

# 닭 精자의 生死鑑別을 위한 生體染色法에 관한 研究

金 永 洪

慶北大學校 農科大學 獸醫學科

## 緒 論

精자의 生死鑑別을 위한 染色法은 어떠한 염색액에 흡수되는 죽은 세포와 산 세포의 차이에 기본을 두어 두개의 집단과 서로 구별되고 아울러 배경과도 구별될 수 있도록 세포를 염색하는 것으로 정액성상을 판단하는데 중요한 부분을 차지한다.

정자의 生사감별을 위한 염색액으로는 opal blue and eosin, erythrocin, nigrosin, and eosin, bromphenol blue and eosin, fast green and eosin, Congo red and nigrosin, aniline blue and eosin 및 trypan blue stain이 이용되어 왔다. <sup>1,2,4,5-8,10-12)</sup>

이들 중 닭에는 Cooper 및 Rowell <sup>4)</sup>이 nigrosin-eosin stain을 이용하여 산 정자의 비율, 정자의 운동성 및 수정율을 발표하였으며 Friars 및 Chatterjee <sup>6)</sup>가 nigrosin-eosin, bromphenol blue-nigrosin 및 Congo red nigrosin stain을 이용하여 정자의 염색상태를 비교하였으며 Bajpai <sup>1)</sup>, Marini 및 Goodman <sup>8)</sup>도 nigrosin-eosin stain을 이용하여 산 정자의 비율 및 異常 정자의 비율을 발표하였으며 Wilson 등 <sup>11)</sup>, 김 및 장 <sup>12)</sup>은 trypan blue stain을 이용한 정자의 염색효과를 발표하였다.

그리고 Blackshaw <sup>3)</sup>는 nigrosin-eosin 및 Congo red-nigrosin stain을 이용하여 種牡牛와 種牡羊에서의 정자의 생존율 및 보존시간에 따른 정자의 생존율을 발표하였고 Friars 및 Chatterjee <sup>6)</sup>가 nigrosin-eosin stain을 이용하여 보존시간과 온도에 따른 정자의 염색상태와 산 정자의 비율을, 그리고 Phillip 등 <sup>9)</sup>은 정액의 보존시간에 따른 정자의 수정율을 비교 발표하였다.

저자는 이러한 여러 가지 염색방법 중에서 닭 정자에 더 우수하고 안정성이 있는 염색방법을 밝히고 동시에 이 방법을 이용하여 정액의 보존시간과 온도에 따른 산

정자의 비율을 밝히기 위하여 이 실험을 실시하였다.

## 材料 및 方法

材料 : 1979년 2월부터 5월까지 4개월간 건강한 수탉 (잡종, 8~10월령) 10마리를 실험동물로 하였으며 정액은 Burrows 및 Quinn <sup>3)</sup>의 abdominal massage technique에 의하여 직접 vent 밑에서 채취하였으며 정액의 채취는 2일에 1회씩 오전 10~11시 사이에 실시하였다.

실험동물은 한 마리씩 사육상에 사육하였으며 사료는 P사 제풀인 산란용 배합사료를 사용하였고 물은 충분히 급여했다.

方法 : 이 실험은 3群으로 나누어 실시했다. 제 1 군은 Cooper 및 Rowell <sup>4)</sup>의 nigrosin-eosin(NE), Dott 및 Foster <sup>5)</sup>의 eosin-nigrosin(EN), Wilson 등 <sup>11)</sup>의 trypan blue(TB), Blackshaw <sup>3)</sup>의 Congo red-nigrosin(CN), Herman 및 Madden <sup>7)</sup>이 인용한 Mayer의 fast green-erythrocin 및 fast green-eosin 염색법을 準用하여 닭 정자에 대한 염색상태의 특징과 산 정자의 비율을 비교 조사하였다.

제 2 군과 제 3 군은 Wilson 등 <sup>11)</sup>의 trypan blue 염색법을 이용하여 정자의 염색상태 및 산 정자의 비율이 2~5°C에서 정액채취후 4, 8, 24시간과 채취후 1~2분 이내의 변화 및 15°C와 30°C에서 각각 4시간, 5시간 정액을 보존했을 경우의 변화를 비교하였다.

