정액이 액상정액에 비해 10% 정도 수태율이 낮으며 산자수도 복당 1~2두 낮기 때문에 동결정액 보급이 저조한 실정이다.

액상정액에 관한 연구로 Waberski 등(1994)은 액상정액으로 수정한 결과 보존시간에 따라 평균 임신율이 40~90%로 차이가 많은 것으로 보고하였으며, Korniewicz 등(1996)은 Androhep 희석액에서 3일과 5일간 보관된 정액의 수태율이 각각 64% 및 50%이었고 산자수도 각각 10 및 9로 보고하였다. 1980년 19개국에서 동결정액의 인공수정에서 조사된 평균 수태율은 53%(30~65%) 수준이었다.

동결정액의 산업화와 수태율 향상을 위해서 동결과정에서 동해방지제 농도, 희석제 조성분, 동결속도 및 용해조건, 포장방법 등에 대하여 더욱 많은 연구가 요구되고 있다 (Bwanga 등, 1991). 희석액의 첨가성분으로는 당류와 단백질이 이용되나 특히 인지질 단백질의 보호기전은 더 규명되어야 한다. 용해온도와 시간도 매우 중요한 요인이 되고 있으며 용해액의 최적조건도 중요한 부분이다(Bwanga, 1991). 또한 동결용해후의 운동성 저하 정도가 종모돈의 계통간에 차이도 보고되었다(Woelders 등, 1996).

3. 종모돈의 번식능력 평가방법의 연구

우수 종모돈의 선발시 정액생산능력이 조기에 판정될 경우 종돈 생산비용을 크게 절감시킬 수 있다. 최근 많이 연구되고 있는 정자 염색질구조 검사법(SCSA, sperm chromatin structure assay)이 이런 목적에 이용될 수 있는 유용한 방법으로 제시 되고 있다.

종모우에서도 염색질 이질성(chromatin heterogeneity)에 대한 감수성이 개체간에 차이가 있으며 수태율과도 상관이 높다고 Evenson과 Ballachey(1986)이 보고하였으며 Ballachey 등(1988)은 이질성이 높은 개체에서 정액의 질과 수태율이 저하됨을 보고하였다. 한편 Sailer 등(1996)은 정액성상 검사시 염색질검사를 추가하여 정액질을 크게 향상시킬 수 있었다. 또한 Andreetta 등(1995)은 저수태율의 종모우 검색에 매우 유용한 방법이 됨을 보고하였다. 체외수정(IVF)에 의해 종모돈의 수태율을 예측할 수 있다 (Ivanova와 Mollova, 1993). Martinez 등(1993)은 정자침입율에서 종모돈간에 개체 차이가 현저하며, Gadea 등(1998)은 수태율에 차이를 보이는 종모돈 군 간에 난자내 정자침입율에 현저한 차이가 있음을 보고하였다.

4. 돼지 발정동기화 기술 연구

현재 외국에서 발정동기화에 이용되고 있거나 실험중인 약제로는 altrenogest, Ru2267 (trenbolone, regumate), norgestomet, prostaglandin 등이 있으며, 단독 또는 PMSG와 HCG등의 호르몬제와 복합이용 방법들이 사용되고 있다. 그러나 이들의 장단점 및 이용 효율에 대해서 더욱 연구가 진행중이다.

Itoh 등(1992)은 altrenogest 이용으로 94%의 발정을 보고하였다. Wood 등(1992)은 altrenogest 제거후 5.5일(미경산돈), 7.4일(경산돈)에 발정이 오며 10일 이내에 85-92%가 발정되었는데 투여용량과 투여기간이 발정동기화에 주요 요인임을 보고하였다. 한편

Martinat-Botte 등(1995)은 altrenogest 투여후 발정에서 fixed-time 인공수정으로 효과적인 번식성적을 얻을 수 있었다. Martinat-Botte 등(1990)은 발정동기화와 주간 관리 체계하에서 예정시각 인공수정기법을 도입하여 altrenogest을 18일 동안 1일 20mg씩 투여하여 발정유기를 시킨 후 인공수정하였을 때 더 높은 분만율과 산자수를 얻을 수 있었다.

5. 인공수정 형태에 따른 번식성적

Glossop(1991)은 AI/AI(2회)보다는 NS/AI 또는 2두 종모돈의 AI/AI에서 분만율 및 산자수가 현저히 증가된다고 하였으며 Flowers와 Alhusen(1992)은 1회 NS보다는 NS/AI, AI/AI, NS/NS에서 미경산돈의 경우 분만율과 산자수가 크게 증가되며 경산돈에서도 AI/AI에서 분만율, NS/NS와 NS/AI에서 산자수가 각각 크게 증가됨을 보고하였다. 비육돈생산에서는 AI 노력과 과정의 편의상 혼합정액의 이용도 권장되고 있다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 시판용 돼지 액상정액의 질적 평가에 관한 연구

1. 서 론

지난 10년간 돼지의 액상정액을 이용한 인공수정의 보급률이 각 국가별로 급증되어 왔다. 국내의 양돈장에서도 전염병예방, 우수종돈의 유전자원이용 및 종돈사육의 경제성에 대한 중요성이 강조되면서 인공수정 보급률이 50%를 넘고 있으며 상업용 AI센터도 50여 개소에 이르고 있다. 그러나 국내에서 유통되고 있는 액상정액의 질적 수준이 어느 정도인지에 대한 신빙성 있는 자료가 보고되어 있지 않다. 뿐만 아니라 액상정액의 질적 향상을 위한 연구노력도 극히 미약한 상태이며 현재 사용되고 있는 희석액도 거의 수입에 의존하고 있는 실정이다. 앞으로 국내 인공수정기술의 정착과 기술향상을 위해서 정액품질에 대한 정확한 정보가 요구되며 또한 질적 향상을 위한 노력이 반드시 필요하다. 본 연구에서는 이러한 현실과 문제점을 해결하기 위한 목적으로 시도되었다.

2. 재료 및 방법

가. 공시정액과 보관

공시된 액상정액은 인공수정 센터 5곳에서 사육중인 요크셔, 듀록, 랜드레이스 3개 품종으로부터 당일 채취하여 제조된 시판용 액상정액을 공시하였다. 각각의 AI센터에서 생산된 시판정액을 실험실로 운반한 다음 17℃ 저장고에서 수일간 보존하면서 정액성상을 조사하였다.

나. 정액 성상 및 정자기능 검사 방법

1) 기본 buffer

본 연구에서 사용된 기본 buffer액은 calcium chloride와 magnesium chloride가 첨가되지 않은 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)을 사용하였다.

2) CASA(computer-assisted sperm analysis)에 의한 운동성 조사

정액 1.5ml을 취하여 30분간 37°C수조에서 배양시키고 37°C로 예열된 Makler counting chamber(Sefi-Medical, Israel) 위에 정액 10 μ l을 떨어뜨린 후 CCD 카메라 (Toshiba, Japan)가 부착된 광학현미경(Olympus, Japan)에 연결된 SAIS system(Sais puls version 10.1)을 이용하여 분석하였다. 정자의 활력(MOT, %), 곡선 운동속도(VCL, μ m/s), 직선운동속도(VSL, μ m/s), 평균경로속도(VAP, μ m/s), linearity (LIN, VSL/VCL, %), 두부측방 이동거리(ALH, μ m/s)와 straightness(STR, VSL/VAP, %)를 측정하였다. 본 실험에서 사용된 CASA system의 초기 설정은 표 1과 같았다(Zeng 등, 2001) .

표 1. CASA설정 parameters

기	준	기준치
온도		: 37°C
Capture field 수		: 10
Frame 수		: 30
Edege filter 0.08 threshold		: 7
최고 세포크기 (Pixels)		: 80
최저 세포크기 (Pixels)		: 15
Frames tracks 최저 수치	: Motility	: 5
	: Velocity	: 10
	: ALH	: 12
항진운동 정자 threshold	: VCL (μ m/s)	: 80
	: LIN(%)	: 65
	: ALH(μ m)	: 5.5
VAP 속도 threshold	: Medium(μ m/s)	: 50
	: Slow(μ m/s)	: 20
최고 velocity(um/s)		: 250
Threshold 속도(um/s)		: 10

3) 정자의 생존율 측정

Garner 와 Johnson (1994, 1995)의 방법을 이용하였다. 형광 염색시약 SYBR-14와 PI(propidium iodide)는 미국 Molecular Probes사의 LIVE/DEAD Sperm Viability Kit를 사용하였으며 stock 및 working solution과 염색방법은 아래와 같다.

가) Stock solution

SYBR-14의 stock solution은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 1mg/ml되게 만들었으며 PI는 sodium bicarbonate가 첨가된 Tyrodes salt solution에 2mg/ml로 만들었다. 각각 빛이 차단된 eppendorf tube에 20 μ l씩 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하여 사용하였다.

Working Solution은 SYBR-14 stock solution을 1:100으로 DMSO에 희석하여 최종 농도가 0.01mg/ml되게 만들었으며 빛이 차단된 eppendorf tube에 20 μ l씩 분주하여 -20 $^{\circ}$ C 보관하고 사용직전 암실에서 녹여 사용하였다.

나) 염색방법

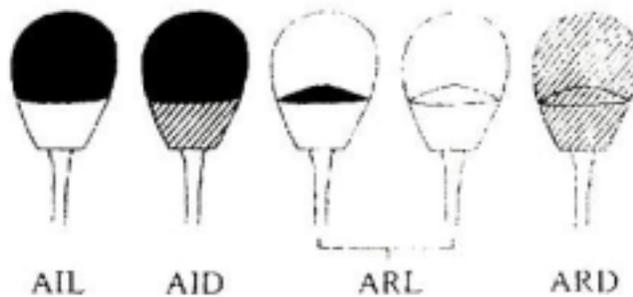
액상정액 500 μ l를 취하여 eppendorf tube에 넣은 다음 SYBR-14 working solution 2.7 μ l와 PI 2 μ l를 넣어 혼합하였다. 37 $^{\circ}$ C의 heating block에 15분간 배양시킨 후 미리 36 $^{\circ}$ C로 배양된 D-PBS(Gibco, BRL USA)로 2번 세척을 한 다음 10 μ l를 slide에 취하여 slide당 최소 200개 이상의 정자를 형광현미경 H600 AFL 50/100(Hund Wetzlar, Germany)에서 관찰하였다. 살아있는 정자는 SYBR-14 염색에서 녹색으로 보이는 것, 죽은 정자는 PI 염색에서 붉은 색으로 염색되는 것으로 구분하였다. 정자 생존율은 총 관찰된 정자중 SYBR-14로 염색된 정자의 비율로 계산하였다.

4) 정자의 첨체온전성(acrosome integrity) 검사

PI(Propidium iodide)는 Garner(1986)등의 방법을 일부 수정하여 만들었다. D-PBS에 0.04mM(0.27mg/ml) 농도로 PI를 녹인 후 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. FITC-PAS는 Cross 등(1986)의 방법에 준하였다.

액상정액 0.3-0.5ml를 취한 후 PI로 10~15분간 실온에서 염색한 다음 D-PBS를 넣고 300 \times g에서 10분간 원심분리하여 2회 세척하였다. FITC-PSA의 염색을 위해 95% ethanol을 0.5-1.0ml 넣고 혼합 후 30분간 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 그 후 ethanol의 제거를 위해 2회 원심분리를 하고 pellet에 D-PBS를 첨가한 후 40 μ l의 FITC-PSA를

첨가하고 잘 혼합하였다. 깨끗한 slide에 40-60 μ l을 취한 다음 형광현미경(H600 AFL 50/100m, Hund Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다. 염색된 색과 모양에 따라 Sukardi(1997)의 방법에 따라 염색결과를 4형태로 분류하였으며, 그림 1과 같이 AIL (첨체정상 생존정자), AID(첨체정상 죽은 정자), ARL(첨체반응 생존정자) 그리고 ARD(첨체반응 죽은 정자)로 구분하여 관찰하였다.



- : Pisum sativum agglutinin(PSA, 초록색)
- ▨ : Propidium iodide (PI, 적색),
- : 무형광

그림 1. PSA와 PI로 염색 후 첨체상태와 생존성의 구분형태(Sukard, 1997).

- AIL(acrosome intact, live sperm) : 첨체정상 생존정자
- AID(acrosome intact, dead sperm) : 첨체정상 죽은 정자
- ARL(acrosome reacted live sperm) : 첨체반응 생존정자
- ARD(acrosome reacted dead sperm) : 첨체반응 죽은 정자

5) 저삼투성 팽창화 검사 (HOST, hypoosmotic swelling test)

Jeyendran 등(1984)의 방법에 준하여 HOST를 실시하였다. 정액을 1.5-ml eppendroup tube에 담아 500×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 삼투압 150mOsm/kg으로 제조된 저삼투압액 (증류수 1ℓ에 fructose 13.51g, sodium citrate 7.35g)와 혼합한 후 37℃의 수조 내에서 30분간 배양시켰다. 10μl를 slide에 놓고 위상차 현미경하에서 200개 이상의 정자를 관찰하였다. 정자의 미부팽창의 유형은 그림 2와 같이 분류하였다.

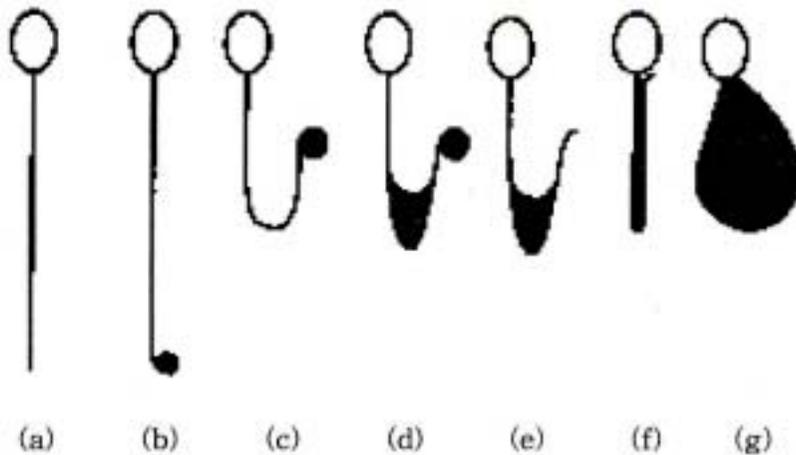


그림 2. 정자미부의 저삼투압액에서 팽창형태 분류(Jeyendran 등, 1984).

전혀 팽창 되지 않은 정자(a), 미부 말단만 팽창되어 굴곡된 정자(b), 말단 팽창과 굴곡된 정자(c), 미부 중간부위와 말단이 동시에 팽창된 정자(d), 미부 중간 부위만 팽창된 정자(e), 미부가 전반적으로 팽창되어 막대모양을 한 정자(f), 미부가 전반적으로 팽창되어 눈사람 형태로 된 정자(g)로 각각 구분하였다. HOST결과(%)는 판독된 정자의 총수에 미부가 팽화된 b-g유형의 비율로 계산하였다.

6) Mitochondria기능 분석

Windsor 와 White (1993)의 방법에 따라 Rhodamine 123(R123)를 사용하여 정자 중편부의 미토콘드리아를 염색하였다. 액상정액을 1-1.5×10⁶/ml되게 희석한 후 500μl

를 취하여 R123이 5 μ g/ml이 들어있는 BO배양액을 0.5ml 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 염색후 BO 배양액을 10ml이 되게 부유하여 500 \times g에 5분간 원심분리 세척한 후 같은 방법으로 한번 더 세척하였으며 세척 후 10 μ l취하여 slide위에 놓고 cover glass로 덮은 후 형광현미경(H600 AFL 50/100, Hund Wetzlar, Germany)하에서 관찰하였다. 200개의 정자를 관찰하여 총 정자 중에서 R123을 발현하는 정자의 비율을 계산하였다.

다. 통계분석

얻어진 결과에 대한 통계학적 분석은 SAS의 GLM(General Linear Model)을 이용하여 분석하였고 각 결과에 대한 유의성 검정은 Duncan's Multiple Range Test를 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. CASA의 정자 운동양상

국내 시판용 돼지 액상정액의 품질평가와 개선방향을 찾기 위하여 시도된 연구결과에서 액상정액의 보존기간(일)에 따른 정자의 운동양상 CASA 결과는 표 1과 같다. 정자활력이 보존 2일부터 크게 저하되었고 보존 6일에는 제조당일(68%)보다 현저히 낮은 38%였다. 정자활력 이외의 운동양상은 대체로 4일 이후에 현저히 낮았다. CASA 결과를 5개 AI센터별로 구분하여 AI센터간의 특성을 보면 그림 1-3과 같다. C센터가 CASA 전체 항목에서 우수하였고 D센터가 가장 낮았으며 나머지 3센터는 중간위치를 나타냄으로서 센터간의 정자 운동양상의 많은 차이가 확인되었다.

표 1. 돼지 액상정액의 보존기간에 따른 정자 운동양상의 변화

운동양상	보존기간(일)			
	0	2	4	6
MOT ¹⁾	68.0±8.8 ^a	53.3±14.9 ^b	46.3±15.7 ^b	36.0±17.8 ^c
VCL ²⁾	49.3±10.7 ^a	56.6±12.6 ^a	49.2±13.7 ^a	38.1±19.1 ^b
VSL ³⁾	28.2±8.2 ^a	27.5±9.1 ^a	21.8±8.9 ^b	13.8±9.0 ^b
VAP ⁴⁾	39.9±8.7 ^a	36.4±9.6 ^a	30.4±10.4 ^b	21.2±11.9 ^b
LIN ⁵⁾	56.2±8.1 ^a	46.7±10.4 ^b	43.2±10.9 ^b	33.8±9.5 ^c
ALH ⁶⁾	4.0±0.4 ^b	4.4±0.6 ^a	4.3±0.7 ^a	3.7±1.1 ^b
STR ⁷⁾	75.4±5.3 ^a	72.8±6.6 ^{ab}	69.9±6.8 ^b	61.0±11.1 ^c

* 평균±표준편차, ^{a,b,c} P<0.05.

¹⁾ MOT : motility(%)

²⁾ VCL : curvilinear velocity($\mu\text{m/s}$),

³⁾ VSL : straight line velocity ($\mu\text{m/s}$)

⁴⁾ VAP : average path velocity ($\mu\text{m/s}$)

⁵⁾ LIN : linearity(%)

⁶⁾ ALH : amplitude of lateral head displacement(μm)

⁷⁾ STR : straightness(%)

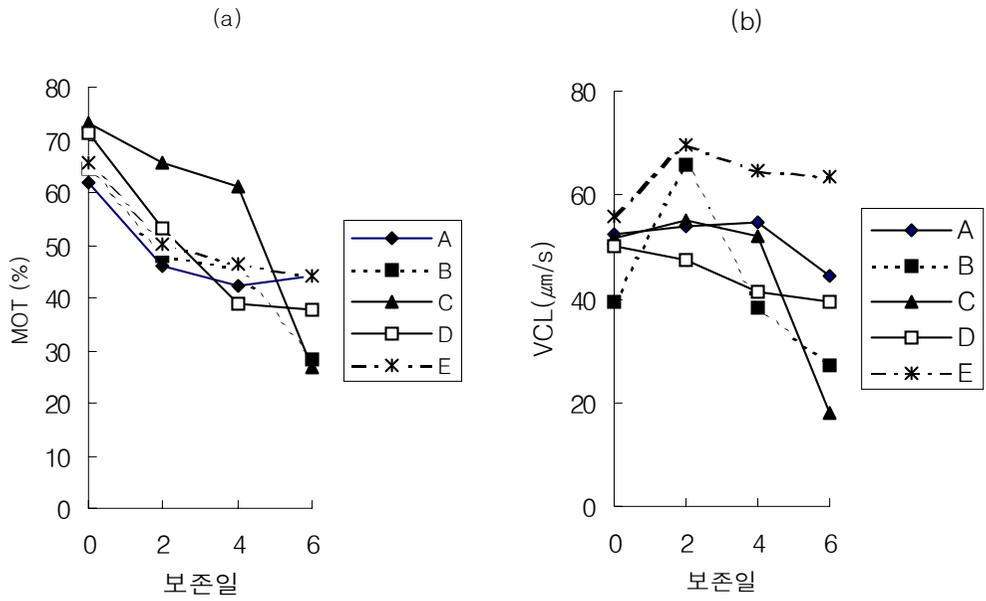


그림 1(a, b). 5개 AI센터(A-E)별 정액 보존기간에 따른 MOT(a)와 VCL(b)의 변화

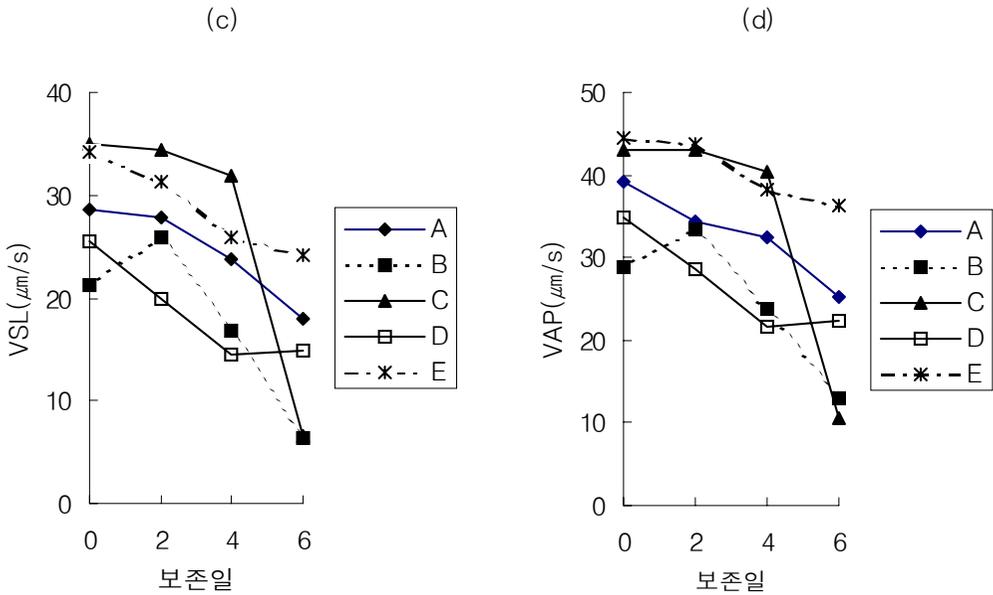


그림 2(c, d). 5개 AI센터(A-E)별 정액 보존기간에 따른 VSL(c)과 VAP(d)의 변화

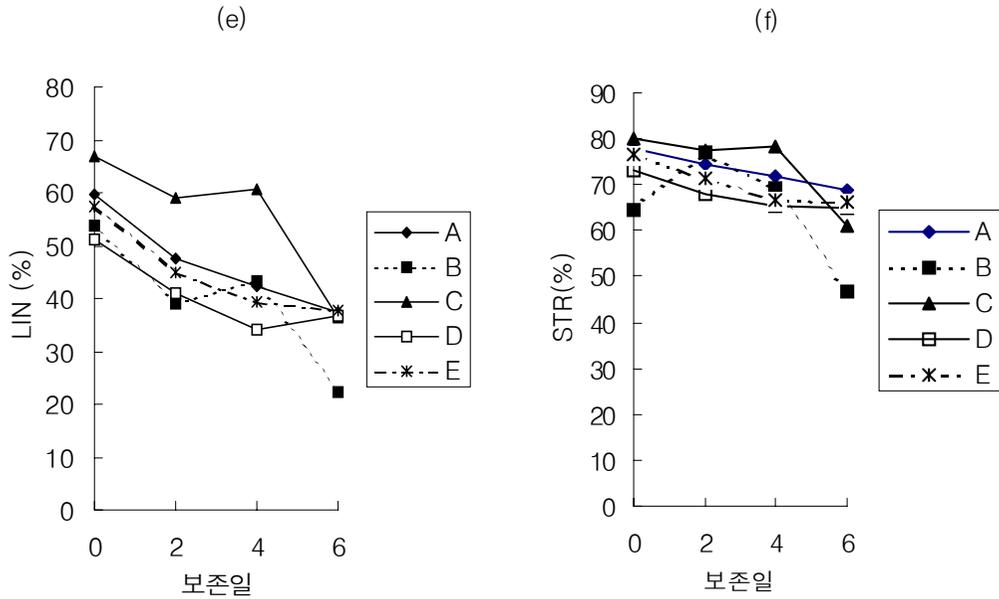


그림 3(e, f). 5개 AI센터(A-E)별 정액 보존기간에 따른 LIN(e)와 STR(f)의 변화

나. 정자 생존율과 정상침체율

액상정액의 보존기간에 따른 정자 생존율을 SYBR-14와 PI로 조사한 결과는 표 2, FITC-PSA(침체염색법)로 조사한 결과는 그림 4와 같다. 표 1에서 B와 E센터 생존율은 보존 4일까지 제조당일(83%~89%)와 같은 수준인 82~84%로 유지되었으나 A와 D센터는 보존 4일에서부터 73% 수준으로 저하되었다. 한편 침체염색법으로 계산된 생존율(그림 4)은 5개 센터가 제조당일 60~80%였는데 4일 이후의 저하경향은 앞의 조사법과 유사하였으며 6일 때의 생존율은 38~58%로서 제조당일의 60~70% 보다 저하되었다.

표 2. 액상정액의 보존기간에 따른 정자 생존율의 변화

AI 센터	보존기간(일)			
	0	2	4	6
A	83.0±7.1 ^{*a}	75.2±10.1 ^a	72.9±13.4 ^{ab}	68.0±12.1 ^b
B	89.7±4.1 ^a	82.8±3.2 ^b	82.0±5.0 ^a	81.4± 2.4 ^a
C	87.3±5.9 ^a	82.5±2.9 ^{ab}	83.9±5.4 ^a	76.4±4.0 ^b
D	86.4±3.9 ^a	81.8±6.6 ^a	73.1±10.1 ^{ab}	71.2±12.7 ^b
E	84.7± 10.9 ^a	87.8±6.2 ^a	84.2±4.9 ^a	74.1±8.6 ^b

* 평균±표준편차, ^{a,b} P<0.05.

보존기간에 따른 FITC-PSA 정상침체의 변화는 그림 4 및 5와 같다. 정상침체의 생존정자는 액상정액 제조당일에 60%, 4일과 6일에는 32%와 21%로 감소되었으며 한편 정상침체의 죽은 정자는 제조당일 16.2%에서 4일과 6일에 23.6%와 28.6%로 증가되었다. 이러한 변화를 5개 AI센터로 구분한 결과는 그림 5와 같이 정상침체의 생존정자 비율의 감소와 정상침체의 죽은 정자 비율의 증가경향은 AI 센터 모두 유사하였으나 침체가 손상되고 죽은 정자의 비율은 AI 센터간에 차이가 많았다.

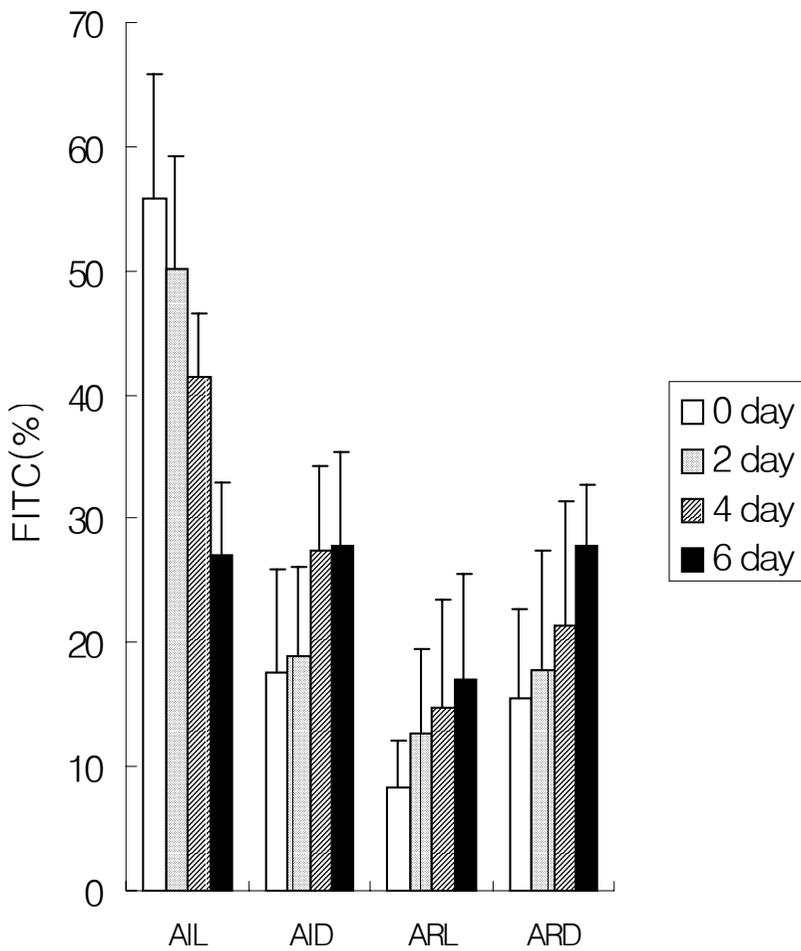


그림 4. 액상정액 보존기간별 FITC-PAS/PI에 의한 정자 생존율 및 침체상태 변화.

AIL : 침체정상 생존정자 ARL : 침체반응 생존정자

AID : 침체정상 죽은 정자 ARD : 침체반응 죽은 정자

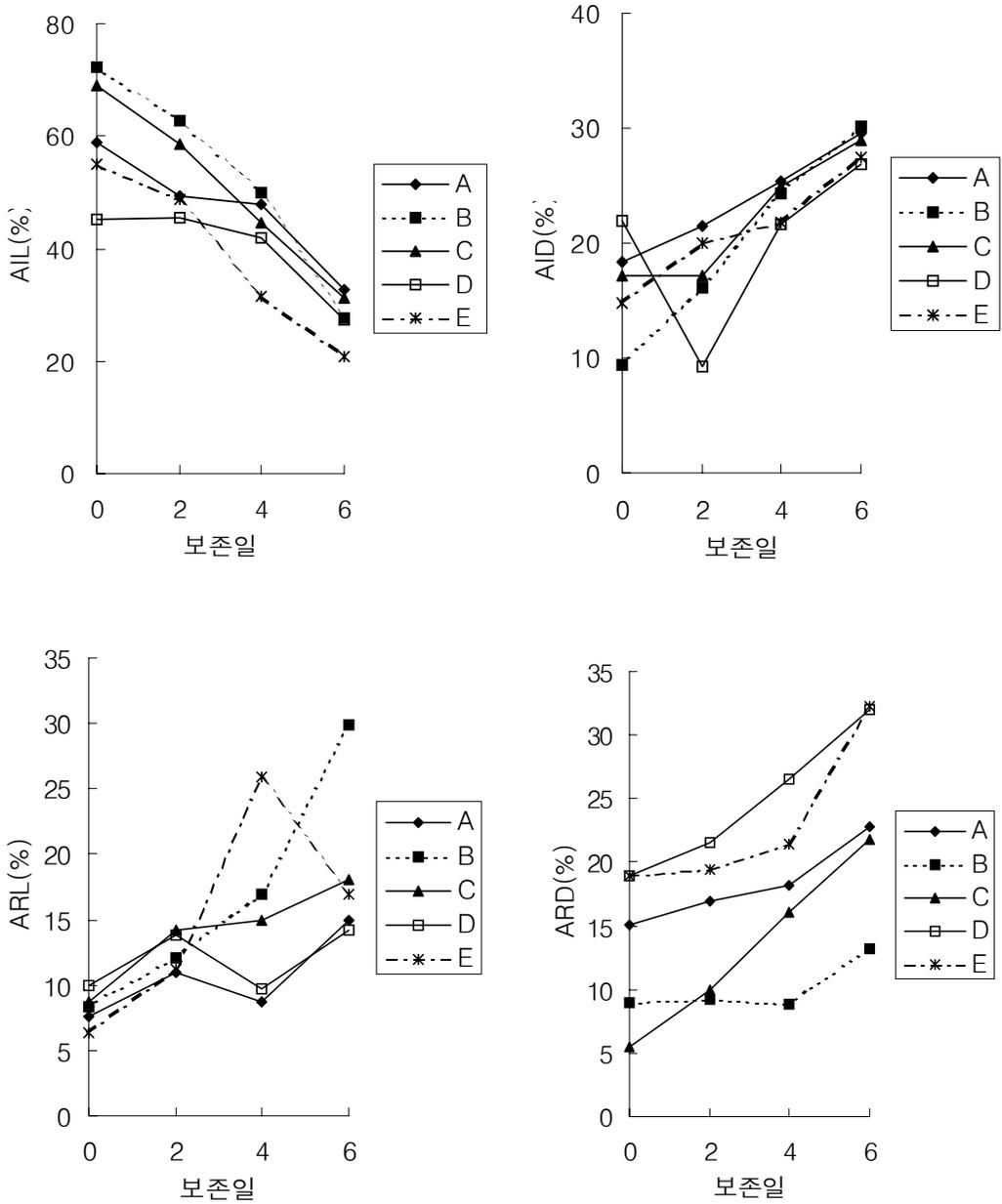


그림 5. 5개 AI센터(A-E)별 보존기간에 따른 정자 생존성과 침체상태 변화.

(AIL : 침체정상 생존정자 AID : 침체정상 죽은 정자

ARL : 침체반응 생존정자 ARD : 침체손상 죽은 정자)

다. HOST(저삼투성 팽창화 검사)

표 3에 나타난 바와 같이 B와 E 센터의 경우 보존 2일까지 변화가 없었으나 기타 3개 센터에서는 보존 2일부터 정액의 질이 크게 저하되었다. 전체적으로 HOST결과는 보존 4일과 6일의 수준이 제조당일 수준의 60~70%로 낮아졌음을 알 수 있었다.

표 3. 돼지 액상정액의 보존기간에 따른 HOST결과의 변화

AI 센터	보존기간(일)			
	0	2	4	6
A	48.7±10.9 ^{*aAB}	37.0±6.4 ^{bAB}	32.8±5.9 ^{bAB}	33.2±5.1 ^{bA}
B	44.9±3.6 ^{aB}	39.5±5.0 ^{abAB}	28.5±6.5 ^{cB}	33.4±3.1 ^{bcA}
C	42.4±3.4 ^{aB}	29.9±3.6 ^{bB}	29.2±8.5 ^{bB}	25.8±10.1 ^{bA}
D	59.9±16.1 ^{aA}	46.2±8.5 ^{bA}	40.9±8.1 ^{bA}	31.0±9.1 ^{cA}
E	51.4±10.4 ^{aAB}	45.7±11.5 ^{abA}	38.6±9.6 ^{bcA}	31.7±8.8 ^{cA}

* 평균±표준편차, ^{a,b,c:A,B} P<0.05.

라. 정자의 미토콘드리아 기능

표 4와 같이 A와 C 센터는 보존 4일까지 미토콘드리아 기능의 저하가 없었으나 나머지 센터에서는 보존 4일에 크게 저하되었다. 또한 미토콘드리아 기능에 대한 센터간의 차이가 제조당일부터 보존기간에 걸쳐 나타나고 있음을 알 수 있다.

표 4. 돼지 액상정액의 보존기간에 따른 미토콘드리아기능 변화

AI 센터	보존기간(일)			
	0	2	4	6
A	81.4±5.4 ^{*aB}	73.3±8.7 ^{abB}	69.5±10.0 ^{abAB}	66.8±9.9 ^{bA}
B	90.0±4.2 ^{aA}	82.4±5.8 ^{abA}	67.3±10.2 ^{cB}	72.7±8.1 ^{cA}
C	81.4±3.0 ^{aB}	82.8±4.4 ^{aB}	80.1±6.4 ^{abA}	72.9±7.3 ^{bA}
D	79.9±8.2 ^{ab}	71.2±7.0 ^{bB}	61.6±11.5 ^{cBC}	53.0±14.5 ^{dB}
E	71.1±7.2 ^{aC}	59.9±6.1 ^{bB}	54.9±6.2 ^{bC}	36.7±12.0 ^{cC}

* 평균±표준편차, ^{a,b,c:A,B,C} P<0.05.

마. 액상정액 성상간의 상관

액상정액의 보존기간별로 정액 성상간의 상관관계는 표 5 및 6과 같다. 보존당일에 정자생존율(FITC 기준)과 미토콘드리아기능 간의 유의적 상관이 있었고($r=0.44$), 보존 2일에는 정자생존율(FITC 기준)이 미토콘드리아기능과 0.78, HOST와 -0.45의 유의적 상관이 있었으며, HOST는 생존율(SYBR-PI 기준)과 0.41이었다. 보존 4일과 6일에서는 정자생존율(SYBR-PI 기준)이 FITC 생존율, HOST, CASA 활력과 모두 유의적인 $r=0.40$ 을 가졌으며 또한 미토콘드리아 기능도 정자생존율, HOST 및 CASA 활력과 모두 유의적인 상관을 나타내었다.

표 5. 액상정액의 보존당일과 2일에서 정액성상간의 상관

성 상	1	2	3	4	5
1. SYBR-PI 생존율(%)		0.35	-0.20	0.20	0.26
2. FITC 생존율(%)	-0.11		0.44*	-0.12	0.25
3. 미토콘드리아기능(%)	-0.21	0.78**		-0.11	0.02
4. HOST(%)	0.41*	-0.45*	-0.43*		0.36
5. CASA 활력(%)	0.23	0.16	0.17	-0.12	

보존1일 상관계수 \ 보존당일 상관계수

* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

표 6. 액상정액의 보존 4일과 6일에서 정액성상간의 상관

성 상	1	2	3	4	5
1. SYBR-PI 생존율(%)		0.27	0.13	0.44*	0.40*
2. FITC 생존율(%)	0.44*		0.30	0.11	0.39*
3. 미토콘드리아기능(%)	0.17	0.46*		0.40*	0.41*
4. HOST(%)	-0.01	-0.01	0.19		0.13
5. CASA 활력(%)	0.16	0.08	-0.14	0.16	

보존 6일 상관계수 \ 보존 4일 상관계수

* $P<0.05$

제 2 절 돼지 정액내 세균오염과 항생제 첨가효과에 관한 연구

1. 서 론

정액내 세균오염은 정자 자체에 영향을 줄 뿐만 아니라 희석액내 영양분의 소모를 가져와 정액보존성을 저하시키는 주 원인이 될 수 있다. 또한 병원성 세균의 감염은 질병전파의 원인이 되기도 한다. 돼지 정액내에 오염되는 세균은 약 13여종이고 그 중 *E. coli*를 포함한 5종의 장내세균이 주축을 이루고 있으며 오염 정도가 심할 경우 정자 생존성 저하와 침체이상을 상승 및 수태율 저하를 초래할 수 있다.

정액내 세균오염 정도는 종모돈의 위생관리와 정액의 위생적 처리여부에 따라 매우 변이가 크며 또한 AI센터마다 큰 차이가 있다. 항생제의 선택과 투여수준의 잘못으로 항생제에 대한 내성의 위험성이 증가될 수 있다. 현재 관행 항생제보다 더 효과적인 항생제 조합법에 대한 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 국내 AI 센터의 조건과 정액제조 과정에서 세균오염의 특성을 조사하고 오염세균에 대한 항생제의 첨가 효과를 알기 위하여 시도되었다.

2. 재료 및 방법

가. 정액 채취 및 시료 수집

경기와 충남지역에 소재한 5개 돼지 AI센터에서 인공수정용 액상정액을 생산하고 있는 종모돈으로부터 수압법을 이용하여 농후정액 부분을 채취하였다. 정액채취시 채취전에 먼저 생리식염수로 채취자의 손과 종모돈의 포피와 음경을 세척하였다. 본 실험에서 공시된 정액은 각 AI센터에서 실시되고 있는 과정에 별도 변경사항 없이 채취한 정액으로부터 시료를 채취하여 실험실로 운반되었다.

나. 정액내 세균수 측정

0.85% 생리식염수로 정액시료를 $10^1 \sim 10^4$ 로 희석 후 시료 0.1ml를 20ml 5% blood-trypticase soy agar plate에 접종하고 호기성 조건과 37°C에서 48시간 배양한 다음 세균수를 측정하였다.

다. 분리세균의 동정

세균동정을 위해서 먼저 gram 염색, 아포(spore)검사, oxidase검사를 실시한 후 그 다음 단계를 실시하였다. 세균 선별배지로서 cetrimide agar(*Pseudomonas sp.* 배양용), dextrose casein peptone agar(*Bacillus sp.* 배양용) Staph-No.110 agar(*Staphylococcus sp.* 배양용) 및 oxoid streptoc COBA medium(*Streptococcus sp.* 배양용)을 사용하였으며 장내세균 동정(*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus sp.* 등)을 위하여는 (주)코메드의 Easy 24E Plus kit를 사용하였으며 24개 well에 들어있는 배지에 균액을 접종후 24시간 배양에서 나타난 색의 변화를 결과지(report sheet)에 기입하고 판독결과를 Easy view software에 입력하여 세균을 동정하였다.

라. 항생제 감수성 조사

3~5개의 유사 colony로부터 세균을 trypticase soy broth에 옮기고 35℃에서 2~6시간 배양하여 접종재료(inoculum)를 만들고 Muller Hinton agar의 표면에 충분히 접종시킨 다음 8종의 항생제 discs(BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Becton Dickinson France)를 놓고 18~24시간 배양 후 zone diameter interpretive chart의 기준에 따라 감수성, 저항성 또는 중간 단계로 구분 정리하였다.

마. 정액내 항생제 첨가효과 조사

조사된 항생제는 penicillin, streptomycin, gentamycin, amikacin 및 lico-spectinomycin이었으며 희석액에 첨가에 따른 정자의 운동성(CASA 이용) 및 생존성(SYBR-14와 PI 이용) 조사와 더불어 증식된 세균 colony수의 변화를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 정액내의 세균오염도

5개 AI센터로부터 조사된 AI종모돈의 채취 원정액내에서 검출된 세균종류와 세균의 검출빈도를 보면 표 1과 같으며 이중 3개 AI센터를 비교한 결과는 표 2와 같다.

검출빈도가 가장 높고 검출세균중 가장 검출비율이 높은 세균은 *Bacillus sp.*(75%와 30.0%)였으며 또한 검출빈도가 50% 이상인 세균은 *Pseudomonas sp.*(67.9%),

Proteus sp.(53.8%), *Staphylococcus sp.*(53.6%)였다.

국내 AI센터에서 검출되는 대부분의 세균은 이들 4종의 세균이 주종을 이루고 있음을 알 수 있었다. 그리고 *Escherichia coli*와 *Klebsiella sp.*도 시료의 15%에서 확인되었다.

한편 AI센터 간에 검출되는 세균에서는 *Bacillus sp.* 와 *Pseudomonas sp.* 는 AI센터 간에 차이 없이 모두 높은 빈도로 확인되었으나 그 외 세균에서는 센터간에 차이가 많았다.

표 1. 원정액내 검출세균의 종류와 빈도

세균종류	조사시료수	세균검출시료		세균비율(%)
		시료수	비율(%)	
<i>Bacillus sp.</i>	28	21	75.0	30.0
<i>Pseudomonas sp.</i>	28	19	67.9	27.1
<i>Proteus sp.</i>	13	7	53.8	10.0
<i>Staphylococcus sp.</i>	28	15	53.6	21.4
<i>Escherichia coli</i>	13	2	15.4	2.8
<i>Klebsiella sp.</i>	13	2	15.4	2.9
<i>Enterobacter sp.</i>	13	1	7.7	1.4
기타	13	3	23.1	4.3

표 2. AI 센터별 원정액내 검출세균 종류와 빈도

세균종류	AI센터					
	A n=15		B n=5		C n=8	
	+	-	+	-	+	-
<i>Bacillus sp.</i>	9	6	4	1	8	0
<i>Pseudomas sp.</i>	7	8	4	1	8	0
<i>Proteus sp.</i>	3	9	2	0	2	0
<i>Staphylococcus sp.</i>	7	8	2	3	6	2
<i>Escherichia coli</i>	2	7	0	2	0	2
<i>Klehsiella sp.</i>	1	8	0	2	1	1
<i>Enterohacter sp.</i>	1	8	0	2	0	2
<i>Corynebacterium sp.</i>	0	9	0	2	1	7
<i>Morganella spp</i>	1	8	0	2	0	2
기타	1	8	0	2	1	2

표 3에서는 정액채취 후 정액의 1차 희석(1:1)된 정액내에서 검출된 세균의 종류이며 원정액과 유사한 세균 검출빈도와 세균의 검출비율을 나타내었다. 그러나 *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* 및 *Enterbacter sp.* 가 각각 33.3%, 16.7%와 33.3%로서 원정액보다는 검출빈도가 현저히 증가됨을 알 수 있었다.

이러한 결과로 보아 AI센터 간에 정액채취를 위한 종모돈의 위생관리 상태 및 정액처리과정의 위생관리에 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

표 3. 희석정액(1:1)내 검출세균의 종류와 비율

세균종류	조사시료수	세균검출시료		세균비율 (%)
		시료수	비율(%)	
<i>Bacillus sp.</i>	6	4	66.7	20.0
<i>Pseudomonas sp.</i>	6	4	66.7	20.0
<i>Proteus sp.</i>	6	3	50.0	15.0
<i>Staphylococcus sp.</i>	6	4	66.7	20.0
<i>Escherichia coli</i>	6	2	33.3	10.0
<i>Klebsiella sp.</i>	6	1	16.7	5.0
<i>Corynebacterium sp.</i>	6	1	1.0	1.0
<i>Enterobacter sp.</i>	6	2	33.3	10.0
기타	6	0	0	0

표 4와 5는 정액내 오염 세균수와 보존기간에 따른 세균의 증식정도를 보여주고 있다. 원정액의 경우 세균수($\text{cfu} \times 10^2/\text{ml}$)가 평균 24.4 ± 29.5 였으며 AI센터 간에 차이가 많았다. 희석정액에서는 10.4 ± 18.2 였고 역시 센터 간에 차이가 많았다. 또한 희석정액은 보존 6일에 3~104로서 세균수의 상당한 증가도 확인되었다.

표 4. 정액내 오염 세균수(cfu×10²/ml)

AI센터	조사시료수	원정액	조사시료수	희석정액
A	19	14.6±21.4 (1~100)	5	3.5±4.1 (0~10)
B	15	18.2±11.3 (5~48)	4	21.9±32.4 (0~70)
C	16	37.0±39.5 (4~173)	5	8.2±8.8 (0~20)
계	50	24.4±29.4	14	10.4±18.2

표 5. 희석정액의 보존기간별 세균수

보존기간(일)	조사시료수	세균수 (cfu×10 ² /ml)	범위
0	10	0.3±0.7	(0~1.2)
2	11	2.4±2.3	(0~6.5)
6	10	37.9±38.0	(3~104)

나. 정액내 세균의 항생제 감수성

현재 정액에 주로 첨가되고 있는 8종의 항생제에 대하여 오염빈도가 높았던 세균인 *Pseudomonas sp.* 와 *Staphylococcus sp.* 에 대한 항생제 감수성 조사 결과는 표 6, 그리고 생식기 질병에서 주로 검출되는 *Corynebacterium*에 대한 항생제 감수성 결과는 표 7과 같다.

Staphylococcus sp. 는 8종 항생제 모두에서 저항성의 정도차이는 있었으나 저항성을 나타내었고 한편 *Pseudomonas sp.*는 penicillin, spectinomycin, erythromycin에서 때로 저항성을 보였고 나머지 항생제에 대해서는 모두 감수성이 있었다. *Corynebacterium*의 경우는 spectinomycin, polymyxin B, erythromycin에서 저항성, streptomycin을 제외한 나머지 항생제에 대해서는 모두 감수성이 있었다.

표 6. 정액내 분리세균의 항생제 감수성 조사 결과

항생제	<i>Pseudornans sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Morganella sp.</i>	
Spectinomycin	100 μ g	S/R	R	S
Gentamycin	10 μ g	S	R	S
Streptomycin	10 μ g	R	R	S
Penicillin	10IU	S/R	R	R
Kanamycin	30 μ g	S	R	R
Amikacin	30 μ g	S	R	S
Polymyxin B	300IU	S	R	S/R
Erythromycin	15 μ g	S/R	R	R

* S : 감수성. R : 저항성 S/R : 중간

표 7. *Corynebacterium*에 대한 항생제 감수성 조사결과

항생제	Disc 효능	표준 zone 직경(mm)			결과
		저항성	중간	감수성	
Spectinomycin	100 μ g	≤ 14	15~17	≥ 8	0
Gentamycin	10 μ g	12	13~14	15	25
Streptomycin	10 μ g	11	12~14	15	12
Penicillin	10IU	19		20	27
Kanamycin	30 μ g	13	14~17	18	29
Amikacin	30 μ g	14	15~16	7	26
Polymyxin B	300IU	8	9~11	12	0.9
Erythromycin	15 μ g	15	16~20	21	0

다. 정액내 항생제 투여효과

표 8은 단일항생제 처리효과, 표 9는 항생제 복합처리에 따른 정자활력과 정자생존율에 대한 결과이다.

표 8에서는 현재까지 주로 첨가되어온 penicillin과 streptomycin 첨가법을 기준으로 하여 그 외에 3종(linco/spectinomycin, gentamycin, amikacin)의 첨가에서 정자활력은 보존 6일 때에 amikacin이 다소 양호한 결과였으나 처리구간에 큰 차이는 없었다. 따라서 본 실험에서 첨가된 항생제의 종류와 수준은 정자의 활력과 생존율에 큰 영향없이 상용될 수 있음을 알 수 있었으며 상당한 수준의 세균증식억제가 가능하였다.

항생제 복합처리(표 9)에서는 보존 6일 때 정자활력의 경우 3, 4와 7 처리구에서 1처리구(무첨가)보다 현저히 저하되었다. 한편 보존 6일 때의 정자 생존율에서는 처리구간에 차이가 없었다. 따라서 항생제의 복합처리에서는 첨가수준에 대한 고려가 필요함을 알 수 있었다.

제 3 절 동결정액에서의 항산화제 및 Trehalose 첨가효과에 관한 연구

1. 서 론

돼지의 동결정액 보급률이 소의 경우보다 현저히 낮은 이유는 특히 돼지 정자의 동결성이 낮을 뿐만 아니라 동결성이 종모돈 개체차이가 큰데 기인하고 있다. 그러나 우수한 종모돈의 최대 활용과 우수 유전자원의 국내 도입 및 액상정액 이용의 지역적 한계성과 보존성의 한계성을 극복하기 위하여 그리고 양돈산업의 발전을 위하여 동결정액생산기술의 개발과 이용은 반드시 이뤄져야 할 것이다. 최근 생체내 활성산소계(reactive oxygen species, ROS)의 증가 또는 자연제거 기능의 저하로 많은 생리적 장애가 발견되고 있으며 정자의 기능저하도 ROS와 관련이 있는 것으로 보고 되어 있다.

정자 동결과정에서도 ROS의 발생이 따르기 때문에 이를 막기 위한 항산화제의 첨가에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

또한 정자 동결시 비침투성 물질인 당류의 첨가효과도 많이 시도되고 있다. 특히 최근에는 면양 정자를 중심으로 이당류인 trehalose에 대한 연구에서 동결정자의 세포막 보호기능을 현저히 개선하는 것으로 입증되고 있다. 본 연구에서는 항산화제로서 α -tocopherol, taurine, sialic acid, pentoxifylline의 첨가 효과를 조사하였으며, 돼지정액 동결에서의 trehalose 첨가효과를 알기 위하여 시도되었다.

2. 재료 및 방법

가. 공시정액

본 실험에 사용된 돼지 정액은 Yorkshire와 Duroc 종모돈으로부터 채취된 것을 공시하였으며 동결정액은 0.5ml straw의 동결정액을 공시하였다.

나. 항산화제 첨가실험을 위한 동결정액의 제조

1) 1차와 2차 희석액의 제조

1차 희석액인 20%난황 lactose 용액은 난황과 11% lactose 용액을 1 : 4로 혼합한 후 4,000×g에서 20분간 원심분리 후 상층액을 miracloth filter에 여과시켰다.