이상의 실험에서 정자의 염색은 신선한 정액 한 방울에 염색액 8~10방울의 비율로 깨끗한 slide glass에서 1~2분간 유리봉으로 잘 저은 다음 이 정액과 염색액의 혼합액 한 방울을 깨끗한 slide glass에 얇게 도말하여 즉시 화염건조(Congo red-nigrosin stain은 자연건조)하여 경검(1,000X)하였다. 그리고 산 정자(염색되지 않

은 정자)의 계산은 slide에서 333개의 정자를 세어서 2중 염색이 안된 정자를 세어서 다음 식에 의하여 산 정자의 비율을 계산하였다.

$$\text{산 정자의 비율} = (\text{염색이 안된 정자의 수}) \times 3 \div 10$$

### 結果 및 考察

1) Nigrosin-eosin, eosin-nigrosin, trypan blue, Cogo red-nigrosin, fast green-erythrocin 및 fast green-eosin 염색법을 이용한 닭 정자의 염색효과를 비교하여 산 정자의 비율은 表 1에 표시하였으며 이를 角度數變形하여 분산분석한 결과 각 염색액간에 1% 수준의 유의성이 인정되었다.

**Table 1** Comparison of D.M.R.T. on Average Percentage of Unstained Sperm with Nigrosin-Eosin(NE), Eosin-Nigrosin(EN), Trypan Blue(TB), Congo Red-Nigrosin(CN), Fast Green-erythrocin(FG) and Fast Green-Eosin(FE) Stains

Stains	FE	FG	CN	NE	EN	TB
Unstained Sperm(%)	89.8	90.0	90.4	90.6	91.4	92.5

表 1에서 nigrosin-eosin 및 eosin-nigrosin stain에 의한 산 정자의 비율은 각각 90.6%, 91.4%로서 Bajpai<sup>1)</sup>의 87.3~97.1%, Wilson 등<sup>11)</sup>의 87.6~91.0%, 김 및 장<sup>12)</sup>의 95.6%와 비슷하며 Blackshaw<sup>2)</sup>의 82.0%, Friars 및 Chatterjee<sup>6)</sup>의 73.2%, Marini 및 Goodman<sup>8)</sup>의 77.98~83.5%보다 약간 높았지만 Cooper 및 Rowell<sup>4)</sup>의 49.5%(16.3~68.9%)보다 매우 높은 비율을 나타냈다.

Trypan blue stain에 의한 산 정자의 비율은 92.5%로서 Wilson 등<sup>11)</sup>의 90.8~96.4%, 김 및 장<sup>12)</sup>의 95.6%와 비슷하며 Congo red-nigrosin stain에 의한 산 정자의 비율은 90.4%로 Blackshaw<sup>2)</sup>의 5.0%(種牡羊)과 거의 비슷하나 Friars 및 Chatterjee<sup>6)</sup>의 59.4%보다 매우 높은 비율이며 fast green-erythrocin 및 fast green-eosin을 이용한 염색액은 각각 90.8%, 89.8%로 다른 염색액에 비하여 약간 낮은 비율을 나타내었다.

이와 같이 trypan blue 염색법을 제외한 방법에서 산 정자의 비율이 저자보다 낮은 이유는 slide를 만들 때 정액과 염색액을 혼합하여 도달하기까지의 보존시간과 도달한 다음의 Slide 건조방법 즉, 도달한 즉시 환원조건을 실시한 것과 자연조건을 실시한 것과의 차이로서 이

러한 과정에서 일부분의 정자가 죽기 때문에 산 정자의 비율이 실제보다 낮게 나타나는 것으로 생각된다.

그리고 이들 염색액을 이용한 염색상태는 모두 닭 정자의 생사감별에 좋은 결과를 보였으나 이중 특히 nigrosin-eosin, eosin-nigrosin 및 trypan blue stain이 산 정자, 죽은 정자 및 배경의 구별이 뚜렷하여 정확하게 생사감별을 할 수 있으며 이는 Wilson 등<sup>11)</sup>은 trypan blue stain이, Friars 및 Chatterjee<sup>6)</sup>는 nigrosin-eosin stain이 닭 정자의 생사감별에 매우 우수하였다는 보고와 동일하였다.