2차 희석액은 7.5% glycerol과 1.3% OEP이 함유된 용액으로서 제조시 실온에서

교반을 실시하여 최소 1시간동안 희석 후 플라스틱 용기에 넣어 사용 전까지 냉동 보관하였다.

Taurine과 α -tocopherol의 첨가는 1차 및 2차 희석액에 taurine, α -tocopherol의 단일처리 그리고 taurine와 α -tocopherol의 혼합 처리(50mM과 500 μ m)를 실시하였다.

Taurine은 1차 및 2차 희석액에 최종농도가 40mM이 되도록 첨가하였고, α -tocopherol은 99.9% ethanol에 용해하여 stock solution 100mM을 제조한 후 1차 및 2차 희석액에 500 μ M이 되도록 첨가하였다. 이때 희석액에 들어가는 ethanol의 농도는 1%을 초과하지 않았다. Sialic acid는 0.04mg/ml을 첨가하였고 pentoxifylline 첨가 농도는 2와 3mM이었다.

2) 동결정액의 제조

수압법으로 채취된 정액의 성상을 측정한 다음 원정액에 미리 제조된 1차 희석액을 점진적으로 희석한 후 35 $^{\circ}$ C의 따뜻한 물이 담긴 200ml 비이커 내에 넣고 냉장고 내에서 약 2시간동안 4~7 $^{\circ}$ C로 냉각하였다. 냉각된 희석정액에 2차 희석액(5 $^{\circ}$ C)을 서서히 희석하였다. 최종 희석된 정액을 0.5ml straw내에 포장한 후 포장된 straw내의 정자가 glycerol과 충분히 접촉하도록 1시간동안 평형 시켰다. Straw를 액체질소 표면 15cm 위에 10분간 정치시켜 예비동결을 시킨 후 액체질소(-196 $^{\circ}$ C)내에 침적하였다.

3) 정액성상 검사를 위한 기본 배양액

20mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N' -2-ethane sulphonic acid(HEPES) 20mM NaHCO₃와 0.1 % polyvinyl alcohol(PVA)이 첨가된 BWW 배양액(Biggers 등, 1971)을 기본 배양액으로 사용하였다.

5) 정자세포막의 지방과 산화(lipid peroxidation)

Lipid peroxidation은 최종 산물인 malondialdehyde를 측정하는 thiobabituric acid(TBA) 반응법으로 분석하였다.

전 처리된 정액을 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 이 제거된 Hank's balance salt solution으로 희석하여 정자농도가 20 \times 10⁶/ml되게 조정하였다. Lipid peroxide의 malondialdehyde로의 전환을 증진시키기 위하여 3차 증류수로 희석된 1mM ferrous sulfate와 5mM

sodium ascorbate를 각각 $10\mu\text{l}$ 씩 상기 정자 부유액 1ml 에 첨가하고 37°C 에서 1시간 배양하였다. $250\mu\text{l}$ 의 40% trichloroacetic acid를 첨가하고 0°C 에서 10분간 정치하여 lipid peroxidation을 중지시킨 후 $2500\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리 하였다. 이후 상층 1ml 을 회수하여 $250\mu\text{l}$ 의 1% TBA와 혼합하여 끓는 물에서 10분간 증탕하였고 상온에서 냉각시켰다. Malondialdehyde의 농도는 spectrophotometer(Kontron instruments, Switzerland)를 이용하여 532nm 파장에서 반응액의 흡광도(optical density)를 측정하여 분석하였다. 생성된 malondialdehyde의 Mol농도는 Mol 흡광계수($1.49 \times 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)를 기준으로 환산하였다(Slater와 Sawyer, 1971).

다. Trehalose 첨가실험을 위한 동결보존액의 제조 및 용해

1) 동결보존액의 제조

동결보존액인 Beltsville F5(BF_5)는 Pursel(1975)의 방법에 따라 12g Tes-N-tris(hydroxyethyl)-methyl-2-aminonesulfonic acid, 2g Tris(hydroxymethyl) aminomethane, 16g D(-)fructose, 16g D(+)glucose, 5ml OEP를 최종 1l 되도록 증류수를 첨가하여 제조하였다. 난황은 당일 생산된 신선란에서 난황을 분리하여 동결보존액에 20% 농도로 첨가하였다. 교반이 끝난 BF_5 동결보존액은 $1200\times\text{g}$ 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 사용하였다. 2차 동결보존액은 glycerol을 6%농도로 첨가하여 교반 후 사용하였다.

2) Trehalose와 EDTA의 첨가

Trehalose의 첨가는 실험 1에서 2차 동결보존액에 trehalose를 최종농도가 각각 0.025M , 0.05M , 0.1M , 0.2M 이 되도록 첨가하였다.

EDTA의 첨가는 실험 1에서 trehalose의 처리결과가 가장 좋은 처리구를 선정하고 EDTA의 최종농도가 2mM , 5mM 되게 첨가하였다.

3) Washing media의 제조

Washing media의 제조는 BTS(Beltsville thawing solution)을 일부 수정하여 0.2mM glucose, 20.4mM trisodium citrate, 11.8mM Na_2CO_3 , 3.4mM EDTA, 10.1mM KCl 의 농도로 제조하였다.

4) 동결정액의 제조 및 용해

정액을 washing media로 25℃에서 500×g에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 제거하고 straw당 총 정자수가 5×10^7 되게 BF₅로 재부유 하였다. 그리고 정액의 온도를 2시간에 걸쳐 4-5℃까지 하강시킨 후 glycerol과 trehalose가 포함된 BF₅로 glycerol 최종농도 2%가 되도록 희석하였다. 2차 희석 후 glycerol평형을 시킨 후 0.5ml straw에 분주, 봉인하고 -80℃에서 10분간 예비동결 시킨 후 액체질소에 침지하였다.

용해는 37℃의 온수에서 20초 동안 실시하였다.

라. 정액성상 및 정자기능 검사 방법

1) 컴퓨터 정자 운동양상 분석(CASA, Computer-Assisted Sperm Analysis)

CASA는 전자리된 정액 10 μ l를 미리 37℃로 가열된 Makler counting chamber(Sefi medical instrument, Israel) 위에 떨어뜨린 후 TI-23A CCD 카메라(NEC, Japan)가 부착된 위상차현미경(Olympus, Japan)에 연결된 CTS-60/200 system(Motion Analysis, USA)을 이용하여 시행하였다.

정자의 운동양상을 나타내는 측정항목으로서 활력(motility), 직선운동속도(VSL, straight line velocity), 곡선운동속도(VCL, curvilinear velocity), 곡선경로 선형도(LIN, linearity), 측두이동거리(ALH, amplitude of lateral head displacement)를 분석하였다. 이때 항진운동 정자(hyperactivated sperm)의 기준은 $VCL \geq 100 \mu\text{m/s}$, $LIN < 60\%$, $ALH \geq 5 \mu\text{m}$ 로 정하였다.

2) 저삼투성 팽창화검사(HOST, Hypo-osmotic swelling test)

저삼투압액은 fructose 13.51gm과 sodium citrate 7.35gm을 3차 증류수 1ℓ에 녹여 최종 삼투압 150mOsm/Kg로 조정하였으며 정액과 혼합한 후 37℃ 수조 내에서 30분간 배양하였다. 이 후 500×g에서 5분간 원심분리 하였으며, 상층액을 제거한 후 정자괴를 잘 풀어준 후 10 μ l를 취하여 깨끗한 슬라이드에 도말하고 실온에서 건조하였다.

위상차현미경하에서 슬라이드당 최소 200개 이상의 정자를 판독하였다. 정자미부의 팽창의 유형은 제 1절의 내용과 같게 분류하였다.

3) 정자의 생존성 측정

정자의 생존을 조사를 위한 염색방법은 Garner 등(1994)의 방법에 준하여 실시하였다. SYBR-14 viability kit(FertiLight™ Kit, Molecular Probes, USA)를 사용하였다. Kit의 stock solution에서 SYBR-14는 무수 DMSO에 1mg/ml 함유, PI는 Tyrodes salt solution에 2mg/ml가 함유되었다.

생사염색은 SYBR-14 stock solution을 DMSO로 100배 희석하여 만든 working solution 2.7 μ l, 미리 제조되어 있는 PI 2 μ l, 정액(2×10^7 정자/ml) 500 μ l을 혼합하여 37°C의 hot-block에서 30분간 배양후 형광현미경(HUND WETZLAR H600 Germany)에서 관찰하였다.

4) 정자의 침체검사

정자의 염색방법은 Spermac kit manufacturer's guidelines(Stain Enterprises, South Africa)에 따라 수행하였다. Washing media로 전처리된 각 처리구의 정액을 슬라이드에 도말하여 공기중에서 건조 후 Fixative I로 고정하고 슬라이드를 증류수로 세척 후 stain solution A 5분, stain solution B 1분, stain solution C 1분씩 3단계로 염색하였다. 각 염색 단계마다 증류수로 세척하여 공기중에서 건조시켰다. 염색된 슬라이드는 광학현미경에서 1000배의 배율로 슬라이드당 200개 이상 정자의 침체를 판독하였다.

정상침체는 두부가 전체적으로 녹색으로 염색되고, 그 끝에 진한 녹색띠가 나타나며 두부의 적도대 아랫부분은 핑크색으로 염색이 되며 미토콘드리아와 미부는 녹색으로 염색된 경우로 하였고, 침체가 손상된 정자는 두부끝의 녹색띠가 없으며 끊어져 있거나 녹색이 탈색되어 있는 것으로 조사하였다(그림 1).

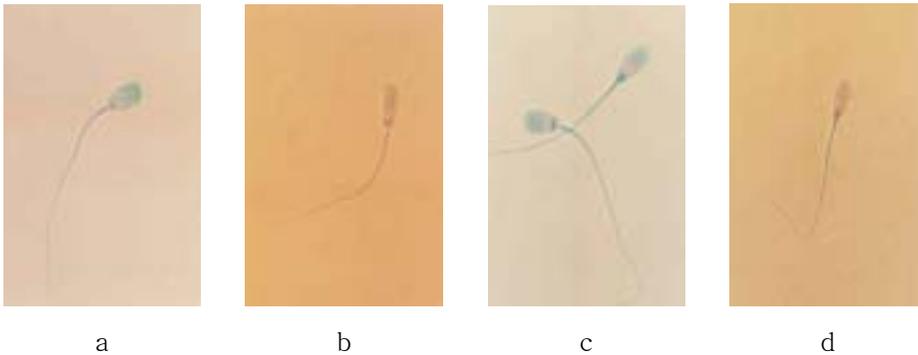


그림 1. 돼지 정자의 침체형태.(a : 정상침체 정자; b : 침체반응 정자; c : d : 침체결합 정자)

5) ROS의 발생 측정

ROS의 발생은 chemiluminescence 방법으로 측정하였다(Aitken 등, 1992). Chemiluminescence signal은 LB950 luminometer(Berthold, German)를 이용하여 3초간의 integration mode로 기록하였다. ROS 측정을 위한 probe는 luminol(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione; Sigma, USA)을 사용하였다. Probe의 stock solution은 DMSO로 희석하여 25mM로 제조하였다.

Luminol을 이용한 H_2O_2 의 측정은 전처리된 $400\mu l$ 의 정자 부유액(10×10^6 spermatozoa/ml)에 luminol stock solution $4\mu l$ (최종농도 250uM)와 세포외에 존재하는 H_2O_2 의 분석도를 높이기 위하여 PBS로 희석된 $8\mu l$ 의 horseradish peroxidase(최종농도 12.4U)를 첨가한 후 luminometer에서 10분간 signal을 측정하였다. Signal이 안정화되면, ROS의 발생을 증진시키기 위하여 DMSO에 녹아 있는 $4\mu l$ (최종농도 100nM)의 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)를 첨가하여 10분간 signal을 재 측정하였다. H_2O_2 의 발생 분석은 PMA 첨가후 10분간 측정된 chemiluminescence counts에서 최고(peak) 값과 최고 값을 포함하는 5분간의 합계 값으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 항산화제 첨가효과

정액의 동결전 또는 동결융해 후에 첨가된 항산화제의 첨가결과는 표 1~4에서 보는 바와 같다.

표 1에서 동결전 항산화제의 첨가에서 taurine과 α -tocopherol의 단독처리보다는 두 가지의 혼합첨가에서 정자운동성과 생존율이 다소 향상되었으나 유의적 차이는 없었다. HOST에서는 항산화제의 첨가에 따른 변화가 없었다. 그러나 활성산소계(ROS)의 발생이 α -tocopherol과 taurine+ α -tocopherol처리에서 현저히 감소되었고 지방과산화(lipid peroxidation)도 무첨가구보다 유의적으로 현저히 감소됨을 알 수 있었다.

표 1. 정액동결전 항산화제 첨가에 따른 용해 후 정액성상 변화

정액성상, ROS	대조구	Taurine, A (40mM)	α -tocopherol, B (500 μ M)	A+B
CASA,* MOT(%)	38.9	37.4	38.6	43.1
VSL(μ m/sec)	30.8	36.5	36.9	47.5
VCL(μ m/sec)	10.1	85.6	90.8	99.8
LIN(%)	35.4	38.6	41.5	47.5
생존율(%)	70.8	70.3	74.5	75.0
HOST(%)	25.8	26.5	28.6	27.4
ROS발생				
Luminol Chemiluminescence(H_2O_2 , Counts $\times 10^5$)	52.4 ^a	47.4 ^a	30.9 ^{ab}	18.5 ^b
Lipidperoxidation, Malondialdehyde (nMol/ $l \times 10^8$)	30.4 ^a	21.6 ^{ab}	18.2 ^b	15.2 ^b

* MOT : 활력, VCL : 곡선운동속도, VSL : 직선운동속도, LIN : VSL/VCL

^{a, b} P<0.05.

표 2는 항산화제 sialic acid의 첨가시기를 정액 동결전 방치시간(holding time)이 유지되는 동안에 첨가한 경우이다. 정액채취 후 2~3시간 내에 동결전 처리에 들어가 기전 12시간의 방치시간동안의 항산화제 첨가로 동결융해 후 정자활력이 54.3%로 대조구(46.5%)보다 향상됨을 알 수 있었다. 한편 정자의 운동속도와 관련된 측정치에서는 차이가 없었다.

표 2. 정액동결 전 방치시간과 항산화제 첨가에 따른 용해 정자의 활력

CASA*	원정액	처리구			
		대조구	방치시간(12h), A	Sialic acid (0.04mg/ml), B	A+B
MOT(%)	82.5±5.8	46.5±4.4 ^a	51.5±9.2 ^a	52.7±8.4 ^{ab}	54.3±4.0 ^b
VSL(μm/sec)	27.7±5.6	5.8±1.9	5.6±1.4	5.7±1.2	6.1±1.3
VCL(μm/sec)	45.1±6.3	28.9±9.2	28.4±6.4	26.8±4.1	27.5±4.5
LIN(VSL/VCL, %)	62.6±7.0	20.8±1.4	19.9±2.3	20.9±2.3	22.2±1.3
VAP(μm)	36.1±5.4	12.2±3.9	12.4±3.1	12.4±2.3	12.5±2.4
HYP(%)	3.8±4.8	1.2±1.1	1.6±0.9	1.4±1.2	1.3±1.2

* MOT : 활력, VCL : 곡선운동속도, VSL : 직선운동속도, LIN : VSL/VCL

^{a,b} P<0.05.

표 3과 4는 penotoxifylline(PX) 첨가로 정자의 활력과 기능의 증가효과와 또한 PX의 항산화제로서의 효과를 조사한 실험결과이다.

PX의 동결전 처리에서 동결직전과 용해 후 정자의 CASA결과에서는 무첨가구와 차이가 없었으나 동결용해 후의 HOST와 생존율에서는 무첨가구보다 현저히 향상되었고 특히 3mM 첨가수준에서 그 효과가 더 큼을 알 수 있었다(표 3).

PX의 첨가가 동결전과 용해 후에 모두 첨가시에서도 역시 3mM첨가에서 용해 후 정자활력의 현저한 상승이 있었다. 또한 정자운동속도에서 LIN(VSL/VCL)이 두 첨가수준(1과 3mM)에서 높게 나타났다.

이상의 결과에서 정액의 동결과정 중에 발생하는 ROS의 증가로 인한 저해요인을 줄이기 위하여 항산화제의 첨가가 동결정액 제조기술의 개선을 위한 한 방법이 됨을 알 수 있었다. 앞으로 유효한 항산화제의 첨가시기 및 수준에 대한 연구가 더 필요할 것으로 본다.

표 3. 동결전 Pentoxifylline 첨가에 따른 용해 정액의 성상

정액성상	대조구		처리구			
	냉각후	용해후	1mM		3mM	
			냉각후	용해후	냉각후	용해후
CASA*, MOT(%)	47.0	16.7	49.0	14.7	40.3	15.4
VSL($\mu\text{m}/\text{sec}$)	21.5	5.0	51.1	22.3	21.8	4.5
VCL($\mu\text{m}/\text{sec}$)	47.2	23.3	24.5	4.6	47.5	23.1
LIN(%)	45.2	21.2	47.5	21.0	42.7	19.7
VAP($\mu\text{m}/\text{sec}$)	30.7	9.7	34.0	8.9	31.7	9.7
HYP(%)	5.6	1.2	6.4	1.1	6.9	0.8
ALH(μm)	3.9	3.1	3.9	2.9	3.9	3.1
STR(%)	69.8	50.0	71.0	51.3	66.5	46.4
HOST(%)	69.2	29.0 ^a	73.0	35.6 ^b	73.7	39.2 ^b
생존율(%)	79.2	38.3 ^a	81.7	39.7 ^a	83.3	48.9 ^b

* MOT : 활력, VSL : 직선운동속도, VCL : 곡선운동속도, LIN : VSL/VCL,
 VAP : 경로평균속도, STR : VSL/VAP

^{a,b} P<0.05.

표 4. 동결전과 용해 후 Pentoxifylline 첨가에 따른 용해 정액의 활력

CASA*	대조구	처리구	
		1mM	3mM
MOT(%)	33.5±14.9 ^a	37.6±12.5 ^{ab}	43.1±19.3 ^b
VSL($\mu\text{m}/\text{sec}$)	3.5±0.8	5.9±3.6	11.6±10.0
VCL($\mu\text{m}/\text{sec}$)	19.3±3.5	18.4±5.6	24.8±10.8
LIN(VSL/VCL, %)	18.1±2.7	28.9±9.9	37.9±22.4
VAP(μm)	8.0±1.7	9.7±4.3	15.7±10.8
HYP(%)	0.6±±0.8	0.8±0.4	0.8±0.6

* MOT : 활력, VSL : 직선운동속도, VCL : 곡선운동속도, LIN : VSL/VCL,
VAP : 평균경로속도, HYP : 항진운동

^{a,b} P<0.05.

나. 정액 동결전 정액방치시간 효과

표 2는 정액채취 후 동결처리전에 일정시간의 방치시간(holding time)을 줌으로서 정자의 저온충격(cold shock)를 줄이기 위하여 12시간의 방치시간에 대한 결과이다.

동결융해 후의 정액 CASA에서 정자활력이 대조구보다 10~12% 향상되었으나 유의성은 없었다. 그러나 이미 앞에서 언급된 항산화제의 첨가효과를 고려해 볼 때 더욱 연구가 요구되는 부분이다.

다. Trehalose의 첨가효과

동물·식물 체내에서 저온에 노출시 합성되는 물질로 알려진 이당류 trehalose를 동결 희석액에 첨가하였을 때 나타난 효과는 표 5와 7과 같으며 EDTA와 복합처리의 효과는 표 7~9와 같다. 또한 이들 성분의 첨가에 따른 동결융해 정액과 정자내의 ROS 수준은 표 10과 같다.

표 5에서 0.025~0.2M 첨가수준에서 첨가 후 동결직전의 정자 운동양상분석(CASA) 결과는 무첨가구와 차이가 없었으나 동결융해 후 결과는 0.025와 0.05M 첨가에서 특히 정자활력과 LIN이 무첨가구보다 각각 현저히(40~60%와 20%) 향상되었다.

표 6에서 0.05와 0.1M 첨가시 융해 후 정자 생존율이 대조구보다 유의적으로 향상되었다. 한편 정상첨체율은 0.05~0.2M 첨가에서 동결직전과 동결융해 후 모두 대조구보다 현저히 향상됨을 알 수 있었다.

또한 융해후의 HOST도 첨가구에서 모두 대조구보다 20~40% 더 높았다.

Trehalose를 항산화제와 착염제(chelating agent)의 기능을 가진 EDTA와 병행 첨가에서(표 7과 8)는 EDTA 단독첨가보다 복합처리에서 정액의 냉각 후(동결직전)에 정자활력이 향상되었으며 또한 trehalose 0.05~0.1M와 EDTA 2~5mM 복합첨가에서 전체적으로 동결융해 정자의 활력이 향상됨을 알 수 있었다(표 7). 동결융해후의 정자활력(표 8)은 trehalose와 EDTA 첨가수준이 0.05M과 5mM 및 0.1M과 2mM에서 각각 대조구보다 현저히 높았다. 표 9에서는 정자 생존율이 냉각 후에 처리간에 차이가 없었으나 융해 후 생존율은 trehalose 0.05~0.1M에 EDTA 첨가에서 모두 trehalose 단독처리보다 유의적으로 높았다. 정상첨체율은 복합처리에서 냉각 후에 다소 높았으나 유의적 차이는 없었다. 그러나 동결융해 후에는 EDTA 5mM의 복합처리에서 현저히 증가하였다. HOST는 냉각 후에는 처리간에 차이가 없었으나 EDTA 5mM 첨가에서 다소 높은 경향이 있었다.

표 7. Trehalose와 EDTA 첨가에 따른 정액의 냉각후 정자운동성

Trehalose (M)	EDTA (mM)	CASA					
		MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	ALH (μm)
0	0	40.9 ^a	34.8	15.2	21.8	41.6	3.5
	2	46.0 ^{bc}	35.6	17.4	23.8	48.7	3.6
	5	42.5 ^{ab}	31.0	14.3	20.0	46.4	3.4
0.05	0	45.5 ^{bc}	37.7	17.3	24.1	45.7	3.8
	2	48.5 ^c	43.4	21.4	28.9	47.6	3.9
	5	49.9 ^c	39.9	21.6	26.8	49.2	3.8
0.1	0	43.9 ^{abc}	37.4	15.6	22.5	41.8	3.9
	2	46.7 ^{bc}	34.7	16.8	22.8	47.7	3.8
	5	49.7 ^c	40.7	21.6	28.8	54.1	3.5

^{a,b,c} P<0.05.

표 8. Trehalose와 EDTA 첨가에 따른 정액 동결음해 후 정자운동성

Trehalose (M)	EDTA (mM)	CASA					
		MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	ALH (μm)
0	0	13.4 ^a	19.8	10.0	11.8	42.1	2.8
	2	12.0 ^a	19.3	11.1	13.0	51.5	2.7
	5	14.3 ^a	18.8	8.3	10.9	37.8	3.4
0.05	0	21.9 ^{ab}	20.5	10.1	13.5	47.1	3.0
	2	21.3 ^{ab}	22.1	12.3	15.6	51.3	3.1
	5	22.9 ^b	23.2	11.6	15.7	47.9	3.2
0.1	0	17.2 ^a	17.9	8.0	11.1	44.5	2.8
	2	23.6 ^b	21.0	11.3	14.5	54.7	2.8
	5	18.2 ^a	19.4	11.1	13.7	51.1	2.6

^{a,b} P<0.05.

표 9. 동결전 Trehalose와 EDTA첨가에 따른 정액성상 변화

Trehalose (M)	EDTA (mM)	생존율(%)		정상첨체율(%)		HOST(%)	
		냉각후	융해후	냉각후	융해후	냉각후	융해후
0	0	73.4 ^a ±2.2	34.8 ^a ±2.8	66.8 ^a ±3.1	18.7±1.0 ^a	55.0 ^a ±10.6	37.0±10.8 ^a
	2	76.6 ^a ±2.3	37.3 ^a ±2.2	69.5 ^{ab} ±4.0	19.6±2.2 ^a	52.8 ^a ±6.9	42.8±5.0 ^b
	5	77.4 ^a ±3.0	37.4 ^a ±3.4	73.2 ^b ±0.9	23.7±1.5 ^b	55.6 ^a ±4.6	41.1±6.8 ^{ab}
0.05	0	76.1 ^a ±2.3	38.8 ^a ±1.0	66.0 ^a ±5.0	22.6±3.3 ^b	53.0 ^a ±5.3	34.3±3.8 ^a
	2	77.6 ^a ±2.8	43.4 ^{bc} ±2.3	69.3 ^{ab} ±2.2	25.8±2.4 ^b	53.8 ^a ±15.6	37.3±4.6 ^a
	5	77.6 ^a ±2.2	43.6 ^{bc} ±0.8	70.0 ^{ab} ±2.1	32.5±2.5 ^c	53.0 ^a ±11.7	41.6±5.2 ^{ab}
0.1	0	75.6 ^a ±2.8	41.9 ^b ±0.9	70.0 ^{ab} ±1.8	22.8±1.7 ^b	54.3 ^a ±6.2	37.1±1.0 ^a
	2	77.6 ^a ±3.3	44.3 ^{bc} ±0.5	73.9 ^b ±1.6	29.0±3.4 ^{bc}	56.3 ^a ±6.2	40.0±4.4 ^{ab}
	5	76.3 ^a ±1.7	47.4 ^c ±2.1	72.5 ^b ±3.2	31.4±2.5 ^c	56.3 ^a ±4.9	42.3±6.2 ^b

^{a,b,c} P<0.05.

돼지정액의 동결처리과정에서 발생된 활성산소계(ROS) 수준을 보면 표 10과 같이 정액 중에서는 용해후(6.4×10^4 cpm)보다 냉각후(5.1×10^4 cpm)에 더 높았고 정자에서도 각각 64.8과 49.8로 냉각후가 더 높았다. 그러나 Trehalose 0.025~0.2M 단독 첨가구에서 냉각후와 동결용해후의 ROS 발생이 전체적으로 무첨가구보다 낮았다.

한편 EDTA 단독첨가에서는 대조구의 ROS수준과 같았으며 trehalose와 EDTA 복합처리구에서는 ROS 수준이 대조구와 유사하였다.

이상의 결과에서 trehalose의 첨가에서 정자활력의 향상은 크게 나타나지 않았으나 동결용해후의 정자생존성, 침체손상 방지 및 HOST 결과의 향상을 기대할 수 있었으며 EDTA와의 복합처리도 돼지정액의 동결성을 높이는데 유효한 방법이 되었다.

표 10. 동결전 Trehalose와 EDTA 첨가에 따른 ROS 발생량($\times 10^4$ cpm)

Trehalose (M)	EDTA (mM)	정액		정자	
		냉각후	용해후	냉각후	용해후
0	0	6.4±2.1	5.1±1.4	64.8±1.7	49.8±9.4
	2	6.2±1.5	4.7±1.2	66.1±0.1	51.6±11.4
	5	7.5±2.2	5.9±0.9	67.1±1.3	55.4±4.2
0.025	0	5.3±2.0	5.3±2.2	59.2±0.08	33.5±3.3
0.05	0	4.1±0.8	4.2±0.8	65.3±1.5	35.1±3.3
	2	5.6±0.8	4.3±1.4	67.4±2.6	42.6±10.8
	5	6.9±0.6	5.9±0.4	72.8±0.8	46.5±7.8
0.1	0	4.7±0.5	4.1±0.8	66.2±1.2	38.7±7.8
	2	4.3±0.2	4.2±1.1	83.2±0.9	47.8±17.1
	5	4.9±0.1	6.2±0.6	75.3±1.1	52.5±11.0
0.2	0	5.2±0.3	4.1±1.4	74.7±1.5	39.3±6.3

제 4 절 정액의 품질개선을 위한 정액성상 평가법에 관한 연구

1. 서 론

관행적으로 사용되고 있는 정자농도, 정자활력, 생존율, 침체이상, 기형 등의 정액성상 평가법은 그 결과가 실제 종모돈의 수태성적과 일치되지 않기 때문에 보다 정확한 정액성상과 정액질에 대한 평가법의 개발이 요구되고 있다. 최근 CASA와 flow cytometry(FCM)법이 정자활력과 생존율의 객관적 평가기준을 제공해주고 있다. 그러나 고가의 기기이기 때문에 대규모 AI센터 이외의 시설규모에서는 설치와 사용에 어려움이 따르고 있다. 정자의 생존율 검사법으로서 생존정자에 염색되는 SYBR-14와 죽은 정자에 염색되는 propidium iodide(PI)를 이용한 방법이 많이 이용되고 있으며 기타 다른 형광 probe의 개발을 위하여 많은 연구가 진행중이다. 정자 침체상태의 검사법으로 상품화된 spermac stain kit가 있다. 또한 정자기능 검사법의 하나로 사람에서 개발된 HOST(hypoosmotic swelling test)가 가축에 도입되고 있으며 미토콘드리아기능 검사법도 유용한 방법으로 추천되고 있다. 최근에는 Kennedy 등(1989)이 사람에서, Glogowski 등(198)이 돼지에서 정자 acrosin activity의 임상적 측정법을 개발함에 따라 이에 대한 연구가 많이 진행되어왔고 이들 수준이 정액성상, 수정율 및 수태율과 상관성이 높게 나타나 있다.

2. 재료 및 방법

가. 공시 종모돈과 정액

본 실험에 공시된 종모돈은 다비 AI 센터에서 보유하고 있는 Yorkshire, Landrace 종 종모돈 중 수태율과 분만기록이 있는 종모돈을 선정하여 공시하였다. 공시정액은 수압법에 의해 3~7일 간격으로 분리채취된 원정액과 시판용 액상정액을 사용하였다.

나. 정액성상 및 정자기능 검사

1) 정자처리 방법

본 연구에서 수행된 기본적인 정액 처리 방법은 다음과 같다.

정자 전처리는 17℃ 항온기에서 40시간 이내로 저장한 정액에서 활력이 3(0~5단

계)이상, 생존율이 80% 이상인 정액만을 실험에 공시하였다.

2) 정자 운동양상 분석(CASA, computer-assisted sperm analysis)

운동성 검사를 위하여 먼저 정액시료를 37°C에서 30분간 배양하였으며 가온된 정액 5 μ l를 37°C로 유지된 분석기의 Makler chamber에 옮겨 검사하였다. CASA의 측정치는 MOT(%), VCL(μ m/sec), VSL(μ m/sec), LIN(VSL/VCL, %), VAP(μ m/sec), ALH(μ m), STR(VSL/VAP, %)등 이었다.

3) Spermac stain을 이용한 정자첨체 검사

염색방법은 Spermac kit manufacturer's guidelines(Stain Enterprises, South Africa)에 따라 수행하였다. 액상정액을 슬라이드에 도말하여 공기중에서 건조후 formalin이 함유된 Fixative I으로 고정하고 슬라이드를 증류수로 세척한 후 stain solution A 5분, stain solution B로 1분, stain solution C로 1분 3단계로 염색하였다. 각 염색 단계마다 증류수로 세척후 실온에서 공기중에 건조시켜 광학현미경에서 1000배 배율로 슬라이드당 200개 이상 정자에 대한 첨체 상태를 판독하였다.

정상첨체는 정자두부가 전체적으로 녹색으로 염색되고 두부의 끝부분에 얇게 진한 녹색띠가 나타나고 적도대는 붉은색으로 염색되고 미부는 두부와 같이 녹색으로 염색되는 경우로 판단하였다. 첨체가 손상된 정자는 두부의 끝부분의 진한 녹색띠가 끊어져 있거나 첨체막이 벗겨져 있는 경우를 기준으로 하였으며 첨체반응이 일어나 첨체가 소실된 정자는 두부가 전체적으로 붉은색으로 염색되었다. 정상첨체를 갖는 정자의 비율은 판독한 정자의 총수에서 정자두부의 끝이 진한 녹색띠를 가지고 전체적으로 녹색인 정자의 비율로 계산하였다.

4) HOST(hypoosmotic swelling test)

액상정액을 1.5ml eppendrop tube에 담아 500 \times g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 밑에 남아 있는 정자괴에 150mOsm/kg의 저삼투압액 1ml 넣고 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양후 10 μ l의 정액을 취하여 슬라이드위에 옮기고 위상차현미경 하에서 슬라이드당 200개이상의 정자를 조사하였다.

정자미부의 팽창 유형을 6가지로 구분하였으며 그 유형의 구분은 제 1절의 기준과 같았다.

5) 정자의 acrosin 수준(activity) 측정

가) Acrosin 측정을 위한 시료준비

Solution A는 0.025M HEPES buffer에 0.12M NaCl과 0.02% sodium azide를 첨가하여 pH를 7.5로 조정하였고, Solution B는 detergent buffer로 5차 증류수에 0.01% Triton X-100, 0.055M HEPES와 0.055M NaCl로 제조후 pH 8.0이되게 조정하였다. Solution C는 500mM benzamidine를 5차 증류수에 녹였다. Solution D는 substrate로 23mM BAPNA를 DMSO에 녹였다. Solution E는 substrate-detergent의 혼합으로 22.5ml의 solution B와 2.5ml solution D를 혼합하였다.

나) Acrosin 수준 측정

Kennedy 등(1989)의 방법에 준하여 시행하였다. 정액의 시료를 solution A로 정자 농도가 $15 \times 10^4/ml$ 되도록 희석을 하였다. 희석된 정액 1ml을 실온(약 20°C)에서 1,000×g 20분간 원심분리하고 상층액 0.8ml을 제거하고 0.8ml solution A를 정자 펠렛에 첨가하고 혼합한 후 위의 방법으로 다시 원심분리를 하였다. 마지막 세척 후 2.8ml의 solution A를 첨가하여 vortexing으로 섞은 후 정자농도가 $12.5 \sim 75 \times 10^3/ml$ 되게 희석하였다. 대조구 시험관에 희석정액 100 μ l에 solution C 100 μ l, solution E 1ml를 넣었으며 수준측정용 시험관에는 희석 정액 100 μ l과 1ml에 solution E를 첨가하고 천천히 섞은 후 25°C에서 60분간 배양하였으며 대조구를 제외한 모든 시험관에 100 μ l solution C를 첨가하였다. 그리고 1,000×g에서 30분간 원심분리하고 상층액을 채취하여 1ml cuvette에 담아 410nm spectrophotometer에서 흡광도를 측정하였다.

Acrosin 수준의 계산공식은 다음과 같다.

$$\text{Acrosin(mU)/}10^6\text{정자} = [(\text{평균OD}_{\text{test}}) - \text{OD}_{\text{control}}] \times 10^6 / 1,485 \times \text{측정할 때 정자농도}$$

6) 정자의 저온충격(cold shock)처리

1ml의 정액시료를 시험관(10×60mm)에 넣고 저온(5°C)충격을 가한 다음 37°C의 항온수조에 옮겨서 정액성상평가를 실시하였다.

다. 통계처리

실험에서 얻어진 결과에 대한 통계학적 분석은 SAS의 GLM(General Linear Model)의 procedure를 이용하여 분석을 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. HOST의 조건

돼지 정자의 HOST 최적조건을 비교한 결과는 표 1과 같다. HOST결과의 plateau(약 60%)의 시기가 저삼투압 30, 50, 100, 150mOsm/kg에서 각각 10분, 15분, 15분, 30분이었다. 그리고 30~150mOsm/kg에서 30분 배양시 정자 생존율과 미부정자 팽창비율에서는 표 2와 같이 저삼투압 간에 차이가 없었다. 그러나 생존율과 미부팽창 정자 비율 간에 유의적 상관을 보인 경우는 150mOsm/kg 저삼투압 조건이었다. 이러한 두 실험결과에서 돼지 정자의 HOST의 최적조건은 150mOsm/kg, 30분으로 판단되었고 이후 실험에서는 모두 이 조건에서 수행되었다.

표 1. 액상정액에서 저삼투압과 배양시간에 따른 미부 팽창정자의 비율 변화

배양시간 (분)	저삼투압(mOsm/kg)				
	0	30	50	100	150
5	*51.5±1.1 ^a	40.0±1.0 ^a	43.3±0.4 ^a	50.5±0.9 ^a	40.0±1.2 ^a
10	59.5±1.5 ^b	45.5±1.4 ^b	54.0±1.1 ^{ab}	53.0±1.2 ^{ab}	44.5±1.3 ^b
15	59.5±0.9 ^b	58.5±2.0 ^c	57.5±1.7 ^b	54.8±1.6 ^b	50.5±0.8 ^c
20	60.0±2.1 ^b	58.5±1.8 ^c	60.0±2.2 ^c	55.0±1.5 ^b	56.0±1.7 ^d
25	60.5±1.4 ^b	59.0±2.3 ^c	60.0±2.0 ^c	58.8±2.1 ^b	56.8±2.0 ^d
30	61.5±2.5 ^b	60.0±1.8 ^c	60.0±1.3 ^c	60.5±2.4 ^b	61.5±1.9 ^e

* 평균±표준편차

a,b,c,d,e P<0.05.

표 2. 액상정액에서 저삼투압처리에 따른 정자의 생존율과 미부 팽창율간의 관계

	저삼투압(mOsm/kg)			
	30	50	100	150
생존율(% , A)	*69.0±4.9 ^a	70.9±2.3 ^a	70.6±3.9 ^a	76.3±3.2 ^a
팽창정자(% , B)	31.7±15.0 ^b	30.2±5.5 ^b	33.1±6.1 ^b	37.5±15.0 ^b
상관(A:B)	0.20	0.20	0.44	0.90*

* 평균±표준편차

^{a,b} P<0.05.

나. HOST 결과에 영향을 주는 요인

저온(5°C)와 고온(37°C) 처리에서의 HOST 결과는 표 3과 같다. 원정액과 희석정액(1:1)에서는 고온처리 후 HOST 결과가 무처리와 저온처리에 비해 현저히 낮았으며 액상정액에서는 처리구간에 차이가 없었다. 액상정액에서 보존온도와 보존기간별 HOST 결과는 표 4와 같이 17°C 이외의 온도에서는 보존 2일부터 HOST 결과가 감소되었고 4~5일에 더욱 현저한 감소가 있었다. 17°C에서는 3일부터 낮아졌으나 3~6일간에 차이는 없었다. 종모돈과 관련된 요인에서의 결과는 표 5, 6 및 7과 같다.

표 3. 온도충격에 대한 정액간의 HOST 결과 차이

정액	종모돈 수	HOST 팽창정자의 비율		
		대조구	저온(5°C) 처리	37°C 처리
원정액	4	*94.2±2.3 ^a	87.0±5.1 ^a	55.5±18.6 ^b
희석정액(1:1)	5	38.0±11.2 ^a	29.2±11.5 ^a	21.2±7.8 ^a
액상정액	5	51.9±7.9 ^a	44.4±10.3 ^a	43.8±13.9 ^a

* 평균±표준편차

^{a,b} P<0.05.

표 4. 액상정액에서 보존기간과 온도에 따른 저삼투압팽창검사(HOST)결과 비교

보존기간 (일)	보존온도(℃)			
	4	17	25	39℃
1	*74.0±12.3 ^A	74.0±12.3 ^A	74.0±12.3 ^A	74.0±12.3 ^A
2	68.0±9.5 ^{AB}	72.0±10.4 ^A	70.0±9.4 ^{AB}	66.0±9.1 ^{AB}
3	59.5±7.3 ^{BC}	69.6±9.3 ^{AB}	67.5±7.8 ^{AB}	57.0±8.2 ^{BC}
4	57.0±5.9 ^C	66.0±6.5 ^{AB}	64.7±6.1 ^{AB}	56.0±4.7 ^{BC}
5	56.5±7.1 ^C	62.0±7.5 ^{AB}	58.0±4.1 ^{BC}	53.0±8.0 ^{BC}
6	46.0±3.9 ^{Cab}	54.0±6.8 ^{Ba}	47.0±5.0 ^{Cab}	43.0±5.6 ^{Cb}

* 평균±표준편차

a,b:A,B P<0.05.

표 5에서 종모돈 8두 개체간 변이계수는 원정액(5.5%)보다 회적정액(24.6%)과 액상정액(32.5%)에서 현저히 높았다. 이 결과에서 액상정액에서의 HOST는 반복조사가 필요함을 알 수 있었다.

표 6은 원정액의 HOST 결과를 상, 중, 하로 구분한 종모돈 개체의 4주 연속 조사된 HOST 결과의 개체변이이며 HOST 결과가 낮은 개체들에서 변이계수가 월등히 높았다. 표 7에서 17℃ 보존기간 중 종모돈 개체간의 HOST 변화가 차이가 나타나 있다. 최초 HOST 결과가 낮은 개체들에서 개체간 저하율의 개체변이가 더 컸다.

표 5. 종모돈 개체간 저삼투압팽창검사(HOST) 결과의 변이

종모돈개체	원정액	희석정액(1:1)	액상정액
1	92.2±13.7	81.6±6.3	78.0±6.1
2	94.2±21.4	63.6±10.9	39.4±11.7
3	92.5±17.3	82.2±11.6	67.5±10.7
4	88.2±10.8	59.9±19.4	50.3±22.8
5	80.5±21.0	45.4±13.0	40.5±6.3
6	85.7±16.3	49.1±16.6	28.0±6.6
7	95.3±16.5	46.8±21.3	41.8±24.4
8	90.0±19.4	52.0±12.3	54.9±15.8
평균±SD(변이계수)	89.8±4.9(5.5) ^a	60.1±14.8(24.6) ^b	50.1±16.3(32.5) ^b

^{a, b} P<0.05.

표 6. 종모돈 개체별 5주간 채취정액의 HOST결과

HOST 기준 (%)	조사두수	정액채취개시후 주				평균±SD (변이계수)
		1	2	3	4	
≤45	5	25.1	37.3	45.6	48.9	39.2±13.8(35)
46~65	7	39.3	49.3	59.2	67.3	53.8±16.4(31)
≥66	4	76.1	77.9	58.9	76.1	72.3±10.1(14)

표 7. 액상정액의 17℃ 보존기간에 따른 종모돈 개체간 HOST 감소율의 차이

HOST 기준(%) (0일)	조사두수	보존기간(일)별 HOST			감소율, a-b/a (변이계수)
		1(a)	4	7(b)	
≤45	4	32.7±7.6	30.2±6.0	27.1±4.1	16±13(83)
46~65	4	55.8±3.2	51.1±3.9	31.2±18.6	31±9(29)
≥66	7	79.2±7.3	66.7±9.7	54.8±8.4	29±8(27)

다. 정자 Acrosin 수준

정자 acrosin 수준 측정에서 정자배양온도에 따른 acrosin 수준변화를 보면 표 8과 같다. 원정액과 희석정액(1:1)에서는 25℃ 이상에서 높은 수준이었고 그 이상 온도 간에는 차이가 없었다. 액상정액에서는 17℃부터 높았다. 그리고 원정액의 정자 acrosin 수준은 4.29~5.17mU로서 액상정액의 3.60~4.24mU보다 높았다. 따라서 이후 실험에서는 25℃에서 60분간 배양조건을 택하여 수행되었다.

종모돈 개체별 정자의 acrosin 수준은 표 9와 같이 원정액과 희석정액(1:1)에서는 각각 4.61~5.88mU와 3.71~5.15mU로서 희석정액에서 개체간 변이가 다소 높았다 (9%와 12%). 동결정액에서 종모돈 개체별 acrosin 수준은 표 10과 같다. 액상정액에서는 3.52~5.31mU로서 개체간 변이계수는 13%였다.

표 8. 정액 배양온도에 따른 정자 Acrosin 수준 변화

정액	종모돈수	정자 acrosin 수준(mU/10 ⁶ 정자)					
		4	17	25	30	37	39℃
원정액	7	*4.29±0.93 ^b	5.01±0.61 ^{ab}	5.03±0.59 ^a	5.17±0.64 ^{ab}	4.78±0.78 ^{ab}	4.61±0.66 ^{ab}
희석정액1(:1)	6	4.48±0.79 ^b	4.66±0.78 ^{ab}	4.76±0.76 ^a	4.80±0.73 ^a	4.80±0.70 ^a	4.81±0.85 ^a
액상정액	7	3.60±0.59 ^b	4.19±0.37 ^a	4.24±0.35 ^a	4.13±0.44 ^a	4.13±0.44 ^a	3.83±0.32 ^{ab}

* 평균±표준편차

^{ab} P<0.05.

표 9. 종모돈의 개체별 정자 Acrosin 수준의 차이

종모돈개체	정자 acrosin 수준(mU/10 ⁶ 정자)		
	원정액	희석정액(1:1)	액상정액
1	*5.88±0.39 ^a	5.15±0.59 ^a	5.31±0.22 ^a
2	5.60±0.54 ^{ab}	4.62±0.85 ^{ab}	5.00±0.60 ^{ab}
3	5.46±0.23 ^{ab}	4.55±0.75 ^{ab}	4.68±0.17 ^{abc}
4	5.44±0.36 ^{ab}	4.51±0.73 ^{ab}	4.28±0.32 ^{bdc}
5	5.07±0.16 ^{ab}	3.94±0.59 ^b	4.27±0.75 ^{bdc}
6	4.75±0.23 ^b	3.92±0.51 ^b	4.22±0.77 ^{bdc}
7	4.66±0.51 ^b	3.84±0.16 ^b	3.95±0.73 ^{dc}
8	4.61±0.33 ^b	3.71±0.23 ^b	3.52±0.06 ^d

* 평균±표준편차

^{a,b,c,d} P<0.05.

표 10. 동결융해 정자의 Acrosin 수준

종모돈개체	정자 acrosin 수준(mU/10 ⁶ 정자)		
	원정액	희석정액(1:1)	동결정액
1	*5.60±0.54	4.21±0.27	3.07±0.14
2	4.66±0.51	3.94±0.14	3.04±0.19
3	5.46±0.32	4.20±0.57	2.99±0.14
4	5.07±0.47	4.00±0.19	3.87±0.19
5	5.44±0.36	4.12±0.22	3.77±0.21
6	6.10±0.39	3.89±0.30	3.69±0.77
평균	5.39±0.55 ^a	4.06±0.28 ^b	3.41±0.41 ^c

* 평균±표준편차

^{a,b,c} P<0.05.

정자 acrosin 수준의 변화요인으로서 조사된 온도충격의 영향은 표 11과 같이 큰 변화가 없었다. 액상정액에서 보존온도와 보존기간에 따른 수준변화(표 12)는 17~39℃에서 보존 3일에 크게 저하되었으며 보존 3~4일에서는 4℃와 39℃에서 현저히 저하되었다. 따라서 액상보존 온도가 17℃~25℃가 보다 유리함을 알 수 있었다.

계절의 영향을 보면 표 13과 같이 5월 제조 액상정액에서는 보존 5일까지 수준변화가 없었으나 8월 여름에서는 보존일이 경과됨에 따라 크게 저하되었다.

동결 용해에 따른 정자 acrosin 수준은 표 12와 같이 원정액과 희석정액의 63%와 84%로 크게 저하됨을 알 수 있다.

15두 종모돈을 정자 acrosin 수준에 따라 3군으로 구분하여 보존기간에 따른 수준의 저하율을 보면 표 14와 같이 원정액의 정자 acrosin 수준이 낮은 개체에서 저하율과 변이계수가 28%로 높은 개체보다 현저히 컸다.

표 11. 온도충격에 따른 정자 Acrosin 수준 변화

정액	종모돈수	정자 acrosin 수준(mU/10 ⁶ 정자)		
		대조구	5℃ 저온충격	37℃ 고온충격
원정액	5	*5.38±0.54	5.20±0.52	5.16±0.50
희석정액(1:1)	5	5.43±0.70	4.91±0.75	5.11±0.54
액상정액	17	4.21±0.60	4.00±0.59	3.98±0.61

*평균±표준편차

표 12. 액상정액의 보존기간과 보존온도에 따른 정자 Acrosin 수준 변화

보존기간 (일)	정자 acrosin 수준(mU/10 ⁶ 정자)			
	4	17	25	39℃
1	*4.36±0.18 ^A	4.36±0.18 ^A	4.36±0.18 ^A	4.36±0.18 ^A
2	3.54±0.15 ^{Bb}	4.32±0.13 ^{Aa}	4.25±0.23 ^{Aa}	4.23±0.19 ^{Aa}
3	3.54±0.17 ^{Bb}	3.89±0.14 ^{Ba}	3.72±0.13 ^{Bab}	3.46±0.14 ^{Bb}
4	3.27±0.11 ^{Bb}	3.62±0.20 ^{Ba}	3.46±0.15 ^{Bab}	3.23±0.17 ^{Bb}

* 평균±표준편차

a,b:A,B P<0.05.

표 13. 액상정액의 보존기간별 정자 Acrosin 수준 변화

정액 채취월	종모 돈수	보존 기간(일)				
		1	2	3	4	5
5	8	*4.15±0.48 ^a	3.77±0.52 ^a	3.91±0.46 ^a	4.13±0.43 ^a	3.98±0.36 ^a
8	8	5.59±0.26 ^a	5.17±0.12 ^b	4.71±0.17 ^c	4.33±0.17 ^d	3.71±0.26 ^e

* 평균±표준편차

^{a,b,c,d,e} P<0.05.

표 14. 액상정액의 17℃ 보존기간에 따른 종모돈 개체별 정자 Acrosin 수준 변

Acrosin 그룹 (mU/10 ⁶ 정자)	조사두수	보존기간(일)			감소율, a-b/a (변이계수)
		1(a)	4	7(b)	
≤3	4	4.76±0.2	4.09±0.30	3.74±0.28	21.5±3.7(17)
3~4.4	4	4.10±0.12	3.49±0.33	3.16±0.26	23.3±4.2(18)
≥4.5	7	3.19±0.40	2.76±0.36	2.38±0.33	25.7±7.3(28)

라. 정액성상, 정자 기능측정치간의 상관

원정액과 동결정액에서 HOST 결과, acrosin 수준, 생존율, 미토콘드리아 기능 및 정상첨체율 은 표 15와 같으며 이들 간의 상관관계는 표 16과 같다. 원정액의 정자 acrosin 수준은 원정액의 HOST 결과, 동결 후 acrosin 수준과 유의적 상관($r=0.80$ 과 0.88)을 가졌고 용해 후 정상첨체율과는 $r=-0.61$ 의 유의적 상관이 있었다. 원정액의 HOST 결과도 동결 후 acrosin 및 정상첨체율과 $r=0.80$ 과 -0.61 의 유의적 상관이 있었다.

표 16. 종모돈 개체간 동결정자의 기능에 대한 상관관계(순위상관)

기능	1	2	3	4	5	6	7
1. 채취후, Acrosin(mU/10 ⁶ 정자)	-	0.83*	0.85*	0.10	0.25	0.38	-0.61*
2. 채취후, HOST(%)		-	0.90	0.21	0.28	0.47	-0.61*
3. 동결후 Acrosin(mU/10 ⁶ 정자)			-	0.37	-0.40	0.50	0.39
4. 동결후 HOST(%)				-	0.48*	0.48	-0.34
5. 동결후 생존율(%)					-	0.86*	0.20
6. 동결후 미토콘드리아기능(%)						-	-0.33
7. 동결후 정상첨체율(%)							-

* P<0.05.

제 5 절 정자 기능평가 및 체외수정에 의한 종모돈의 수태성적 간접 평가에 관한 연구

1. 서 론

정액을 주입하기전에 정자의 수정능력 또는 수태능력을 미리 예측할 수 있다면 양돈산업의 경제성을 높이는데 크게 기여할 수 있을 것이다. 관행적 정액성상 또는 정자기능 평가법의 결과는 실제 수태성적과 일치되지 못하고 있다. 소를 중심으로 체외수정기술에 의한 수태율 간접평가법의 시도가 많이 행해져왔다. 최근 돼지에서는 체외기술의 도입이 시작된 이후로 돼지에서조차 돼지 난자를 이용한 정자침입을 또는 체외수정율이 정자의 수정능력을 평가하는데 유용한 수단의 하나로 개발되고 있다. 최근에 Gadea 등(1998, 2000)에 의하면 정자의 침체이상율, 생존율, HOST 등은 극히 수태율이 낮은 종모돈의 수태능력 예측에만 가능하며 정자의 난자침입율은 정자의 수정능력을 체외에서 평가하는데 정확도가 높은 유용한 방법으로 보고한 바 있다.