특히 trypan blue stain은 정액과 염색액의 혼합액을 도달하고 건조하는 과정에서 나타날 수 있는 정자의 손실(false high count)이 없으며 죽은 정자(stained sperm)가 매우 뚜렷하고 많은 예를 쉽고 빨리 판단할 수 있는 반면에 nigrosin-eosin 및 eosin-nigrosin stain은 산 정자(unstained sperm)와 죽은 정자의 구별이 뛰어나지만 slide를 만들 때 일어나는 정자의 손실을 없애기 위하여 반드시 정액과 염색액을 가능한 한 빨리 도달하고 즉시 환원조건을 실시하여야 하는 어려움이 있다고 생각된다.

기타 Congo red-nigrosin stain은 slide를 건조할 때 환원조건보다는 자연조건이 죽은 정자가 매우 명확하게 나타났으며 fast green을 이용한 염색액의 특징은 배경이 산 정자 및 죽은 정자보다 뚜렷하여 죽은 정자의 판단에 불편함이 있었다.

2) Trypan blue stain을 이용하여 닭 정액을 2~4°C에서 정액채취 직후, 채취후 4시간, 8시간, 24시간이 경과함에 따른 산 정자의 비율은 表 2에 표시하였으며 이를 角度數變形하여 분산분석한 결과 정액채취 후의 보존시간에 따라 1% 수준의 유의성이 인정되었으나 4시간과 8시간의 경우는 유의성이 없었다.

**Table 2** Comparison of D.M.R.T. on Average Percentage of Unstained Sperm after Staining for Various Periods in Trypan Blue Staining Technique

Time of Holding Semen(h)	0	4	8	24
Unstained Sperm(%)	92.1	66.3	56.2	15.8

表 2에서 정액채취 직후부터 4, 8, 24시간이 경과됨에 따라 산 정자의 비율은 각각 92.2, 66.5, 56.2, 15.8%로 점차 감소되었는데 이는 cold shock 때문으로 생각된다.

Blackshaw<sup>2)</sup>는 소와 양에서 Congo red-nigrosin stain을 이용하여 정액을 채취후부터 64분 이내의 산 정자

의 비율에 대한 변화를 비교했는데 소에서 67~73%, 양에서 54~64%로 거의 일정한 수준을 보였다. 이는 자자의 성적과는 차이가 있지만 이러한 차이는 정액을 장기간 보존하여서 생기는 변화라고 생각된다.

3) Trypan blue stain을 이용한 닭 정자의 보존시간과 온도에 따른 효과는 表 3에 표시하였으며 이를 2<sup>2</sup>요인실험에 의한 분석결과 보존시간에 따라 산 정자의 비율이 다르게 나타났으며 ( $p < 0.01$ ), 보존온도에 대한 산 정자의 비율도 5% 수준에서 유의성을 나타냈으며 보존시간과 온도의 상호작용은 보존시간이 길수록 산 정자의 비율이 감소되었으며 이러한 경향은 온도가 높을 때 더욱 심하였다. ( $p < 0.05$ )

**Table 3** Average Percentage of Unstained Sperm after Storage of Semen *in vitro* for 4 or 5 Hours. at 15°C, or 30°C.

Temperature (C)	Time (Hours)	4	5	Mean
15		81.6	77.4	79.5
	30	81.4	70.0	75.7
Mean		81.5	73.7	

表 3에서 정액을 30°C에 4시간 보존했을 때 산 정자의 비율이 81.4%로서 15°C의 81.6%와 거의 비슷하였지만 Friars 및 Chatterjee<sup>6)</sup>는 30°C에 4시간 보존했을 경우에는 15°C에 보존했을 때보다 죽은 정자가 21.8~26.2%로 증가하여 저자보다 죽은 정자의 비율이 높지만 온도에 따라 나타나는 변화는 비슷한 결과로 생각된다. 그러나 이러한 현상이 일반적으로 닭 정자가 30°C 이상에서 1~2시간 정도의 수정능력을 보유하며 15°C에서 정자의 운동성이 강하다는 사실과 어떤 관련이 있는지 알 수가 없었다.

### 結 論

이 실험을 통하여 닭 정자의 생사감별을 위한 염색액으로 nigrosin-eosin, eosin-nigrosin, trypan blue, Congo red-nigrosin, fast green-erythrocin 및 fast green-eosin stain 모두가 우수하였으나 nigrosin-eosin, eosin-nigrosin 및 trypan blue stain이 가장 우수하였다.