본 연구에서는 정액성상, 정자기능, 체외수정율 및 배반포발달율간 관계를 조사하고 그 결과에 기초하여 체외수정율에 의한 종모돈의 수태율 예측기술을 개발하고자 시도되었다.

2. 재료 및 방법

가. 공시 종모돈과 정액

본 실험에 공시된 종모돈은 다비 AI 센터에서 보유하고 있는 Yorkshire, Landrace 종 종모돈 중 수태율과 분만기록이 있는 종모돈을 선정하여 공시하였다. 공시정액은 수압법에 의해 7일간격으로 분리채취하여 제조된 후 시판용 액상정액을 사용하였다.

나. 정액성상 및 정자기능 검사

1) 정자처리

정자 전처리는 17℃ 항온기에서 40시간 이내로 저장한 액상정액에서 활력이 3(0~5단계)이상, 생존력이 80% 이상인 정액만 실험에 공시하였다. 체외수정을 위한 정자 처리는 액상정액을 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS)로 희석하여 원심분리(1,900×g, 3min)에 의해 상층액을 제거하고 정자괴를 잘 풀어준 후 2차 원심분리

를 실시하였다. 수정배양액 mTBM에서 정자의 수정능 획득을 유도시킨 후 체외수정 실험에 공시하였다.

2) 정자 운동양상 분석(CASA)

정액시료를 37°C에서 30분간 가온 후 정액 5 μ l를 분석기의 Makler chamber에 옮겨 검사하였다. CASA의 측정치는 제 1절의 기준과 같았다.

3) Spermac stain을 이용한 정자첨체 검사

염색방법은 Spermac kit manufacturer's guidelines(Stain Enterprises, South Africa)에 따라 수행하였다. 정상첨체와 첨체손상의 구분방법과 계산은 제 4절에서 언급된 것과 같다.

4) HOST(Hypo-osmotic swelling test)

액상정액을 1.5ml eppendroup tube에 담아 500 \times g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 밑에 남아 있는 정자괴에 150mOsm/kg의 저삼투압액 1ml 넣고 37°C에서 30분간 배양하였다.

정자미부의 팽창 유형을 6가지(b~g)로 구분하여 관찰하였으며 구체적 방법은 제 1절의 내용과 같다.

5) 정자의 acrosin activity(수준)측정

(1) Acrosin 측정을 위한 solution

Solution A, B, C, D 및 E의 제조방법은 제 4절의 내용과 같다.

(2) Acrosin 수준 측정

Kennedy 등(1989)의 방법에 준하여 시행하였으며 공시된 시료 정액을 solution A로 정자농도가 15 $\times 10^4$ /ml 되도록 희석하였으며 희석된 정액 1ml을 실온(약 20°C)에서 1,000 \times g 20분간 원심분리하고 상층액 0.8ml을 제거하고 0.8ml solution A를 정자 펠렛에 첨가하고 혼합한 후 위의 방법으로 다시 원심분리를 하였다. 마지막 세척 후 2.8ml의 solution A를 첨가하여 vortexing한 후 정자농도가 12.5~75 $\times 10^3$ /ml 되게 희석하였다. 그 후의 처리방법과 spectrophotometer에서 흡광도의 측정 및 acrosin 수

준의 계산공식은 제 4절에서 설명된 것과 같다.

6) 정자의 저온충격(cold shock)처리

1ml의 정액시료를 시험관(10×60mm)에 넣고 저온충격을 가한 다음 37℃의 항온수조에 옮겨서 정액성상평가를 실시하였다.

다. 난자의 체외성숙과 체외수정

1) 배양액 제조

가) 미성숙 난포란의 체외성숙 배양액

Bovine serum albumin(BSA)가 첨가되지 않은 North Carolina State University(NCSU)23 배양액에 10%(v/v) 돼지난포액(pFF), 0.1mg/ml cystein와 호르몬 $5\mu\text{l/ml}$ FSH, $10\mu\text{l/ml}$ hCG, $10\mu\text{l/ml}$ estradiol-17 β 를 첨가하고 0.2 μm pore filter를 이용하여 여과한 후 39℃, 100% 습도, 95% 공기, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 전배양한 후 사용하였다. 돼지난포액(pFF) 제조는 난포란 채란시 회수된 난포액을 1,500×g, 30분 4℃에서 원심분리한 후 상층액만 취하여 0.2 μm pore filter를 이용하여 여과시킨 후 1.5ml eppendrof tube에 분주하여 -20℃에서 보관하였다가 실온에서 용해하여 사용하였다.

나) 체외수정 배양액

Modified tris-buffered medium(mTBM)용액을 사용하였다. 5차증류수에 113.1mM NaCl, 3mM KCl, 7.5mM CaCl₂·2H₂O, 20mM tris, 11mM glucose, 5mM sodium pyruvate, 함유되도록 제조한 다음 0.2 μm pore filter를 이용하여 여과시킨 후 적당량 분주하여 39℃, 100% 습도, 95% 공기, 5% CO₂ 배양기에서 18~24시간 정도 정배양한 후 사용하였다.

다) 수정란의 체외배양액

NCSU 23에 0.4% BSA를 첨가한 후 0.2 μm pore filter를 이용하여 여과시킨 후 적당량 분주하여 39℃, 100% 습도, 95% 공기, 5% CO₂ 배양기에서 12시간정도 전배양하여 사용하였다.

2) 난포란의 체외성숙

도살직후 회수한 난소는 8.5g/L의 sodium chloride, pencillin 또는 hostacillin을 첨가한 생리식염수에 담아 실험실로 운반하였다. 미성숙 난포란은 18-gage 주사기로 난소의 난포직경이 2~6mm인 포상난포를 찢어 난포액과 함께 채취하였고 난구세포의 부착상태가 양호하고 세포질이 균일한 미성숙 난자만을 공시하였다. 난소로부터 채취한 난포란은 체외성숙 배양액으로 3~4회 세척후 30mm 배양접시에 체외성숙 배양액으로 만들어진 25 μ l의 미세소적에 10~15개씩 넣고 mineral oil로 피복하고 39 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 95% 공기, 5% CO₂ 배양기에서 20~22시간 배양하고 호르몬이 첨가되지 않은 배양액으로 다시 2~3번 세척하여 20~22시간을 더 배양하여 총 40~44시간 동안 체외성숙을 유도 하였다.

3) 체외수정

체외성숙 배양한 난자는 0.1% hyaluronidase가 함유된 NCSU 23 배양액에서 난구세포를 제거하고 1mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM용액으로 3회 세척 후 미리 준비된 체외성숙용 50 μ l drop에 30~40개의 난자를 넣었다. 정자의 준비는 액상정액을 시험관에 담아 0.1% BSA가 함유한 D-PBS를 첨가 후 1,900 \times g에서 3분간 2회 원심분리하고 마지막 세척후 수정배양액을 첨가하여 정자를 재 부유시킨 다음 최종 0.5 $\times 10^6$ ml 정자 농도로 조정하고 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 난자와 수정시켰다.

라. 수정란의 체외배양

체외수정 후 체외배양액으로 3회 세척 후 30mm 배양접시에 만들어진 25 μ l 미세소적의 체외배양에 옮기고 mineral oil로 피복하고, 각 소적마다 수정란을 10~15개씩 옮겨 놓은 후 39 $^{\circ}$ C, 100% 습도 95% 공기, 5% CO₂ 배양기에서 체외배양 하였다. 수정후 48시간 간격으로 신선한 체외배양액으로 교환하면서 수정 후 7~9일까지 배반포로의 발달을 유도하였다.

마. 통계처리

실험에서 얻어진 결과에 대한 통계학적 분석은 SAS의 GLM(General Linear Model)의 procedure를 이용하여 분석을 하였고, 수정율은 X²-검정, 정자기능검사 결과와 체외수정율간의 상관은 Spearman's rank correlation에 의해 계산하고 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 정액성상과 체외수정율

표 1은 체외수정을 위한 정자처리시 조사된 정액성상과 정자기능의 변화이다. 정상 침체비율은 처리전 72.7%(64.7~81.9%)에서 처리후 29.6%(21.8~41.4%)로 처리전의 약 40%로 감소되었다. HOST결과는 처리전 35.3%(26.5~54.5%)에서 처리후 32.6%(24.0~50.0%)로 90% 감소되었다. 한편 acrosin은 4.06mU에서 4.67(3.2~5.6)mM로 증가되었다. 표 2에서는 액상정액을 이용한 체외수정에서 체외수정율은 정자의 acrosin 수준 및 정자활력과 높은 상관관계($r=0.88, 0.97$)가 있었으며 또한 생존율과 HOST 결과와는 유의성은 없었으나 (+)상관이 있었다. 한편 정자 acrosin 수준은 운동성의 LIN과 유의적 상관이 있었다.

표 1. IVF를 위한 정자처리 전후에서 종모돈 개체간 정자성상과 정자기능 변화

개체	정상침체 비율(%)		HOST(%)		Acrosin 수준 (mU/10 ⁶ 정자)	
	전	후	전	후	전	후
1	78.5±3.0 ^a	32.5±0.8	33.4±4.5 ^a	24.0±8.0 ^a	3.7±0.2 ^a	4.1±1.2 ^a
2	73.6±3.7 ^{ab}	23.1±3.2	37.0±1.7 ^a	26.2±3.9 ^a	3.8±0.1 ^a	5.5±0.1 ^b
3	78.0±3.1 ^b	22.4±3.9	34.8±1.9 ^a	44.0±1.9 ^b	4.1±0.1 ^a	4.2±0.1 ^a
4	65.4±3.3 ^a	48.1±3.4	38.4±1.4 ^a	50.0±10.1 ^b	4.1±0.4 ^a	4.9±0.6 ^{bc}
5	67.5±3.9 ^a	41.4±5.2	47.4±11.4 ^{ab}	31.2±0.6 ^{ab}	4.2±0.4 ^{ab}	5.6±0.4 ^c
6	81.9±1.6 ^b	23.4±3.7	26.5±2.5 ^a	32.0±2.5 ^{ab}	3.8±0.2 ^a	3.2±0.3 ^a
7	72.1±2.1 ^{ab}	21.8±3.7	40.1±6.9 ^a	28.1±7.7 ^{ab}	4.2±0.1 ^{ab}	5.5±0.1 ^c
8	64.7±2.4 ^a	24.4±4.1	54.5±5.5 ^b	34.4±9.1 ^{ab}	4.6±0.1 ^b	4.1±0.2 ^a

표 2. 액상정액의 정액성상과 체외수정율간의 상관관계

체외수정율, 정액성상	평균±SD	상 관			
		1	2	3	4
1. 체외수정율(%)	56.3±11.8	1	0.71	0.50	0.88**
2. 생존율(%)	76.3±4.3	0.71	1	0.78	0.93**
3. HOST(%)	47.4±13.5	0.50	0.78	1	0.44
4. Acrosin 수준(mU/10 ⁶ 정자)	4.10±0.37	0.88*	0.93**	0.44	1
CASA, 활력(%)	66.4±1.2	0.97**	0.61	0.39	0.78
VCL(μm/s)	51.5±26.0	-0.57	0.01	0.10	-0.13
VSL(μm/s)	18.7±6.5	0.40	0.53	0.30	0.78
LIN(VSL/VCL, %)	36.0±11.0	0.68	0.63	0.33	0.93**
ALH(μm)	4.5±0.5	-0.60	0.05	0.41	-0.56
BCF(Hz)	11.1±0.8	-0.72	-0.30	-0.13	-0.30

*P<0.05, **P<0.01.

표 3에는 체외수정율이 HOST 결과보다는 정자 acrosin 수준에 따라 차이가 많았다. Acrosin이 5.6mU 이상인 경우에 체외수정율과 배반포발달율이 높았다. 표 4는 체외수정율과 정자염색질구조와의 관계인데 COMPat와 SDat가 높은 경우 체외수정율이 낮았다. 체외수정율과 COMPat 및 %PeakR간의 상관은 (-)상관이 있었으나 유의성은 없었다.

표 3. HOST와 Acrosin 수준에 따른 체외수정율 비교

HOST(%)			Acrosin 수준(mU/10 ⁶ 정자)			
기준	공시난자수	체외수정율(%)	기준	공시난자수	체외수정율(%)	배반포율(%)
≤39	1,991	68.3±6.5	≤4.0	1,222	73.1±10.0	15.4±5.2
40-49	912	71.4±6.4	4.1-5.5	1,267	70.1±4.8	8.8±3.9
≥50	536	71.9±7.8	≥5.6	694	75.1±8.3	19.9±4.1

표 4. 체외수정율과 SCSA결과 비교

체외수정율(%)	조사두수	SCSA			
		COMPat	SDat	%Red	%PeakR
≤55	4	4.2±0.8	41.9±16.6	3.4±1.1	60.6±12.0
56-65	6	3.6±1.6	39.8±11.5	3.1±1.7	62.0±5.5
≥66	4	3.0±1.1	27.1±19.0	2.9±1.5	57.3±15.3
체외수정율과 상관(r)		-0.27	-0.09	0.01	-0.29

나. 체외수정율과 수태율

정액성상, 체외수정율 및 수태율과의 관계는 표 5와 같이 수태율은 acrosin 수준 및 HOST 결과와 유의적 상관을 보였으며($r=0.80, 0.87$) 체외수정율 및 배반포발달율과는 (+)상관이 있었으나 유의성은 없었다. 한편 정상침체율이 낮을 때 수태율은 높은 경향이 있었으나 유의성은 없었다.

중모돈의 수태율을 기준으로 정액성상간의 관계를 보면 표 6과 같다. 수태율이 높은 개체에서 acrosin 수준, HOST 결과가 높아 이들간의 상관이 $r=0.77$ 과 0.76 으로 유의적이었다.

표 7은 1, 2차로 나뉜 실시된 체외수정 실험결과와 공시된 정액제공 중모돈의 수태성적을 비교한 결과이다. 표 8은 이들 결과간에 상관관계이다. 1-2차 실험에서 모두 체외수정율이 배반포발달율과 유의적으로 높은 상관이었고 또한 1차실험에서는 배반포발달율이 산자수와 높은 상관이었다($r=0.77$). 한편 수태율은 체외수정율 및 배반포율과 다소 높은 (+)상관이었으나 유의성은 없었다.

표 5. 종모돈 액상정액의 정액성상, 체외수정율 및 수태율과 관계

구분	평균±SD(n=8)	순위상관					
		1	2	3	4	5	6
1. 수태율(%)	85.1±11.2	-	0.59	0.44	0.80*	0.87*	-0.60
2. 체외수정율(%)	72.5±6.5		-	0.50	0.29	0.43	-0.25
3. 배반포발달율(%)	14.0±6.1			-	0.24	-0.35	-0.35
4. 정자 acrosin 수준(mU/10 ⁶ 정자)	4.0±0.3				-	0.52	0.04
5. HOST(%)	39.0±8.6					-	0.75*
6. 정상첨체율(%)	72.9±6.5						-

*P<0.05.

표 6. 종모돈 정액의 수태율, 정자 acrosin 수준, 정상침체율 및 HOST 결과간의 관계

수태율(%), A	개체수	Acrosin (mU/10 ⁶ 정자), B	정상침체율(%), C	HOST(%), D
≤95	3	4.37±0.20	74.7±9.7	48.0±5.8
90~94	6	4.15±0.19	63.0±9.1	46.7±9.1
80-89	4	3.84±0.21	73.1±7.8	38.5±6.1
<80	2	3.53±0.25	62.2±15.2	30.0±5.0
상관 A		0.77**	0.22	0.76*
B		-	0.39	0.85*
C			-	0.09
D				-

표 7. 종모돈 개채별 채외수정율, 배반포발달율 및 수태성적 비교

실험	개채번호	채외수정율		배반포발달		수태성적				
		공시난자	%	공시수정란	%	종빈돈수	산차	수태율(%)	분만율(%)	산자수
1차	1	610	62.4±7.1	378	12.2±6.8	20	2.3	90	80	9.0
	2	424	63.6±13.9	278	8.5±7.6	19	6.3	67	46	8.3
	3	359	67.9±14.7	247	15.8±7.4	163	4.1	88	71	10.1
	4	206	68.7±1.9	141	11.5±7.9	57	2.3	92	76	9.9
	5	336	72.7±9.1	199	9.4±9.0	90	3.2	85	66	8.9
	6	311	79.6±3.2	248	16.9±4.8	29	3.3	97	76	9.6
	7	239	79.8±6.1	191	20.7±5.1	17	1.8	71	69	10.5
	8	233	79.9±6.4	148	28.8±8.3	42	2.4	95	86	9.9

표 7. 계속

실험 개체번호	체외수정율		배반포발달		수태성적					
	공시난자	%	공시수정란	%	중빈돈수	산차	수태율(%)	분만율(%)	산자수	
2차	1	132	52.9±6.2	74	25.1±11.0	103	3.9	96	80	10.5
	2	181	57.3±17.4	96	20.7±3.8	57	5.8	94	86	10.6
	3	287	60.5±16.7	171	23.5±16.3	16	7.0	77	53	10.0
	4	150	61.0±14.4	90	19.8±13.3	88	3.3	81	58	10.1
	5	122	63.1±12.6	74	24.6±13.3	25	6.0	8.0	76	11.1
	6	126	64.8±4.6	78	28.2±1.9	176	3.0	85	51	10.7
	7	165	65.7±19.6	99	36.6±15.0	55	2.7	97	85	10.7
	8	102	67.1±4.1	68	29.7±3.5	10	4.6	98	94	12.0
	9	215	72.3±21.2	131	33.4±4.2	12	5.0	96	95	9.5

표 8. 종모돈의 체외수정율, 배반포발달율 및 수태성적간의 순위 상관

	1	2	3	4	5
1. 체외수정율		0.72*	0.33	0.24	0.52
2. 배반포발달율	0.71*		0.52	0.60	0.77*
3. 수태율	0.67	0.37		0.86*	0.60
4. 분만율	0.40	0.43	0.80*		0.57
5. 산자수	0.37	0.20	0.27	-0.02	

*순위상관계수 : 2차실험(*P<0.05=0.66) \ 1차실험(*P<0.05=0.71)

제 6 절 돼지 정자의 정자염색질구조검사(SCSA)에 관한 연구

1. 서 론

정자염색질구조검사(SCSA, sperm chromatin structure assay)는 DNA 특이 형광색소인 acridine orange(AO)를 이용하여 DNA의 변성정도를 측정할 수 있는 방법으로 알려져 있다. Evenson 등(1980, 1985)과 Buttachey 등(1987)에 의해 형광현미경 대신에 flow cytometer(FCM)의 이용으로 SCSA의 새로운 기법을 제시해 왔다. 염색질 구조의 이질성(heterogeneity)이 정자형성의 이상 뿐만 아니라 이상정자의 출현율, 불임성과 관련된 정액성상과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었으며, 또한 수태성적과도 상관이 높은 것으로 보고되었다. Evenson 등(1994)은 SCSA가 종모돈의 정액질 평가와 수태율 예측치로서 이용이 가능함을 제시한 바 있다. FCM-SCSA는 과거 AO 염색 후 형광현미경법에서 발생하는 측정오차를 최소화 할 수 있는 매우 정확도가 높은 방법으로 평가되고 있다. 본 연구에서는 SCSA를 이용하여 종모돈의 정액 생산능력과 더불어 종모돈의 수태성적과의 관계를 조사함으로써 SCSA를 종모돈의 선발과 수태율 향상기술개발에 응용하고자 시도되었다.

2. 재료 및 방법

가. 공시 종모돈과 공시정액

공시종모돈은 정액 채취 기록, 인공수정 기록 및 수태성적이 있는 개체를 선택하여 공시하였으며 공시정액은 3개 AI센터로부터 채취된 원정액과 시판용 액상정액을 공시하였다.

나. 정자 염색질 구조검사(SCSA)

1) 정자처리

원정액 또는 액상정액에 PBS액을 넣고 원심분리 후 상층액을 제거하고 정자농도가 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ 되게 재부유 한 다음 정자염색질의 분해와 염색을 위해서 Evenson(1990)에 방법에 따라 2단계의 SCSA protocol을 거쳤다.

정액 0.2ml에 A용액 0.4ml를 첨가 후 30초 뒤에 acridine orange(AO)가 함유된 용

액 B를 1.2ml 넣고 3~5분 후에 cytometric analysis를 실시하였다.

Acid-detergent 용액 A(pH 1.4)은 0.1% triton X-100, 0.08N Hcl, 0.15M Nacl로 구성되었으며 AO 염색 buffer인 용액 B(pH 6.0)는 citric-phosphate buffer 100ml에 0.1M citric acid 37ml와 0.2M Na₂HPO₄ 6ml이 들어있고 AO는 최종농도가 6 μ g/ml 되도록 제조하였다.

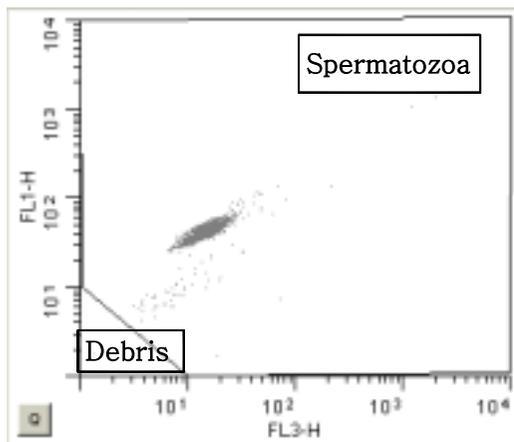
2) Flow cytometer

Sorter sensor unit가 장치된 FACSCalibur Flow cytometer 110VAC(Becton Dickinson)를 이용하였으며 AO는 488nm와 35mW laser beam에서 excitation되었으며 fluorescence는 550DL과 525BP 분석하였고 분석자료는 list mode files로 저장하였다.

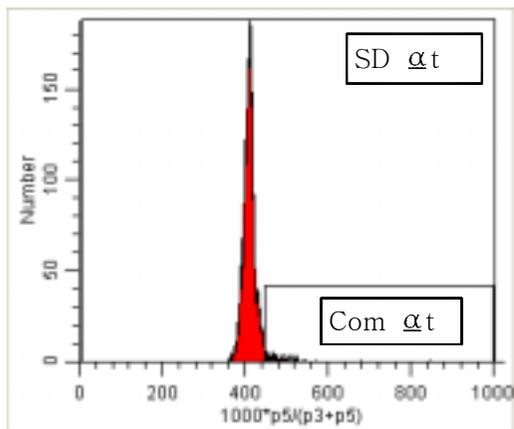
3) Data분석

Bochenek 등(2001)의 방법에 따라 listmode file를 WinList 5.0 software(Verity software House, USA)를 이용하여 분석하였다.

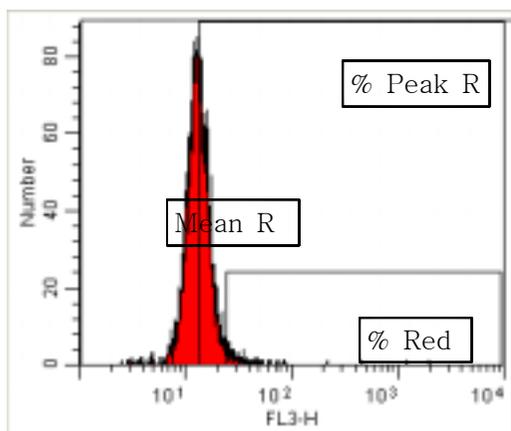
분석전에 debris와 기타 오염세포는 red-green fluorescence cytogram에서 그림1a와 같이 제거하였고 구조적 이상 chromatin을 갖는 정자수는 각 정자로부터 계산된 at값에 기초하였다. 여기서 at 값은 red(denatured DNA)/green(native DNA)+red fluorescence이다. 각 정액시료로부터 그림 1과 같이 COMPat, SDat, %R, %PeakR 값을 구하였고 at histogram(그림 1b)에서는 COMPat(at기준치 값의 주 집단으로부터 벌어난 high red fluorescence를 갖는 정자비율)과 SDat(전체 at 기준치로 계산된 at 기준치의 표준편차)를 계산하였고 red fluorescence histogram(그림 1c)에서는 %Red(red fluorescence 상에서 주 집단으로부터 벌어난 정자의 비율)와 %PeakR(peak channel로부터 high red fluorescence를 갖는 정자의 비율)을 계산하였다.



a)



b)



c)

그림 1. Flow cytometer로 분석된 at histogram(b)과 red fluorescence histogram(c).

3. 결과 및 고찰

가. FCM-SCSA결과의 변이 요인

종모돈 품종에 따른 SCSSA결과는 표 1과 같이 Duroc종에서 %PeakR를 제외하고 모두가 다른 두 품종보다 높았다. 종모돈의 월령을 4구로 나눠 조사한 결과(표 2)에서는 15~17개월령에서 SCSSA결과가 다소 높았으며 한편 결과의 변이계수가 14개월령 이하에서 더 크게 나타났다. 종모돈 동일개체에서 반복 측정된 SCSSA결과(표 3)에서도 14~16개월령에서 다른 월령보다 높았다. 그러나 개체내 변이계수는 COMPat의 경우 13개월 이하보다 17개월령 이상에서 더 높았다.

표 1. 종모돈 품종별 정자의 FCM-SCSSA결과 비교

품종	조사두수	COMPat	SDat	%Red	%PeakR
Landrace	20	3.6±3.2	28.1±19.1	4.2±2.9	57.7±10.9
Yorkshire	11	3.9±1.5	35.2±16.9	3.4±1.8	58.9±6.6
Duroc	29	5.3±2.5	32.6±13.7	8.3±3.7	54.5±7.7

표 2. 종모돈 월령별 정자의 FCM-SCSSA결과 비교

월령	조사두수	COMPat	SDat	%Red	%PeakR
<11	30	4.8±2.8(59)*	29.5±14.3(49)	7.3±3.3(45)	56.1±8.5(15)
12~14	16	5.3±2.7(51)	32.9±15.5(47)	7.4±2.9(39)	53.1±7.0(19)
15~17	13	6.1±2.5(43)	36.0±12.2(34)	9.1±3.6(39)	54.4±9.2(17)
≥18	20	4.3±1.5(35)	26.1±8.6(33)	7.0±2.7(38)	55.1±8.0(14)

*() : 변이계수

표 3. 동일개체 종모돈의 FCM-SCSA결과 변이 정도

월령	조사두수	COMPat	SDat	%Red	%PeakR
≤13	5	2.9±0.4(15)*	24.1±6.4(26)	5.5±7.8(15)	59.7±5.7(9)
14~16	6	5.3±1.2(23)	33.2±6.0(18)	6.9±2.1(29)	53.4±5.3(10)
≥17	6	4.7±2.3(49)	30.9±8.6(28)	6.3±1.3(21)	56.0±5.7(10)
계	17	4.4±0.4(41)	29.9±6.4(26)	6.3±1.7(26)	56.0±5.9(11)

*() : 변이계수

정액의 SCSA를 조사하기 이전 2개월간의 정액채취 빈도에 따른 영향을 보면 표 4와 같이 COMPat와 %Red는 6~7회 채취에서 높았고 %Red는 5회 이하에서 낮았다. 이러한 변이의 원인에 대해서는 더 조사가 요구되고 있다. 즉, 정액 채취빈도에 따라 정액성상의 차이가 표 4와 같이 현저하기 때문에 SCSA와 정액성상간의 관계가 있을 것으로 추측되기 때문이다.

표 4. 종모돈의 정액채취 빈도에 따른 정자의 FCM-SCSA결과와 정액성상 비교

채취빈도 (2개월간)	조사두수	COMPat	SDat	%Red	%PeakR	정액량 (ml)	정액성상		정액생산(병)
							정자농도 ($\times 10^9/ml$)	활력(%)	
≤5	6	5.0±3.0	29.0±10.0	5.7±1.9	64.1±7.3	161.4±30.1	5.32±1.97	80.1±14.6	23.2±6.3
6~7	28	5.7±3.1	34.0±16.1	8.5±4.2	54.8±7.6	210.5±59.6	6.73±1.99	85.7±1.7	33.6±10.0
8~9	37	4.6±2.1	28.8±11.9	7.2±2.0	54.7±8.3	166.8±46.8	5.75±1.93	84.0±6.9	33.9±10.7
≥10	8	4.3±0.9	26.7±8.6	7.5±3.3	49.8±4.6	201.8±55.8	5.66±1.41	85.2±1.4	35.5±11.5

나. SCSA결과와 정액성상과의 관계

FCM-SCSA와 정액 성상간의 비교결과는 표 5와 같으며 SCSA의 결과를 COMPat, SDat, %Red 및 %PeakR의 일정기준을 정하고 조사한 결과에서 COMPat는 4~5에서 정액량과 액상정액 생산량(병)이 가장 많았으며 SDat에서는 20이하에서 정자농도와 액상정액 생산량이 많았다. 한편 %Red에서는 6~7에서 액상정액 생산량이 많은 편이었다. %PeakR에서는 50이하에서 정자농도와 액상정액 생산량이 많았다.

이들간의 상관관계를 보면 표 6과 같다. COMPat는 SDat, %Red와 유의적 상관($r=0.87$ 과 0.62)이 있었고 특히 SDat는 정자농도 및 액상정액 생산(병)과 부(-)의 상관($r=-0.20$, -0.28)이었다. 또한 %PeakR은 정액성상과 모두 부(-)의 상관을 나타내었다.

이상결과에서 SCSA결과가 불량할 경우 정액성상이 저하됨을 알 수 있었다.

표 5. 정자 FCM-SCSA결과와 정액성상간의 관계

기준	조사두수	COMPat	SDat	%Red	%PeakR	정액성상			정액생산(병)
						정액량 (ml)	정자농도 ($\times 10^8/ml$)	활력(%)	
COMPat, <4.0	34	3.0±0.7	21.6±3.7	6.1±2.3	54.5±9.0	178.5±2.02	6.49±2.02	83.9±8.3	33.8±11.3
4~5	22	4.8±0.5	29.0±8.6	7.5±2.1	52.9±6.5	209.3±54.3	5.88±1.63	85.0±2.0	36.5±9.4
6~7	13	6.6±0.6	39.4±5.8	8.2±2.0	58.7±7.6	183.5±54.4	4.85±1.63	84.0±7.3	26.6±7.9
≥8	9	10.4±2.0	54.3±17.5	12.1±4.7	55.7±8.4	155.3±30.1	6.62±2.35	85.2±1.7	30.4±9.0
SDat, <20	19	3.1±0.9	18.2±1.8	6.6±2.0	55.7±9.6	191.3±58.5	6.85±1.75	82.6±10.8	38.2±11.0
21~30	33	4.1±1.3	35.2±2.9	6.7±2.5	53.4±6.8	184.0±52.4	6.23±2.04	85.3±2.1	33.6±10.5
31~40	13	6.0±1.1	37.4±2.9	9.0±2.7	55.0±5.9	207.4±51.0	5.46±1.50	83.5±7.2	33.5±6.9
≥41	14	8.7±2.8	53.0±11.7	9.5±4.7	57.6±10.4	165.8±45.5	5.14±1.96	85.7±1.6	25.0±8.3
%Red, <6	25	3.5±1.2	26.2±7.8	4.8±0.9	54.1±9.4	187.2±51.0	5.66±2.08	84.7±7.3	31.6±10.4
6~7	29	5.0±2.2	30.5±12.6	7.0±0.6	55.4±8.7	191.0±58.8	6.06±2.04	84.2±6.1	33.4±12.6
8~9	13	5.5±1.9	26.7±9.2	8.9±0.5	55.7±6.2	182.2±56.6	6.14±1.83	83.6±7.4	32.6±8.1
≥10	12	7.6±3.4	43.2±19.6	13.4±3.2	55.1±6.3	178.1±43.4	6.78±1.49	85.5±1.7	36.5±6.7
%PeakR, <50	25	5.1±2.6	31.0±13.3	7.6±3.5	46.4±3.5	180.8±56.0	6.76±1.97	85.5±1.7	36.0±9.4
51~60	33	4.9±2.0	29.0±11.4	7.5±3.2	54.7±2.8	195.1±54.8	5.84±1.92	84.0±7.2	33.9±11.0
≥61	21	5.1±3.2	32.0±16.2	7.6±2.8	65.6±4.5	179.4±47.1	5.56±1.81	83.9±7.9	28.7±9.9

표 6. 증모돈 정자의 FCM-SCSA결과와 정액성상간의 상관관계

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. COMat	-	0.87**	0.62**	0.02	-0.15	-0.04	0.08	-0.15
2. SDat		-	0.48**	0.05	-0.12	-0.20*	0.07	-0.28*
3. %Red			-	-0.01	-0.16	0.22*	0.04	0.10
4. % PeakR				-	0.01	-0.20	-0.16	-0.26*
5. 정액량					-	-0.45**	0.20	0.40*
6. 정자농도						-	-0.07	0.57**
7. 활력							-	0.17
8. 정액생산(병)								

* P<0.05, ** P<0.01.

Acridine orange 염색후 형광현미경으로 측정된 SCSA결과와 정액성상과의 관계를 보면 표 7 및 8과 같다. 표 7에서 %Red가 8~25인 경우에 정액의 일반성상과 CASA결과가 좋았고 액상정액 생산량도 많은 경향이 있었다. 표 8에서는 %Red가 정자농도와 $r=0.49$, CASA의 VSL과 정액생산(병)과는 $r=-0.35$, -0.40 으로 모두 유의적 상관성이 있었다.

형광현미경 관찰에 의한 SCSA의 변이가 큰 점을 고려하여 FCM-SCSA의 결과와 비교한 성적은 표 9와 같다. 형광현미경 결과가 $\leq 7\%$ 와 8~15%에서는 이들 둘간에 차이가 FCM-SCSA에 큰 차이가 없었으나 16%이상에서는 FCM-SCSA에서도 높게 나타났음을 알 수 있었다. 이들 두 방법간의 상관을 보면 표 10과 같이 형광현미경법은 특히 FCM-SCSA의 %PeakR과 유의적 상관($r=0.45$)이 있었다. 따라서 형광현미경법이 고가의 FCM기기로 대체되기 위해서는 측정치의 오차를 줄일 수 있을 때 유효성이 기대됨을 알 수 있었다.

표 7. Acridine orange 염색에 의한 형광현미경 SCSA와 정액성상비교

SCSA (%Red)	조사두수	정액량 (ml)	정자농도 ($\times 10^8/ml$)	생존율(%)	CASA				정액생산 (병)
					MOT(%)	VCL($\mu m/sec$)	VSL($\mu m/sec$)	LIN(%)	
<8	5	196.6±60.7	5.73±1.49	67.9±11.0	70.0±9.6	57.8±14.3	25.8±6.5	44.4±10.2	13.7±6.0
8~15	7	213.7±82.6	6.66±1.64	82.2±9.1	68.7±12.0	64.3±16.6	31.0±6.4	49.3±8.2	18.7±8.7
16~25	7	204.9±43.1	6.25±2.59	88.1±8.8	72.0±10.5	60.6±10.3	27.7±7.9	46.7±5.4	20.0±10.0
26~40	5	185.2±51.6	5.13±1.98	86.8±3.3	57.2±16.5	46.2±7.6	21.0±4.8	43.8±6.7	12.6±3.3
≥41	3	238.7±75.5	5.95±0.87	87.9±0.5	54.7±26.7	46.7±14.5	19.7±9.1	40.7±8.4	22.0±4.4

표 8. 형광현미경 SCSA와 정액성상간 상관관계

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. %Red	-	0.01	-0.08	0.49**	0.10	-0.33	-0.35*	-0.40*
2. 정액량		-	-0.32	0.08	0.52*	-0.14	-0.08	0.09
3. 정자농도			-	0.16	0.44*	0.01	-0.01	0.01
4. 정자생존율				-	0.35*	-0.06	-0.10	-0.03
5. 정자활력					-	0.02	0.06	0.03
6. VCL						-	0.60**	0.67**
7. VSL							-	0.83**
8. 정액생산(병)								-

* P<0.05. ** P<0.01.

표 9. 형광현미경 SCSA와 FCM-SCSA결과 비교

현광현미경-SCSA (%Red)	FCM-SCSA				
	총모돈수	COMPat	SDat	%Red	%PeakR
≤7	6	3.5±0.9	31.7±12.3	3.8±1.9	56.3±6.7
8~15	7	3.6±1.7	28.5±14.4	3.3±2.1	56.7±9.9
≥16	4	7.2±3.7	35.4±3.8	6.1±5.5	63.3±18.2

표 10. SCSA방법간 분석결과의 상관관계

	1	2	3	4	5
1. 형광현미경(%Red)	-	0.03	0.45*	0.29	-0.21
2. FCM, %Red		-	-0.47	0.69*	0.30
3. %PeakR			-	-0.34	-0.44
4. COMPat				-	0.68*
5. SDat					-

다. FCM-SCSA와 종모돈의 번식성적

본 실험에서 수태와 분만기록을 가진 종모돈 42두의 번식성적과 FCM-SCSA결과는 표 11과 같으며 여기서 SCSA결과는 다른 보고의 결과들과 유사한 것이었다.

표 12에서 COMPat 3~4인 개체에서 수태율과 산자수가 다소 높았으며 SDat와 %Red에서는 21~40과 5~6인 개체에서 각각 수태율과 산자수가 높은 경향을 보였다. %PeakR에서는 50이하의 개체에서 수태율이 다소 높았다.

표 13에서는 번식성적과 SCSA결과 간에 의미 있는 상관은 나타나지 않았다. 이러한 결과는 이미 AI 종모돈으로 선발된 개체이기 때문에 SCSA가 불량한 개체의 영향이 적었던 점과 또한 수태율과 분만을 및 산자수에 영향하는 요인이 매우 복합적인 것에 기인된 것으로 생각되었다. 또한 더 많은 종모돈의 조사가 필요한 점도 고려할 필요가 있었다.

표 11. 종모돈의 번식성적과 FCM-SCSA결과

품종	조사두수	AI 모돈 수태성적					SCSA			
		빈돈수	산차	수태율(%)	분만율(%)	산자수	COMPat	SDat	%Red	%PeakR
Yorkshire	10	25	3.7±2.1	83.8±13.0	71.3±17.9	10.0±2.0	3.4±1.4	32.4±16.8	3.5±2.6	62.3±6.2
Landrace	14	47	2.5±0.7	79.1±13.7	69.0±13.2	9.9±0.9	2.7±1.7	22.0±10.3	3.5±2.1	54.5±9.8
Duroc	18	9	3.5±1.7	88.3±9.0	76.1±15.4	10.0±0.7	3.7±1.7	28.0±13.2	4.3±2.1	56.0±10.5

표 12. 정자의 FCM-SCSA결과에 기준한 종모돈의 번식성적 비교

SCSA	기준	조사두수	AI모돈 수	산차	수태율(%)	분만율(%)	산자수
COMPat	<3	21	33	3.0±1.8	82.5±14.1	72.6±15.9	9.9±0.9
	3~4	15	21	3.5±1.4	87.2±10.8	72.1±17.7	10.3±0.8
	≥5	7	12	3.3±1.2	82.0±5.8	73.9±4.2	9.5±1.1
SDat	≤20	22	29	2.7±1.7	82.4±14.0	71.1±16.0	9.8±0.8
	21~40	13	28	3.6±1.2	87.2±7.7	76.4±13.3	10.4±0.8
	≥41	8	10	3.9±1.7	83.8±11.7	70.9±16.3	9.6±1.0
%Red	≤4	29	31	3.1±1.6	83.9±13.2	72.0±16.8	9.9±0.8
	5~6	8	13	3.9±1.8	87.0±9.2	78.7±10.1	10.1±0.7
	≥7	6	12	3.3±1.2	81.0±9.2	69.7±9.1	10.0±1.4
%PeakR	≤50	10	24	3.1±1.3	86.3±9.4	75.1±14.3	9.9±0.4
	51~60	16	26	3.0±1.5	81.9±14.0	71.4±12.5	9.8±1.0
	≥61	17	25	3.4±1.9	84.8±11.6	72.4±18.2	10.1±0.9

표 13. 정자의 FCM-SCSA 결과와 수태성적과의 상관관계

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. 산차	-	0.10	0.30*	0.33*	0.18	0.34*	0.07	0.05
2. 수태율(%)		-	0.74**	0.22	0.04	0.16	-0.04	-0.03
3. 분만율(%)			-	0.28	0.01	0.14	0.02	-0.10
4. 산자수				-	-0.10	0.03	0.07	0.16
5. COMPat					-	0.80**	0.63**	0.10
6. SDat						-	0.40**	0.17
7. %Red							-	-0.10
8. %PeakR								-

제 7 절 전업 양돈농가 중심의 최적 인공수정 및 발정동기화기술 개발

1. 서 론

현재 국내 번식가능한 암퇘지 보유두수는 약 95만두('02년 하반기)이며 인공수정 보급율은 50%로 추정되고 있다. '02년도 종돈 도입실적은 3,000여두이며 '03년 도입예정두수는 약 9,000두(종돈개량협회 '96년 추정)에 달하여 종돈개량을 위한 외화낭비와 외국 의존도가 매우 높은 실정이다.

액상정액의 집단 또는 자가처리 및 자가 인공수정과 종축개량을 위한 우수 종모돈의 확보에 따른 경비부담과 기술미흡으로 우수 돼지정액 수요는 급증하고 있는 실정이다.

따라서 축산기술연구소에서는 액상정액 이용에 따른 농가부담을 줄이기 위하여 전업 양돈농장 규모의 최소 농가 작목반 단위별 및 지역양돈조합단위별 공동 정액생산 및 처리기술 이전과 아울러 종돈개량을 위한 고능력 종모돈의 정액을 공급함에 있어 발정 및 배란동기화에 의한 규모화인공수정기술보급을 통하여 고품질 돈육생산에 의한 출하시 경력단가를 제고시켜 양돈농가의 소득증대 및 종돈개량을 동시에 종축시키는 연구가 필요하였다.

2. 재료 및 방법

가. 최적 발정동기화 및 주간 번식관리 유도기술 개발

1) 재료 및 방법

가) 공시축 : 3개 농장사육의 후보돈

나) 대상농가와 모돈 : 3개농장에서 사육중인 후보돈 174두, 경산돈 288두.

다) 정액의 희석 및 보존

채취된 정액은 BTS보존액을 이용하여 정액과 희석액비율을 1:1로 예비희석하고 정액성상을 조사한 다음 1~2시간 17℃까지 냉각시킨 후 최종정자수가 3×10^9 sperm/80ml 되도록 최종 희석하였다. 액상으로 제조된 정액은 17℃에서 보관하였다. 한편 동일 개체에 대한 동결정액을 제조하기 위하여 egg yolk-lactose 용액으로 1차 희석한 후 glycerol이 4% 첨가된 동결보존액에 2차 희석처리하여 최종정자농도를 5×10^9 sperm/5ml(maxi-straw)로 포장하여 축산기술연구소 관행에 따라 예비동결 후 액체질소내에 침적, 동결보존하였다.

또한 1회 주입정자수의 최소화 실험을 위해서 80ml 병당 정자수를 7.5×10^8 , 10.0×10^8 , 12.5×10^8 , 15.0×10^8 , 17.5×10^8 , 20.0×10^8 , 25.0×10^8 및 30.0×10^8 정자농도로 제조하였다. 정액 희석은 필요에 따라 품종내 및 품종간 혼합정액으로 제조하였다.

라) 발정동기화 및 AI 방법

3개 농장에서 사육중인 후보돈을 대상으로 Regumate(progesterone제제)을 14일간 사료에 첨가하거나 Ring-CIDR를 질내 14일동안 장치하여 발정을 동기화시키고 처치 종료후 24시간후에 hCG(300~500IU)를 주사하고 108시간후에 GnRH(300ug/두)를 주사하여 발정 및 배란을 동기화시켰다. 배란동기화(GnRH 주사) 후 26시간때에 1차 인공수정하고 1차수정 후 12시간때에 2차인공수정을 실시하였다. 이유 모돈에 대해서는 이유 후 24시간후에 hCG를 주사하고 80시간후에 GnRH를 주사하여 발정 및 배란을 유도하고 GnRH를 주사 후 24시간때에 1차 인공수정하고 1차수정 후 18시간때에 2차인공수정을 실시하였다. 이유 모돈의 발정을 집약화시키기 위하여 월요일 이유시킨 모돈의 경우에는 Ring-CIDR를 3일간 질내에 장치시키고 제거(목요일 오전)하여 목요일 이유 모돈과 동일한 방법으로 발정 및 배란을 유도하였다. 발정 및 배란 동기화 후 인공수정 요일을 각각 월요일(오후) 및 화요일(오전)이 되도록 동기화시켰다(표 1).

표 1. 돼지의 발정동기화처리방법에 예정시각 인공수정 방법

처리별	Hormone제 처리별
후보돈 1	Ring CIDR(14일) 제거 → 24h 후 PMSG → 56h 후 GnRH → 24h 후 1차 AI + 18h 후 2차 AI
후보돈 2	Ring CIDR(14일) 제거 → 24h 후 hCG → 56h 후 GnRH → 24h 후 1차 AI + 18h 후 2차 AI
경산돈처리 1	이유 → 24h 후 hCG → 52h 후 GnRH → 24h 후 1차 AI → 15h 후 2차 AI
경산돈처리 2	이유+Ring CIDR(3일) → 24h 후 hCG → 52h 후 GnRH → 24h 후 1차 AI + 15h 후 2차 AI

마) 수태지 접근방식이 수태율에 미치는 영향

수태지 접근방법이 번식성적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 후보모돈사 및 이유모돈사의 복도에 1일 1회(아침만), 1일 2회(아침/저녁관리시간시) 및 수태지 냄새용 스프레이(sex odor aerosol)를 1일 2회 살포하여 발정을 관찰하고 수정을 실시하였다.

나. 색도에 의한 액상정액의 간편 품질식별기술 개발

1) 재료 및 방법

가) 정액의 희석 및 보존

채취된 정액은 예비희석하고 정액 성상을 조사한 다음 메틸렌블루(methylene blue)가 첨가된 BTS보존액에 정액과 희석액비율을 1:1로 희석하여 1-2시간 17℃까지 냉각시킨 후 최종정자수가 3×10^9 sperm/80ml 되도록 최종 추가조정 희석하였다. 희석된 정액은 5℃ 및 17℃에서 1, 2, 3 및 5일 동안 보관한 정액의 pH와 메틸렌블루 환원시간 및 페놀레드 색상변화를 조사하였다.

나) 메틸렌블루의 환원시간 및 페놀레드 색상변화 검사

희석 및 보관된 정액을 메틸렌블루 용액 또는 phenol red 용액을 첨가하였다. 메틸렌블루용액은 3.6%구연산나트륨용액 100 ml에 메틸렌블루 50mg을 용해하여 준 비하였다(methylene blue 50mg, sodium citrate 3.6g/100ml 증류수). 페놀레드 용액 (0.05% 수준)은 보존액내 용존산소정도를 측정한 결과 같이 pH 6.0~8.0까지의 색상을 10등급으로 나누어 pH 7.0수준을 표준색상으로 하였으며, pH 변화 상태를 칼라코드화 하였다(그림 1).

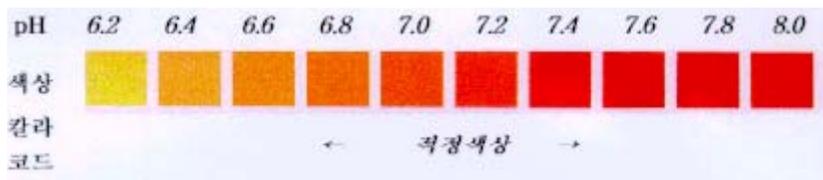


그림 1. pH수준에 따른 돼지 액상정액내 페놀레드 용액의 색상표

정액내의 기본적인 색상처리는 시험관(15 ml)에 정액 0.2ml와 난황구연산희석액 0.8ml, 메틸렌블루 또는 페놀레드용액 0.1 ml를 넣고 혼합시킨 다음 외부 공기중 O₂를 차단하기 위하여 유동파라핀(또는 미네랄오일)으로 시험관의 상층을 약 1cm 두께로 피복한 후 시험관을 45℃의 항온수조(water bath)에 정치시켜 청색이 소멸되는 시간과 색도지시지와 비교하여 환원된 정도를 색도의 index에 따라 점수화하여 측정하였다. 정액내 청색이 3 ~ 6분 이내에 소실되면 양호한 정액, 9분이상 청색이 유지되면 불량한 정액으로 판정하였다. 한편 Chandler 등(2000) 및 Dart 등(1994)의 방법에 따라 methylene blue와 resazurin염색액으로 정자의 활력 및 수정능을 함께 비교 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 최적 발정동기화 및 주간 번식관리 유도기술 개발

1) 보존기간이 정액 성상에 미치는 영향

액상정액 및 동결정액(Maxi straw vs cryogenic vial)을 제조하여 17℃에서 6, 12 및 24시간 보존하여 활력을 평가한 결과는 표 2 같다. 동결정액의 경우 Cryogenicvial 포장정액은 용해 후 24시간 이내에 거의 사멸하였으나 액상정액의 활력은 극히 경미한 수준으로 저하되었다.

표 2. 정액형태별 보존기간이(17℃) 정자의 활력에 미치는 영향

구분	보존기간(시간)에 따른 정자 활력(%)			
	저온 직후 또는 동해직후	6	12	24
액상정액	82.5	78.4	75.5	68.4
동결정액				
- Maxi-strw	55.7	48.3	25.5	10.3
- Cryogenicvial	52.3	45.5	20.4	7.5

2) 동일 종모돈의 액상 및 동결정액이 번식성적에 미치는 영향

동일 종모돈에 대한 액상 및 동결정액의 번식성적을 조사하기 위하여 품종별 종모돈 3두에 대해서 액상 및 동결정액을 생산하여 액상 30두 및 동결 20두씩의 모돈에

인공수정한 결과는 표 2와 같다. 표 2에서 보는 바와 같이 동일 종모돈의 액상 및 동결정액의 분만율은 각각 81.5~87.3% 및 76.6~80.5%로 액상정액의 번식성적이 동결정액의 분만율보다 다소 높게 나타났다.

표 3. 동일 종모돈에 대한 액상 및 동결정액의 번식성적

종모돈명	액상				동결			
	수정 두수	Non-return (%)	분만율 (%)	평균 산자수	수정 두수	Non-return (%)	분만율 (%)	평균 산자수
L 36-4	30	91.5	86.8	10.9	20	82.6	78.8	9.3
Y 10-2	30	91.8	87.3	10.2	20	86.8	80.5	9.6
D 24-4	30	87.2	81.5	9.5	20	87.2	76.6	8.9

3) 종부형태(자연종부, AI)에 따른 수태율

종부형태에 따른 수태율은 표 4와 같이 미경산돈의 경우에는 AI 2회가 85.4%, 자연종부 2회가 72.9% 및 1차 자연종부 + 2차 인공수정(NS + AI) 형태가 83.4%로 나타났다으며, 경산돈의 경우에는 AI(2회)의 경우에서 86.2%로 다소 높은 수태율을 보였다.

표 4. 종부형태가 돼지의 수태율에 미치는 영향

구분	종부형태에 따른 수태율(%)								
	AI(2회)			NS(2회)			NS + AI		
	처리 두수	수태 두수	수태율	처리 두수	수태 두수	수태율	처리 두수	수태 두수	수태율
미경산돈 (174두)	89	76	85.4	48	35	72.9	37	31	83.7
경산돈 (288두)	138	119	86.2	63	52	82.5	87	73	83.9

* AI : artificial insemination, NS : natural service.

4) 농장별 발정동기화처리 후 시간별 발정발현 양상

3개의 농장에서 발정동기화 처리를 위하여 각 20두씩을 이유 후 24h 때에 hCG를 주사하고 52h 후에 GnRH를 주사하여 발정발현 시간을 조사한 결과는 표 5와 같이 나타났다.