특히 trypan blue stain은 slide 제작 중에 일어날 수 있는 결점 즉, 정액과 염색액의 혼합액을 slide에 도말하기 전과 도말한 다음의 건조과정 중에 일부의 정자가 죽는 경우가 없이 매우 안정성이 있고 간편하며 죽은 정

자의 구별이 매우 확실한 염색법이며, nigrosin-eosin 및 eosin-nigrosin stain은 죽은 정자와 배경과의 구별이 아주 확실하지만 정액과 염색액을 혼합하여 가능한 빨리 도말하고 즉시 화염건조를 해야 하는 어려움이 있었다.

그리고 닭 정자는 2~5°C에서 4시간 이상 보존하면 산 정자의 비율이 매우 감소하였으며, 정액의 보존시간과 온도에 따라 산 정자의 비율이 다르며 보존시간이 길수록 산 정자의 비율이 감소되었는데 이러한 현상은 온도가 높을 때 심하였다.

### 參 考 文 獻

1. Bajpai, P.K.: The effect of photoperiodicity on semen characteristics of poultry. Poultry Sci. (1963) 42: 462~465.
2. Blackshaw, A.W.: The effect of glycerol on the supravitally staining of spermatozoa. Aust. Vet. J. (1958) 34: 71~76.
3. Burrows, W.H. and Quinn, A.P.: The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Sci. (1937) 16: 19~24.
4. Cooper, D.M. and Rowell, J.G.: Relations between fertility, embryonic survival and some semen characteristics in the chicken. Poultry Sci. (1958) 37: 699~707.
5. Dott, H.M. and Foster, G.C.: A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "live-dead" stain. J. Reprod. Fert. (1972) 29: 443~445.
6. Friars, G.W. and Chatterjee, S.: Effects of semen collection and storage temperatures on sperm viability and fertility in turkeys. Poultry Sci. (1969) 48: 1434~1437.
7. Herman, H.A. and F.W. Madden: The artificial insemination of dairy and beef cattle. 5th edition, Lucas Brothers, Colombia (1974) p. 51~53.
8. Marini, P.J. and Goodman, B.L.: Semen characteristics as influenced by selection for divergent growth rate in chickens. Poultry Sci. (1969) 48: 859~865.
9. Phillip, L.E., Buckland, R.B. and Bernon, D.E.: A note on the relationship between the

- fertility of fresh semen and that stored varying lengths of time, and the effect of storage on duration and percent fertility. Poultry Sci. (1974) 53 : 2216~2218.
10. Shaffer, H.E. and Almquist, J.O. : Vital staining of bovine spermatozoa with an eosin-aniline blue staining mixture. J. Dairy Sci. (1948) 31 : 677~678.
11. Wilson, H.R., Warnick, A.C. and Gutierrez, J.H. : Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. Poultry Sci. (1969) 48 : 714~717.
12. 김영홍, 장인호 : 닭 정자의 생사감별법에 관한 연구. 경대논문집 (1978) 26 : 643~649.

## A Comparison of Vital Staining Techniques of Cock Semen

Young-Hong Kim, D. V. M., M. S.

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Kyungpook National University*

### Abstract

The studies were undertaken with the objective to compare six staining techniques, nigrosin-eosin, eosin-nigrosin, trypan blue, Congo red-nigrosin, fast green-erythrocin and fast green-eosin and select one of these staining techniques to measure live-dead sperm ratios of cock semen under the different length of time and temperature of holding semen.

The results obtained were summarized as follows:

Nigrosin-eosin, eosin-nigrosin and trypan blue staining techniques were estimated to be more satisfactory methods and gave good results in live-dead spermatozoa differentiation in cock semen.

They showed the sharpest contrast between unstained sperm and the background and that trypan blue staining technique offered no critical smearing and drying procedure in which cells could be killed and result in a false high count.

Holding semen for 5 hours at 15°C as opposed to 30°C increased the incidence of unstained sperm but holding semen for 4 hours did not affect the incidence of stained sperm. with increasing time of holding semen, there was a significant decline in percent of live sperm.