표 5. 농장별 발정동기화처리(GnRH 주사) 후 시간별 발정발현 양상

농장명	처리두수	발정개시 시간(h)			
		12시간 이내	12~24	24~36	36시간 이상
A	20	2	8	7	3
B	20	2	9	5	4
C	20	1	5	9	5
계(%)	60	5	22	21	12

5) 액상정액의 정액 형태가 번식성적에 미치는 영향

액상정액을 품종내 동일비율(정자수 기준 1:1 혼합) 혼합정액(순종내 정자 활력을 90, 80 및 70%으로 구분하여 6등급으로 적용) 및 품종간 혼합정액형태로 제조하여 처리구에 따라 인공수정하여 번식성적을 조사한 결과는 표 6과 같았다.

표 6. 품종내 및 품종간 정액형태가 번식성적에 미치는 영향

정액형태	등급	수정두수	번식성적		
			수태율(%)	분만율(%)	산자수(출생직후)
품종내 혼합정액*	1	48	91.2	83.2	10.9
	2	48	92.3	87.8	10.5
	3	48	89.3	87.2	10.9
	4	48	89.6	84.4	11.3
	5	48	84.3	89.5	9.4
	6	48	86.3	80.3	8.7
품종간 혼합정액*	1	50	92.6	88.4	10.7
	2	50	84.3	78.5	8.4

* 개체간 유효정자수를 동일하게 희석(1:1)

활력이 높은 1등급의 동일 품종간 혼합정액의 분만율은 83.2%로 활력이 다소 낮은 5등급의 품종간 혼합정액의 분만율은 89.5%로 가장 높게 나타났다. 그러나 산자수는 1등급의 활력이 높은 품종간 혼합정액이 10.9두로 나타났다.

6) 인공수정 요일이 번식성적에 미치는 영향

경산돈의 이유 후 인공수정요일에 따른 번식성적을 조사한 결과는 표 5와 같이 화요일 인공수정(1차 수정)의 경우 수태율이 95.2%, 분만율이 92.3%로 가장 높은 번식성적을 나타내었다.

표 7. 인공수정 요일이 번식성적에 미치는 영향

요일	공시두수	번식성적		
		수태율(%)	분만율(%)	산자수
월요일	45	87.4	82.6	9.5
화요일	30	95.2	92.3	11.2
수요일	25	89.8	83.7	10.4
목요일	25	87.6	85.1	9.2

* 인공수정요일 : 발정 확인(등누름) 24시간때에 1차 수정 및 6-12시간 후 2차 인공수정

일반적으로 화요일 인공수정을 위해서는 목요일 이유가 번식생리상 가장 널리 이용되는 방법이기 때문인 것으로 사료된다. 이는 이유 후 발정개시로 부터 다소 늦게 수정시키는 것이 수태율과 분만율에 유리한 것으로 나타났다.

7) 성선자극호르몬(hCG, GnRH)투여에 의한 발정 및 배란유기방법에 따른 번식성적
 발정동기화처리시 성선자극호르몬으로 hCG 및 PMSG를 각각 투여하였을 때 수태율은 표 8에서 나타난 바와 같이 후보돈의 경우에는 89.1% 및 88.0%를 나타내었으며, 경산돈의 경우에는 이유시 황체호르몬(Ring-CIDR)를 투여한 경산돈 처리 1구가 90.9%, 처리 2구가 93.3%의 수태율을 나타내었다. 분만율은 각각 86.7%, 82.6%, 88.6% 및 91.1%를 나타내었다. 그러므로 예정시각 인공수정의 경우 후보돈보다 경산돈이 높은 번식성적을 나타내었으며 경산돈 처리2의 경우가 가장 높은 분만율을 나타내어 성선자극호르몬으로 PMSG보다 hCG가 다소 유리한 결과를 가져다 주었다.

표 8. 성선자극호르몬(hCG, PMSG) 투여간의 번식성적

처리별	수정두수 (A)	임신두수 (B)	분만복수 (C)	수태율 (B/A)	분만율 (C/A)	평균산자수
후보돈 Regumate	46	41	39	89.1	86.7	9.6
후보돈 Ring-CIDR	25	22	21	88.0	84.0	10.4
경산돈 Regamate	44	40	39	90.9	88.6	11.2
경산돈 Ring-CIDR	45	42	41	93.3	91.1	11.3

8) 주입정자 농도가 번식성적에 미치는 영향

돼지 인공수정시 1회 주입하는 정자농도를 활력이 70%이상인 정자수를 기준하여 30.0, 25.0, 20.0, 17.5, 15.0, 12.5, 10.0 및 $7.5 \times 10^8 / 80\text{ml}$ 로 각각 조절하여 2회 인공수정 하고 분만율 및 산자수를 조사한 같이 분만율은 72.3% ~ 89.3%로 농도별로 통계적인 유의차는 인정되지 않았으며, 총산자수는 $30.0 \times 10^8 / 80\text{ml}$, 25.0, 20.0 농도시 11.29, 11.02 및 11.27두로 차이가 없다.

표 9. 정액병(dose)당 정자농도가 분만율과 산자수에 미치는 영향

No. of motile sperm ($\times 10^8 / 80\text{ml}$)	No. of sow, head	Farrowing rate, %	Litter size (total born), head
30.0	47	72.3	11.29 \pm 2.84 ^a
25.0	47	87.2	11.02 \pm 2.91 ^a
20.0	44	84.0	11.27 \pm 2.79 ^a
17.5	47	82.9	9.38 \pm 2.49 ^c
15.0	44	84.0	10.91 \pm 2.89 ^{ab}
12.5	47	87.2	9.65 \pm 2.80 ^{bc}
10.0	47	89.3	10.57 \pm 2.47 ^{abc}
7.5	47	76.5	10.83 \pm 3.41 ^{ab}

^{a,b,c} Values with different superscripts in same column were significantly different($P < 0.05$)

나. 색도에 의한 액상정액의 간편 품질식별기술 개발

1) 정액보관온도 및 기간에 따른 메틸렌블루 환원시간 및 pH수준

액상정액을 17°C 및 5°C에서 7일까지 보존하였을 때 메틸렌블루 환원시간과 pH변화는 표 5와 같다. 표 10에 나타난 바와 같이 보존기간이 길어질 수록 pH가 알칼리성으로 변화하였으며 메틸렌블루 환원시간은 길어지는 경향이 뚜렷하였다. 제조당일 보관된 정액의 메틸렌블루 환원시간은 17°C 및 5°C에서 각각 2.4±0.9분 및 2.6±1.2분으로 차이가 없었으나 7일째에는 17°C에 보관한 정액의 pH가 평균 0.2수준 높게 나타났으며, 정액보관온도에 따른 pH 변화는 17°C에서 보다 5°C에서 적게 나타남으로써 정액보관에 다소 유리함을 보여 주었다. 한편 페놀레드 용액(0.05% 수준)에 대한 pH 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 및 7.6까지의 색상을 각각 표준코드화(각각 #FCC8AB, FBBD9F, #F9A97F, #F7956B, #F58356, #F37043, #15A22 및 #E77E7A)하여 지수화(2~8)하였을 때 1일 때 17°C에서 시간은 2.4±0.9과 pH 6.9±0.6, 5°C때 2.6±1.2, 6.9±0.7였으며, 7일째에는 8.5±1.8, 7.7±0.9과 3.5±1.6, 7.5±0.7으로 나타났다.

표 10. 정액보관 온도 및 기간에 따른 메틸렌블루 환원시간과 pH

보관기간에 따른 메틸렌환원시간 및 pH (mean ±SD)						
보관온도	1일		3일		7일	
	시간(분)	pH	시간(분)	pH	시간(분)	pH
17°C	2.4±0.9	6.9±0.6	3.5±1.2	7.4±0.7	8.5±1.8	7.7±0.9
5°C	2.6±1.2	6.9±0.7	2.8±1.5	7.1±0.8	3.5±1.6	7.5±0.7

2) 정액주입직전 pH 수준에 따른 수태성적

돼지 액상정액의 품질을 간편하게 육안적으로 식별하기 위한 방법을 개발하기 위하여 채취된 정액을 페놀레드(0.5%)가 첨가된 BTS보존액에 정액과 희석액비율을 1:1로 희석하여 1-2시간 17°C까지 냉각시킨 후 최종정자수가 3×10^9 sperm/80ml 되도록 최종 추가조정 희석한 후 17°C에서 1, 3 및 5일 동안 보관한 정액의 활력과 페놀레드용액(0.05% 수준)에 대한 pH 6.2 ~ 7.6까지의 색상을 지수화 하였을 때 액상정액이 5일까지 보관 되었을 경우 수태율은 85.3%, 분만율은 72.8% 였다. 이때 페놀

레드용액의 색상지수는 적정범위에 수치를 나타내었다.

표 11. 정액주입 직전 pH에 따른 수태성적

보존기간 (일)	시험회수	정액성상		번식성적	
		활력(%)	평균 산도(pH)	수태율	분만율
1	25	71.9	6.89	92.5	84.3
3	20	59.8	6.84	92.7	79.6
5	15	53.9	7.06	85.3	72.8

표 11에서와 같이 돼지 액상정액을 17℃에서 1, 3 및 5일 동안 각각 보관하였을 때 정자 활력은 71.9%, 59.8% 및 53.9%였으며, 이 때 pH는 각각 6.89, 6.84 및 7.06으로 페놀레드용액에 의한 표준코드의 적정범위내 색상을 나타내었다. 이와 같은 결과는 BTS에 희석된 돼지 액상정액이 5일까지 이용 가능함을 제시하여 주었다. 뿐만 아니라 육안적으로도 적정 수준의 색상을 나타내어 간편하게 정액의 품질을 식별할 수 있음을 제시하여 주었다.

3) 시종종모우 접근방식은 1일 1회(아침), 1일 2회(아침/저녁) 및 Sex odor spray(1일2회) 각각 실시하였는데 1일 2회(아침/저녁)방법이 발정발현은95%를 나타냈고, 수태율은 94%로 제일 좋았다.

표 13. 시정종모우 접근방식에 따른 발정발현 및 수태율

시정종모우 접근방식	공시두수	발정발현두수	수정두수(율)
1일 1회(아침)	20	16	13 (81.2%)
1일 2회(아침/저녁)	20	19	18 (94.7%)
Sex odor spray(1일2회)	20	14	9 (64.2%)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

○ 정액품질 평가 및 향상기술, CASA와 번식성적 상관 연구

1. 목표달성도

구 분	평가의 착안점	달성도
1차년도 (2000)	○ 현장중심 정액품질 평가법의 정확성 및 간편화 정도	100
	○ 세균부재 정액 생산 기술의 합리성과 결과	100
	○ 정자염색질구조 특성조사의 조사대상 선정과 결과	100
2차년도 (2001)	○ 세균부재 정액생산, 항생제 첨가에 대한 처리효과	100
	○ 고품질 동결정액 생산을 위한 동결방법과 첨가물의 효과	100
	○ 정액의 수정능 및 수태율 체외 예측 평가기술의 결과와 타당성	90
	○ 정자염색질구조 특성과 정액생산 및 성상과의 관련정도	100
3차년도 (2002)	○ 동결정액 제조기술의 성과	100
	○ 종모돈 정액의 수태율 간접(예측) 평가와 종모돈 분만성적과의 상관정도	100

2. 관련분야 기여도

1) 정액생산과 관련된 번식능력저하 종모돈의 조기 발견으로 후대검정기간 단축 및 종모돈 생산과 유지비용의 절감효과에 기여.

2) 정액생산능력을 저하시키는 요인을 최소화할 수 있는 사양기술의 개발에 기여.

3) 양돈농가의 인공수정기술 확대보급으로 수태율 및 산자수 증가에 기여.

4) 동결정액의 인공수정 보급을 증대에 기여.

5) 종모돈 개량을 위한 양돈농가의 기술적 접근방법에 기여.

6) 정액의 검사기술로 농가에서 정액품질 평가 가능성 부여.

7) 종모돈의 번식장해의 조기에방에 기여.

- 8) 액상정액의 품질향상과 생산비 절감에 기여.
- 9) 번식효율 증대로 농가소득 향상에 기여.
- 10) 돼지 인공수정의 확대보급으로 종축개량이 촉진되고 돈육생산비 절감 및 양돈업의 국제 경쟁력이 강화에 기여.
- 11) 양돈산업 소득증대로 국내 양돈산업의 안정화에 기여.
- 12) AI에서 항생제 남용을 줄이는데 기여.
- 13) 관련 학회 학술대회에서 연구결과 발표(발표 실적 : 별첨)

별첨 : 연구결과의 학술대회 발표 실적

1. 이을순, 김창근, 정영채, 김일, 류재원, 연승은, 홍종훈, 윤희진, 강권, 김인철, 이장희, 이종완, 정영호. 종모돈의 정자기능과 채외수정을 및 수태율간의 관계에 대한 연구. 한국가축번식학회 춘계학술발표대회 초록 p. 10(2001. 6. 15).
2. Kim, C.K., I. Kim, J.H. Lee, S.E. Yeon, E.S. Lee and H.J. Hong. Changes in acrosin activity and membrane function of boar spermatozoa. 한국가축번식학회 춘계학술대회 초록 p. 86(2001. 6. 15).
3. 홍종훈, 김창근, 정영채, 김일, 류재원, 손동수, 김인철, 이장희, 윤희진, 강권. AI 종모돈 정액내 세균감염정도와 항생제 감수성에 관한 연구. 한국가축번식학회 춘계학술발표대회 초록 p. 32(2002. 6. 4).
4. Kim, I., C.K. Kim, Y.C. Chung, J.W. Ryu, J.H. Hong, D.S. Son, I.C. Kim, J.H. Lee, H.J. Yeon, K. Kang, J.W. Lee and Y.H. Chung. Study on hypoosmotic sperm swelling test and its relationship with other methods in liquid boar semen. 한국동물자원과학회 학술대회 초록 p. 185(2002. 6. 26~28).
5. Kim, C.K., Kim, Y.C. Chung, I. Kim, J.W. Ryu, J.H. Hong, D.S. Son, I.C. Kim, J.H. Lee, H.J. Yeon and K. Kang. Aerobic bacteria and antibiotic treatment in boar semen. 12th Federation of Asian Veterinary Association Congress. P207(2002. 8. 26~28, Malaysia).
6. Kim, C.K., Y.C. Chung, I. Kim, J.W. Lee, H.J. Yeon, K. Kang. I.C. Kim and J.H. Lee. Acrosin activity of boar semen in relation to semen quality and in vitro fertilization Xth Int'l Congr. AAAP. KOK-036 pp. 45~46(2002. 9. 23~27, India).
7. Hong, J.H., J.W. Ryu, I. Kim, Y.M. Chang, S.H. Hwang, J.H. Lee, H.J. Yeon, K. Kang. C.K. Kim and Y.C. Chung. A study on freezing of boar semen using trehalose and EDTA and level of reactive oxygen speuies in frozen semen. 한국동물자원과학회 학술발표회 Proc. Vol. II. 95(2003. 6. 26~28).
8. Hwang, S.H., J.W. Ryu, I. Kim, J.H. Hong. J.H. Lee, H.J. Jeon, K. Kang, Y.J. Mork, C.K. Kim and Y.C. Chung. A study on characteristic and functional changes in spermatozoa during storage of liquid boar semen. 한국동물자원과학회 학술발표회 Proc. Vol II. 95(2003. 6. 26~28).

○ 최적 인공수정 및 발정동기화기술 개발

1. 목표의 달성도

구 분	연구개발 내용 및 범위	목표의 달성도
1차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 발정동기화기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 발정동기화 방법간의 발정발현 양상 비교 - 발정동기화에 따른 번식성적 ○ 최적 인공수정기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 종부형태(NS/AI/AI+NS)가 종빈돈의 번식성적에 미치는 영향 - 액상정액 1회 주입정자수의 최소화 ○ 색도에 의한 액상정액의 간편 품질식별 기술 <ul style="list-style-type: none"> - 정액의 성상과 보존시간별 정액의 색상 및 pH 변화 	연구개발내용에 맞게 달성함
2차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 인공수정기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 동일 종모돈에 대한 액상 및 동결정액의 번식성적 조사 - 정액의 형태(순종, 품종내 혼합 및 품종간 혼합정액)에 따른 번식성적 조사 ○ 색도에 의한 액상정액 품질식별 및 지시표 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 정액의 성상(pH 및 색상지시도)에 따른 수태성적 비교 	연구개발내용보다 초과하여 달성함
3차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 발정동기화 및 주간 번식관리 유도기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 발정동기화 처리후 특정요일 인공수정이 수태율 및 분만율에 미치는 영향 - 예정시각 인공수정전 teaser 접근 방식이 분만율에 미치는 영향 ○ 색도에 의한 액상정액 품질 식별기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 정액품질 간편 식별기구 개발(실용화) - 육안적 품질 등급에 따른 수태율 비교 	연구개발내용보다 초과하여 달성함

2. 관련분야 기여도

시책건의 : 4건

년도	제 목	건의부처
2000	돼지 AI센터 사후관리제도	농림부
2001	우수 돼지AI센터 인증제 실시	농림부
2001	가축인공수정사 자격시험 실기과목시험 평가방법 개선	농림부
2002	축산신기술보급사업 교육인원 및 횟수 변경(예정, 요청 함)	농림부
계	4 건	

영농활용 : 2건

년도	제 목	수록 자료명
2000	돼지 번식향상을 위한 발정동기화 방법	
2002	돼지 예정시각 인공수정 방법	
계	2 건	

□ 논문 : 6편

년 도	제 목	게재 학회지
2001	Effect of ferrous sulfate and ascorbic acid on in vitro fertility and sperm lipid peroxidation in the pig.	한국가축번식학회지 25 : 317-325.
2002	돼지 액상정액의 보존액, 보존온도 및 기간이 정액성과 번식성적에 미치는 영향.	한국가축번식학회지 26:9-16.
2002	돼지에서 동결정액을 이용한 인공수정시 종모돈의 품종, 인공수정 횟수, 정자농도, 농장 및 연도가 번식성적에 미치는 영향.	한국가축번식학회지 26:111-117.
2002	동결정액 포장방법이 돼지정액의 성상 및 번식성적에 미치는 영향.	한국가축번식학회지 26:119-124.
2002	Xanthine-xanthine oxidase system하에서 돼지 동결용해 정자의 lipid peroxidation과 체외수정능력에 대한 B-mercaptoethanol의 영향	한국가축번식학회지 26(3):263-274.
2003	Current status and utility of animal genetic resources.	Proceedings of the international workshop on cryopreservation of bio-genetic resources
계	6편	

□ 논문발표 : 13편

년월일	제 목	주관기관 (게재지)
2001	종모돈의 정자기능과 체외수정을 및 수태율간의 관계에 대한 연구	한국가축번식학회 춘계 학술발표대회. pp. 10.
2001	동결정액의 포장방법이 정액성상과 번식성적에 미치는 영향	한국가축번식학회 춘계 학술발표대회. pp. 77.
2001	발정동기화방법이 경산돈의 번식성적에 미치는 영향	한국가축번식학회 춘계 학술발표대회. pp. 83.
2001	Changes in acrosin activity and membrane function of boar spermatozoa. 2001.	한국가축번식학회 춘계 학술발표대회. pp. 86.
2001	The role of fertilization-promoting peptide on acrosome reaction and glycosidase activity in vitro of frozen-thawed spermatozoa in pig	Biology of Reproduction 64. Supplement 1. p. 250.
2001	Effect of catalase on in vitro fertility of frozen-thawed sperm in medium with xanthine and/or xanthine oxidase in pig	Biology of Reproduction 64. Supplement 1. p. 302.
2002	AI 종모돈 정액내 세균감염 정도와 항생제 감수성에 관한 연구	한국가축번식학회 춘계 학술발표대회지. P. 32.
2002	색도에 의한 돼지 액상정액의 품질 간편식별 기술 개발	한국가축번식학회 춘계 학술발표대회지. P. 30.
2002	중부형태가 돼지의 번식성적에 미치는 영향	한국가축번식학회 춘계 학술발표대회지. P. 28.
2002	돼지 인공수정시 1회 주입 정자농도가 번식성적에 미치는 영향	한국가축번식학회 춘계 학술발표대회지. P. 27.
2003	돼지 인공수정시 동일 종모돈에 대한 액상 및 동결 정액간의 번식성적 비교.	한국동물자원과학회 학술발표집 p.92
2003	돼지 정자의 체외수정능 획득시 plasminogen activator의 생산에 관한 연구.	한국동물자원과학회 학술발표집 p.92
2003	돼지 정자의 체외수정능 획득시 plasminogen activator의 생산에 관한 연구.	한국동물자원과학회 학술발표집 p.100

□ 단행본 및 영농교본 등 저서 : 9권

년 도	제 목	페이지
2000	돼지인공수정 - 돼지인공수정의 개발방향과 수태율향상 방안	P. 125-138.
2000	수정란의 위생적인 처리, 검사 및 특수가축의 수정란 이식 기술	P. 49-63
2001	돼지인공수정 - 돼지정액검사 및 품질개선	P. 125-138.
2001	Training on artificial insemination and embryo transfer in livestock (KOICA, RDA, 외국인 기술교재)	P. 203-246
2002	돼지인공수정 - 번식생리 및 생식기 해부, 정자의 생리 보존액 및 정액제조 요령	P. 21-32. P. 116-126. P. 196-210.
2002	Artificial insemination and embryo transfer in livestock.	P. 131-157
2002	가축인공수정사보수교육교재(농림부) 돼지 체세포복제수정란이식 및 인공수정	P. 235-266
2002	축산연구50년사	편집위원
2003	돼지인공수정 - 번식생리 및 생식기 해부, 정자의 생리 보존액 및 정액제조 요령	P. 21-32. P. 116-126. P. 196-210.
계	9 권	

□ 유관기관 및 대농민 기술지원 등(문서에 근거 함)

년 도	제 목
2002	2002년도 가축인공수정사자자격시험 실기시험위원 - 경기지방산업인력관리공단 (2002.11.2.)
	한국농업전문학교 2002학년도 2학기 외부견학 실습 - 돼지인공수정 실습교육 지원 : 2002. 11. 1.
	경남첨단양돈연구소 돼지인공수정기술 지원(정액채취 및 검사 지원 : 2002.11.13~11.16.(4일간)
	경남첨단양돈연구소 돼지인공수정 실습교육 지원 : 2002. 9. 2 ~9. 11.(10일간)
	새해영농설계교육 - 인공수정을 통한 규격돈 생산 기술(홍천군농업기술센터) - 2002. 1. 3.
	대구축협 배합사료공장 - 한우번식우 인공수정세미나(2002. 9. 6) - 한우 인공수정 및 사양관리(2시간)
	돼지 인공수정 교육(돼지인공수정 개요, 번식생리 및 생식기해부, 정자생리, 정액제조 요령) - 7회
	2002 양돈분야 새해영농설계교육(2002.1.9):홍천군 농업기술센터
	Artificial insemination and embryo transfer in livestock. Artificial insemination of Pig. KOICA, RDA. 외국인기술교육. 2002년 9월 2일~3일
	돼지 AI센터 정액보상을 위한 평가위원(용인시) - 용인AI센터 구제역 피해 보상 심의(2002. 8. 19)
	돼지 AI센터 정액보상을 위한 평가위원(안성시) - 다비AI센터 구제역 피해 보상 심의(2002. 9. 14)
	연구용 돼지정액분양(단국대 생명자원과학대 석호봉교수) - 연구용 돼지정액 100straws 공급 지원(2002. 5. 30)
	돼지정액분양(경상대 부속 농업생명과학연구원) - 연구용 돼지 동결정액 200straws 공급 지원(2002. 5. 10.)
우수 종모돈 정액공급(제주농업시험장) - 돼지 우수 계통 조성 사업 지원 : 액상정액 107팩 지원(2002. 3. 20.)	
소계	13 건

년 도	제 목
2001	돼지 인공수정 교육 : 각 10회
	- 돼지 정액 검사 및 품질 개선, 실험기기조작 및 생식기 해부
	ASEAN 가축인공수정과 수정란이식 기술훈련 외국인 강의 - 2001. 3.22 ~ 4. 18. (4. 2)
	한국농업전문학교 강의 : 돼지 인공수정의 현장 이용(2시간) - 2001. 10. 30
	강원대학교 농촌사회교육원 특강 : 돼지 인공수정 - 농업최고경영자과정 (2001. 4. 21)
	2001년도 가축인공수정사자격시험 실기시험위원 - 경기도지사(2001.10.24)
	돼지인공수정센터 운영 관련 교육협조(경기도가축위생연구소) - 2001.9.18~10.19
	2001 새해영농설계교육 - 돼지 인공수정(홍성군농업기술센터) - 2001. 1. 3.
	국가기술자격검정시험문제 검토(가축번식생리학) - 한국산업인력관리공단(2001. 5. 7)
	돼지인공수정기술지원 - 충남 농업기술원(2001. 3. 6)
2000	돼지 인공수정 교육 : 각 10회
	- 돼지 정액 검사 및 품질 개선, 실험기기조작 및 생식기 해부
	돼지정액분양 : 경상대 축산진흥연구소 - 연구용 돼지 동결정액 200straws 공급 지원(2000. 9. 2.) 처리
	돼지정액분양(충남대수의과대학):연구용 돼지정액 50두분량 공급지원 (2000.11.10)
	금산군농업기술센터(양돈농업인연구회 교육: 돼지인공수정 실무) - 2000.3. 31.
계	15 건

□ 연도별 폐지정액 공급실적

(2000 ~ 2003. 11월 현재)

년 도	액상정액	동결정액	공급기관
2000	20,380	130	(23개 농가)
2001	10,229	14	(7개 농가)
2002	8,917	1,000	(11개 농가)
2003	9,583	960	(11개 농가)
계	49,109	2,104	

□ 연도별 폐지인공수정 교육 인원

년 도	교육 인원			계
	공무원	농 민	AI센터 종사자	
2000	6	98	-	104
2001	5	87	21	113
2002	5	86	18	109
2002	9	79	15	103
계	25	350	54	429

농촌진흥청 축산기술연구소 개발

Ring-CIDR



Ring-CIDR을 이용한 돼지 예정시각 규모화 인공수정 순서

주간	일과종 시간	Sows(경산돈)	Gilt(미경산돈)
일	오후	③ 16:00시 GrRH(300ug)투여 (농은 산책할수록 적은 양 투여)	③ 15:00시 GrRH(위타갈 3m)
월	오전	①-1(처리 1) : 모돈 이유 - 돈군이동 Ring-CIDR 삽입 (08:00)	
	오후	④ 16:00시 1차 인공수정	④ 17:00시 1차 인공수정
화	오전	⑤ 10:00시 2차 인공수정 (113일 후 밀알 분반유도처리)	⑤ 08:00시 2차 인공수정 (113일 후 밀알 분반유도)
수	오전	• 폐주(각주) 또는 월간으로 실시	① Ring-CIDR(또는 Requamate)* 처리개시일 또는 최종일(오전출산)
목	오전	①-2(처리 1) : Ring-CIDR 제거(08:00) ① 처리2 : 모돈 이유 - 돈군이동	② 07:00시 hCG(300~500 IU) 투여
금	오전	② 08:00시 hCG(300~500 IU)투여	

* 참고 : 인공수정이 실패하여 재발 조치가 필요한 경우 원상환 후로도 인공수정 속근에 삽입하여 재처리(1일 당 1000 Units)하는 등 1000 Units/300mg/40~50g 이하

* 삽입은 Ring-CIDR을 판매할 때 허가사 (Biomatix) 급여

처리순서

경 산 돈 ①-1 08:00(월) ①-2 08:00(목) ② 08:00(금) ③ 16:00(일)

 ④ 16:00 1차(월) ⑤ 10:00 2차(화)

 ① 08:00(목) ② 08:00(금) ③ 15:00(일) ④ 1차시 (월) ⑤ 2차시 (화)

미경산돈 ① 08:00(수) ② 07:00(목) ③ 15:00(일) ④ 1차시(월) ⑤ 2차시(화)





* 기술개발 : 축산기술연구소 * 연구지원 : 농촌진흥청 * 협력기업 : 좋은유전자
National Livestock Research Institute
<http://agis.nlri.go.kr>

Ring-CIDR 처리로 번식비용 절감과 고품질 규격돈 생산을!!!



(Ring-CIDR 및 주입기)



(생식기도내, 위치 I)



(생식기도내, 위치 II)



(주입장면)

신개발품(Ring-CIDR : 출원번호: 20-2002-14961)

(개발자 : 축산기술연구소 농학박사 이장희, 문의 : 041-580-3337)

Ring-CIDR란? 체내 약물방출형(Ring type controlled internal drug releaser)으로 황내 progesterone 방출장치임 (실용신안 출원번호 : 20-2002-14961).

Ring-CIDR 질내 삽입요령

1. 외음부를 소독하고 깨끗이 닦는다.
2. Ring-CIDR 주입기를 5% 클로리덱솔에 담가 소독시킨다.
3. Ring-CIDR외부와 주입기 내부에 윤활제를 바른다.
4. Ring-CIDR의 태그(태그표형상시 처리내용 기록)에 수반순잡에 쪽에 위치번호 1이 주입기내부에 종전시킨다.
5. 주입기의 외부에 윤활제를 바른 후 외음부를 약간 벌려 주입기를 삽입시킨다.
6. 주입기를 천천히 저 선단이 경관입구에 도달되었는지 확인한다.
7. 주입기 내부의 주입동으로 Ring-CIDR를 밀면서 주입기는 외음을 수직시키면서 Ring-CIDR를 경관입구에 위치시킨다.
8. Ring-CIDR 후반부가 반드시 처녀(처녀부 안쪽)에 위치하는지 확인하고 태그가 동쪽으로 노출되지 않도록 한다.
9. 장치삽입에 따른 거부감을 제거하고 Ring-CIDR가 체치리에 위치하도록 외음부를 약간 폐쇄시킨다.
10. Ring-CIDR삽입 12시간내에 할락여부를 반드시 확인하고 불특시에는 다시 Ring-CIDR를 질내에 삽입시킨다. 처리내용과 개차번호, Ring-CIDR 제거일 등을 반드시 기록해 둔다.
11. 경산후는 처리 3일 후, 비경산후(후브르)는 처리 후 14일째에 각각 Ring-CIDR를 제거한다.
12. 배란동기화를 유도하고 예정시각 인공수정을 위하여 정란 도구는 같이 주기적으로 으르문을 처리한다.

일괄수태기술의 농장내 도입은 노동투입시간을 1/3이상 단축시키고 생산성을 10% 이상 향상시킵니다!!



National Livestock Research Institute

<http://agis.nlri.go.kr>

제 5장 연구개발결과의 활용계획

○ 정액품질의 평가 및 향상기술, SCISA와 번식성적 상관연구

1. 민간 돼지인공수정센터에서 돼지 액상정액의 보존성이 높은 정액생산이 가능하도록 기술 지도.
2. 종돈 수입 억제 및 수입기준 시책 건의.
3. 민간 AI 센터에서 고품질 정액 공급 유도에 활용
4. 국가기관(축산기술연구소 등) 보유 돈군의 핵돈화로 국내 전체의 종돈개량 촉진 유도에 활용
5. 정부 시책건의 등을 통해 농업기술센터, 협동조합, 개량조직 단체에 기술 보급 연구 결과로 검증된 특정 연구 항목은 농가 지도 및 기술자 교육으로 활용
6. 정부관련 부처(농림부 등)에 시책 건의.
7. 정부, 민간 AI센터에 기술지도 및 기술 전수.
8. 기술 실용화를 위하여 양돈농가 현장 기술지도, 기술 보급.
9. 교육기관에 교육자료 제공 및 고급 전문인력 양성에 활용.
10. 학술교류와 연구계획지침 제공.
11. 전문잡지에 기고와 기술의 산업화 유도.

○ 최적인공수정 및 발정동기화기술 개발

- 시책건의 : 1건
- 영농활용 : 2건
- 학술발표 : 5건

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술의 정보

1. 정액의 품질관리

AI 센터를 중심으로 사용될 수 있는 자동정액분석기(CASA와 flow cytometry)가 개발 활용되면서부터 정액처리과정과 정액품질관리가 보다 신속 간편하고 정확하게 수행되고 있다. 특히 최근 정자의 구조와 기능을 보다 정확히 평가할 수 있는 방법들이 개발되고 있다. 그 중의 일부는 이미 상품화된 kit들도 있다. 정자의 두부와 세포막 손상 또는 생존성 검사 방법으로서 종전의 염색방법이 아닌 형광염색방법이 연구되고 있다. 특히 최근 돼지정자의 경우 acrosin 활성, hypoosmotic swelling test도 매우 유용한 방법으로 제시되고 있다. 정자염색질구조의 이질성 검사는 종모축의 번식력저하 원인, 수태율 예측, 정액품질관리의 지표로서 이용될 수 있는 것으로 보고되었다. 돼지정액에 오염될 수 있는 세균은 약 13종 이상이 되며 그중 E. coli를 포함한 약 5종류의 장내 세균은 액상보존시 정자생존성 저하와 침체이상율을 높이는 것으로 나타나 있다. 항생제 첨가도 최근에는 새로운 항생제조합에 관한 연구가 진행중이다

2. 돼지 액상 및 동결정액 연구

시판되는 액상정액 희석액은 여러 종류가 있으며 15~20℃의 보존이 주축을 이루고 있다. 돼지 인공수정의 번식성적을 보면 일본의 경우 동결정액이 액상정액에 비해 10% 정도 수태율이 낮으며 산자수도 복당 1~2두 낮기 때문에 동결정액 보급이 저조한 실정이다.

액상정액에 관한 연구로 Waberski 등(1994)은 액상정액으로 수정한 결과 보존시간에 따라 평균 임신율이 40.5~89.5%로 차이가 있다고 보고하였으며, Korniewicz

동결정액의 산업화가 늦어지는 이유는 액상정액보다 수태율이 낮으며 동결융해과정 중 정액질의 저하 때문이다. 동결과정에서 동해방지제 농도, 희석제 조성분, 동결속도 및 융해조건, 포장방법 등에 관한 효과는 더욱 많은 연구가 필요한 부분이다. 희석액에 첨가성분으로는 당류와 단백질이 이용되나 특히 인지질 단백질의 보호기전은 아직 불명하며, 융해온도와 시간도 매우 중요한 요인이 되고 융해액의 최적조건도 더 구명되어야 한다.

3. 종모돈의 번식능력 평가방법의 연구

우수종모돈의 선발시 정액생산능력의 조기판정은 종돈 생산비용을 크게 절감시킬 수 있다. 정자염색질 구조검사법(sperm chromatin structure assay, SCSA)이 이런 목적에 이용될 수 있는 유용한 방법이 되고 있다.

종모우에서도 염색질 이질성(chromatin heterogeneity)에 대한 감수성이 개체간에 차이가 있으며 수태율과도 상관이 높은 것으로 보고되고 있다. 체외수정(IVF)에 의해 종모돈의 수태율을 예측할 수 있다. 수태율에 차이를 보이는 종모돈 group간에 난자내 정자침입율에 현저한 차이가 있음이 보고되어 있다.

4. 돼지 발정동기화 기술 연구와 인공수정 형태

현재 외국에서 발정동기화에 이용되고 있거나 실험중인 약제들이 있다. 단독 또는 복합이용 방법들이 사용되고 있다. 그러나 이들의 장단점 및 이용 효율에 대해서는 더욱 연구가 필요하다.

투여용량과 투여기간이 발정동기화에 주요 요인으로 지적되고 있다. 한편 altrenogest 투여후 발정에서 fixed-time 인공수정으로 효과적인 번식성적을 얻을 수 있었다.

AI/AI(2회)보다는 NS/AI 또는 2두 종모돈의 AI/AI에서 분만을 및 산자수가 현저히 증가된다고 보고되었고 비육돈생산에서는 노력과 AI과정의 편의상 혼합정액의 이용도 권장되고 있다.

제 7 장 참고문헌

○ 정액품질 평가기술, SCSA관련 문헌

- Aisen, E.G., H.L. Alvarez, A. Venturino. and J.J. Garde. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53:1053-1061.
- Aisen, E.G., V.H. Medina. and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology* 57:1801-1808.
- Aitken, R.J., J.S. Clarkson and S. Fishel. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.* 40:183-197.
- Althouse, G.C., C.E. Kuster, S.G. Clark and R.M. Weisiger. 2000. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53:1167-1176.
- Alvarez, J.G., and B.T. Storey. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 29:548-555.
- Alvarez, J.G., J.C. Touchstone, L. Blasco and B.T. Storey. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J. Androl.*, 8:338-348.
- Askari H.A., J.H. Check, N. Peymer and A. Bollendorf. 1994. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acid in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch. Androl.*, 33:11-15.
- Beconi, M.T., C.R. Francia, N.G. Mora and M.A. Affranchino. 1993. Effects of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology.* 40:841-851.
- Berger, T., D.L. Anderson and M.C.T. Penedo. 1996. Porcine sperm fertilizing

- potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim. Reprod. Sci.* 44:231-239.
- Bilijan, M.M, W.M. Buckett, C.Y. Taylor, M.J.M. Luckas, I.A. Aird and C.R. Kingsland. 1996. Effect of abnormal hypo-osmotic swelling test on fertilization rate and pregnancy outcome in IVF cycles. *Fertil. Steril.* 66:412-416.
- Bilodeau, J.-F., S. Chatterjee, M.-A. Sirard. and C. Gagnon. 2000. Level of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55:282-288.
- Budworth, P.G., R.P. Ammann and P.L. Chapman. 1988. Relationship between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.* 9:41.
- Burkman, L.J., F.N. Syner, K.S. Moghissi and A.A. Acosta. 1984. Sperm acrosin content and semen parameters for successful in vitro fertilization normal and oligospermic groups. *Fertil. Steril.* 41:1025-1035.
- Bwanga, C.O. 1991. Cryopreservation of boar semen. I: A literature review. *Acta. Vet. Scand.* 32:431-453.
- Centola, G.M., J.H. Mattox, S. Burde and J.F. Leary. 1990. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single wavelength fluorescence microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 27:130-135.
- Cerolini, S., A. Maldjian, P. Surai. and R. Nobel. 2000. Viability, susceptibility to peroxidation. and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Sci.* 58:99-111.
- Chan, P.J., J.U. Corselli, J.D. Jacobson, W.C. Patton and A. King. 1996. Correlation between intact sperm acrosome assessed using the Spermac stain and sperm fertilizing capacity. *Arch. Androl.* 36:25-27.
- Chatterjee, S. and C. Gagnon. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 59:451-458.

- Check, H., B.S. Shanis, F. Epstein, H.W. Chung, W. Nowroozi and A. Bollendorf. 1989. The hypoosmotic swelling test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. *J. Androl.* 52:159-161.
- Chen, Y., R.H. Foote and C.C. Brockett. 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 30:423-431.
- Correa, J.R. and P.M. Zavcs. 1994. The hypoosmotic swelling test: it's employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42:351-360.
- Eriksson B.M, J.M. Vazquez , E.A. Martinez and J. Roca. 2001. Effect of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, Motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* 55:1593-1605.
- Eyestone, W.H and N.L. First. 1989. Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls. *Theriogenology* 31:191(abstr.).
- Foote R.H., Y. Chen, C.C. Brockett and M.T. Kaproth. 1993. Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine or blood serum. *J. Dairy Sci.*, 76:1908-1913.
- Funahashi, H., T.T. Stumpt, S.L. Terlouw, T. Cantley, A. Rieke and B.N. Day. 1994. Developmental ability of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 41:1425-1433.
- Gadea, J. and C. Matas. 2000. Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* 54:1343-1357.
- Gadea, J., C. Matas and X. Lucas. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* 56:95-108.
- Galil, A. and M. Bosisio. 1988. Quality of semen stored at +15/ 16°C is related to fertility of artificially inseminated swine. *Theriogenology* 30: 1185-1190.
- Garner, D.L., L.A. Johnson, S.T. Yue, B.L. Both. and R.P. Haugland. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and

- propidium iodide. *J. Androl.* 15:620-629.
- Garner D.L., C.A. Thomas and W.J. Hannes. 1997 Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57: 1401-1406.
- Glogowski, J., W. Denminawiez, B. Piros and A. Ciercszko. 1998. Determination of acrosin activity of boar spermatozoa by the clinical method; optimization of the assay and changes during short-term storage of semen. *J. Androl.* 50:861-872.
- Glossop, C.E. 1991. Pig artificial insemination re-assessed.. In *Practice*, Sept. pp. 190-1995.
- Grahan J.K., E. Kunze and R.H. Hannerstedt. 1990. Analysis of sperm viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.* 43:55-64.
- Holt, W.W., H.D. More and S.G. Hiller. 1985. Computer assisted measurement of sperm swimming speed in human semen : correlation of result with IVF assays. *Fertil. Steril.* 44: 112.
- Huxtable, R.J. 1992. Physiological action of taurine. *Physiological Reviews.* 72:101-163.
- Iwasaki, A. and C. Gagnon. 1992 Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of in fertility patients. *Fertil. Steril.* 57:409-416.
- Jeyendran, R. S, H.H. Van der Ven, M. Perez-Paleaz, B.G. Crabo, and L.J.D. Zanevel. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other sperm characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70:19-29.
- Johnson, L.A., K.F. Weitze, P. Fiser and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:143-172.
- Kennedy, W.P., J.M. Kaminski, H.H. Van der Ven, R.S. Jeyendran, R.S. Reid, J. Blackwell, P. Bielfeld and L.J.D. Zaneveld. 1989. A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J. Androl.* 10:221.
- Koukoulis, G.N., D. Vantman, L. Dennison, S.M. Banks and R.J. Sherins. 1989.

- Low acrosin activity in a subgroup of men with idiopathic infertility does not correlate with sperm density, percent motility, curvilinear velocity, or linearity. *Fertil. Steril.* 52:120-127.
- Kruger, T.F., D. Haque, A.A. Acosta, P. Pleban, R.J. Swanson, K.F. Simmons, M.M. Morshedi and S. Oehninger. 1988 Correlation between sperm morphology, acrosin, and fertilization in an IVF program. *Arch. Androl.* 20:237-241.
- Linford, E., F.A. Glover, C. Bishop, and L.L. Steward. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fertil.* 47:283-291.
- Mattioli, M., M.L. Bacci, Galeati and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 31:1201-1207.
- Maxwell, W.M.C. and L.A. Johnson. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
- Moliia, F.C., G. Evans, P.I. Casares. and W.M.C. Maxwell. 1994. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36:113-122.
- Nagai, T. 1996. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 42:153-163.
- O'Flaherty, C., M. Beconi and N. Beorlegui. 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *J. Androl.* 29:269-275.
- O'Connel. I.M. and McClure. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.* 17:704-709.
- Osinowo, O. and S. Salamon. 1976. Fertility test of frozen boar semen. *Aust. J. Biol. Sci.* 29:335-339
- Perez-Liano, B., J.L. Lorenzo, P. Yenes, A. Trejo and P. Garcia-Casado. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56:387-398.

- Phillip, J., Chan, J.U. Corselli, J.D. Jacobson, W.C. Patton and A. King. 1999. Sperm stain analysis of human sperm acrosomes. *Fertil. Steril.* 72:124-128.
- Q`Connor, M.T, R.P. Amann and R.G. Saacke. 1981. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory tests and their use for prediction fertility. *J. Anmi. Sci.* 53:1368-1376.
- Revell, S.G. and C.E. Glossop. A long-time ambient temperature diluent for boar semen. *Anim. Prod.* 48:579-584.
- Rakesh, K., Sharma. and A. Agarwal. 1996. Role of reactive oxygen species in male fertility. *Urology* 48:835-850.
- Roelof, M.J., P.W. Vermeiden, P.T. Rhemerev, T.F. Kruger and D.R. Franken. 1996. Acrosome morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis; relation with acrosin activity, morphology(strict criteria) and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 65:637-644.
- Rota, A., N. Penzo, L. Vinceni and R. Mantovani. 2000. Hypoosmotic swelling(HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 53:1415-1420.
- Sanchez-Partida L.G., B.P. Setchell and W.M. Maxwell. 1997. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:689-696.
- Setchel, B.P., M.J. D'Occhio, M.S. Laurie, M.J. Tucker and J.L. Zupp. 1988. Is embryonic mortality increased in normal female rats mated to subfertile males. *J. Reprod. Fertil.* 82:567-574.
- Sharma, R.K., and A. Agarwal. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48:835-847.
- Sharma, R., J. Hogg and D.R. Bromahm. 1993. Is spermatozoan acrosin a predictor of fertilization and embryo quality in the human? *Fertil. Steril.* 60:881-887.
- Sikka, S.C., M. Rajasekaran and W.J.G. Hellstrom. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl.* 16:464-468.

- Sone, M., K. Ohmura and K. Bamba. 1982. Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *Vet. Rec.* 111:11-14.
- Srivastava, R.S., A.K. Mathur and D.B. Kalra. 1987. Effects of alpha-tocopherol on preservability of ram semen. *Indian J. Anim. Sci.* 57:553-554.
- Thomas, C.A. and D.L. Garner. 1994. Post-thaw bovine spermatozoal quality estimated from fresh samples. *J. Androl.* 15:489-500.
- Toda, T., N. Sofikitis, I. Miyagawa, P. Zavos, T. Harada, Y. Mio and N. Terakawa. 1992. The importance of the hypoosmotic swelling test and acrosin activity assay for identifying subpopulations of idiopathic infertile men. *Arch. Androl.* 29:219-214.
- Tummon, I.S., A.A. Yuzpe, S.A.J. Daniel and A. Deutsch. 1991. Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 56:933-938.
- Upreti, G.C., K. Jensen, J.E. Oliver, D.M. Duganzich, R. Munday and J.F. Smith. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48:269-278.
- Van Der Ven, H.H., R.S. Jeyendran, S. Al-Hasani, J. Perez-Pelaez, K. Diedrich and L.J.D. Zaneveld. 1986. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *J. Androl.* 7:190-196.
- Van der Ven, H.H., W.P. Kennedy, J.M. Kaminski, R.S. Jeyendran and L.J.D. Zaneveld. 1987. Human sperm acrosin as a fertility marker. *J. Androl.* 8:20.(abstr.)
- Vazquez, J.M., E.A. Martinez, P. Martinez, C. Garcia-Artiga and J. Roca. 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47:913-922.
- Vazquez, J.M., E. Martinez, J. Roca, P. Coy and L.M. Pastor. 1993. Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 36:84-88.
- Westh, P. and H. Ramlov. 1991. Trehalose accumulation in the tartigrade

- adorybiotus aoronifer during anhydrobiosis. *J. Exp. Zool.* 258:303-311.
- Waltz, F.A., C.W. Foley, R.C. Herschler, L.W. Tiffany and B.J. Liska. 1968. Bacterial studies of boar semen. *J. Anim. Sci.* 27:1357-1362.
- William, M., M.D. Buckett, F. Roy and M.D. Farquharson. 1997. The hypo-osmotic swelling test in recurrent miscarriage. *Fertil. Steril.* 68:506-509.
- Xu, X., S. Pommier, T. Arbov, B. Hutchings, W. Sotto and G.R. Foxcroft. 1998. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J. Anim. Sci.* 76:3079-3089.
- Xu, X., P.C. Seth, D.S. Harbison, A.P. Cheung and G.R. Foxcroft. 1996. Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology* 46:1325-1337.
- Yavetz, H., R. Hauser, L. Yogov, A. Botchan, J.B. Lessing, Z.T. Homonnai and G. Daz. 1995. Advance methods for evaluation of sperm quality. *Andrologia* 27:31-35.
- Windsor D.P. and I.G. White. 1993. Aseessment of ram sperm mirochondrtial function by quantitative determination of sperm rhodamine 123 accumulation. *Mol. Reprod. Dev.*, 36,354-360.
- Woelders, H. 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart.* 19:135-138.
- Woelders, H., A. Matthijs and B. Engel. 1997. Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and coolig rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35:93-105.
- Zeng, W.X., M. Shimada, N. Isobe and T. Terada. 2001. Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. *Theriogenology* 56:447-458.
- Zou, C.-X. and Z.-M. Yang. 2000. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology* 53:1477-1488.

○ 발정동기화기술 개발 관련 문헌

- Aleexopoulos, C., C. Boscós, P.h. Saratsis, C. Saoulidis and S. Kyriakis. 1996. The effect of storage time and number of spermatozoa per insemination dose on semen characteristics and fertilizing capacity of boar semen diluted with BTS extender. *J. Anim. Sci.* 62: 599-604
- Christenson, R.K. 1971. Fixed mating sows and gilts. *Ohio Dep.* 56:72.
- Christenson, R.K., C.E. Pope, V.A. Zimmerman-Pope and B.N. Day. 1973. Synchronization of estrus and ovulation in superovulated gilts. *J. Anim. Sci.* 36:914.
- Christenson, R.K. and H.S. Teague. 1975. Synchronization of ovulation and artificial insemination of sows after lactation. *J. Anim. Sci.* 41:560.
- Crabo, B.G. 1990. Preservation of boar semen : A worldwide perspective. *Proceedings of the Second International Conference on Boar Semen Preservation.* pp. 3-8.
- Gordon, I. 1997. Controlled reproduction in pigs. p.38.
- Huhn, U., M.L. Raasch and I. König. 1991. Pregnancy rate in gilts after estrus synchronization and fixed-time inseminations ; results of one-year field experiments. *Reprod. Dom. Anim.* 26:126-135.
- Johnson, L.A., J.G. Aalbers, C.M.T. Willems and W. Sybesma. 1981. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J. Anim. Sci.* 52:1130.
- Johnson, L.A., J.G. Aalbers and J.A.M. Arts. 1982. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. II. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in gilts inseminated either at a fixed time or according to Walsmeta readings. *J. Anim. Sci.* 54:126.
- Longeneker, D.E. and B.N. Day. 1968. Fertility level of sows superovulated at postweaning estrus. *J. Anim. Sci.* 27:709.
- Moody, N.W., D.S. Baker, V.W. Hays and V.G. Speer. 1969. Effect of reduced farrowing interval on sow productivity. *J. Anim. Sci.* 28:76
- Martinat-Butte, F., F. Bariteau, B. Badouard and M. Terqui. 1985. Control of

- pig reproduction in a breeding programme. *J. Reprod. Fertil.* (suppl.) 33:211-228.
- Moody, N.W. and V.G. Speer. 1971. Factors affecting sow farrowing interval. *J. Anim. Sci.* 32:510
- Paquignon, M., J. Bussiere, F. Bariteau, G. Le Maginan De Kerangat and M. Courot. 1980. Efficacitedes dilueurs Guelph et SCK₇ pour la conservation prolongee a l'etat liquid du sperme de verrat. *Journées de la recherche porcine en France*, 12,pp.159-160. Paris, L'Institute Technique du porc.
- Polge, C., B.N. Day and T.W. Groves. 1968. Synchronization of ovulation and artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.* 89:136.
- Pursel. V.G. and C.S. Park. 1987. Duration of thawing on post thaw acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen in 5ml maxi-straws. *Theriogenology* 28:683-690.
- Self, H.L. and R.H. Grummer. 1958. The rate and economy of pig gains and the reproductive behaviouir in sows when litters are weaned at 10 days, 21 days or 56 days of age. *J. Anim. Sci.* 17:862.
- Selgrath. J.P. and K.M. Ebert. 1993. Synchronization of swine with norgestomet implants. *Theriogenology* 39:306.
- Steverink, D.W.B., N.M. Soede, E.G. Bouwman and B. Kemp. 1997. Influence of insemination - ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in ows. *J. Reprod. Fertil.* 111: 165-171.
- Swensson, T. 1977. Experiments with a new diluent for boar semen. *Svinskotsel* 67:29(cited by *Anim. Breed. Abstr.* 1977.45:683).
- Weitze, K.F. 1991. Long-term storage of extended boar semen. *Proceedings of the Second International Conference on Boar Semen Preservation.* pp. 231-253.
- 정흥기, 김홍주, 송우석, 박창식. 1988. 동결정액과 PG600의 이용이 이유종빈돈의 번식 능력에 미치는 영향. *한국가축번식학회지.* 12:15-19.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.