

젖염소 유즙에 적용한 5가지 체세포 염색 방법의 비교

김영철 · 박하연 · 이윤경 · 이정치* · 서국현 · 이채용¹

전남대학교 수의과대학, *광주보건대학 임상병리과

(게재승인: 2008년 6월 11일)

Comparison of 5 Staining Methods for Somatic Cells in Dairy Goat Milk Samples

Young-Chul Kim, Ha-Yeon Park, Youn-Kyung Lee, Jeong-Chi Lee*, Guk-Hyun Suh and Chai-Yong Lee¹

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

*Department of clinical pathology, Gwangju health college, Gwangju 506-701, Korea

Abstract : This study was performed to investigate the best staining method for the somatic cell classification of dairy goat milk. Dairy goat milk samples, which were collected randomly from a dairy goat farm in Jeollanam-do, South Korea, were stained and analyzed with direct microscopic method, using 5 different staining methods; Wright's stain, Giemsa stain, Diff-quick stain, Newman's stain and Pyronin Y-Methyl Green stain, respectively. Among them, The Newman's staining was found to be the most rapid and effective method, for it required the shortest time for staining and provided the easiest way to classify somatic cells.

Key words : dairy goat milk, stain, somatic cell.

서 론

젖염소유(山羊乳)의 단백질은 일반적으로 牛乳의 단백질보다 더 잘 흡수되고 소화되며, 단백질의 구조가 포유동물 중 사람젖(人乳)의 단백질 구조와 가장 유사하다. 또한 α -Casein 이 적어 알레르기나 설사 등의 부작용이 없을 뿐만 아니라 특히 지방구가 매우 작아 총 표면적이 넓기 때문에 분해효소에 의해 쉽게 소립자로 분해되어 소화시키기 용이한 연질 커드가 생성되므로써 우유에 위장장애가 있는 사람에게도 유용하여 기능성 식품으로 부각되고 있다(12). 최근 선진외국에서도 젖염소유의 가치가 재인식되면서 고가에 거래되고 있는 실정이며, 젖염소유의 영양 및 경제성 등에 관한 연구가 다양하게 수행되고 있다(10). 그러나 우리나라의 경우, 젖염소유에 대한 연구는 미미할 뿐만 아니라(3), 아직 생산량이 많지 않아 제한적으로 소비되고 있으나 젖염소유의 기능적 그리고 영양적 우수성 때문에 가까운 장래에 대중화가 될 것으로 생각된다(5).

현재 우리나라 젖소의 유질평가 항목에는 체세포수, 세균수, 유지방, 무지고형분 등이 기준이 되어 표준화 되어 있다. 그러나 젖염소유에 대한 유질평가 기준은 없는 실정으로 이에 대한 체계적이고 표준화된 규정의 제정이 필요하다(2). 유질

평가 항목 중 체세포 수는 유방내 감염의 지표로, 잠재성 유방염의 진단법으로 이용되고 있으며 유방위생 및 신속한 유질평가에 활용되고 있다(18). 체세포수 측정은 다양한 방법이 있지만 짧은 시간에 다량을 처리 할 수 있는 쿨터 계수기, Fossomatic 기기를 이용한 방법이 가장 널리 사용되고 있다(8). 젖염소에서는 이러한 기기를 이용한 체세포 측정방법을 사용할 수 있으나 이 방법은 유즙에 함유되어 있는 DNA particles, cytoplasmic particles (CPS) 그리고 지방구 등은 감별되지 않아 이들이 체세포로 함께 계산될 뿐만 아니라 혈액세포와 상피세포를 감별하지 못하여 이들의 비율(%) 측정이 불가능하여 유질 및 유방염 평가에서 잘못된 판정을 할 수 있다(7, 16, 21). 따라서 현재로서는 정확한 체세포 감별은 유즙 염색 후 현미경 관독에 의해서만 가능하다.

젖염소 유즙에 대한 체세포의 표준 염색 방법은 국제 낙농협회(International Dairy Federation, IDF)는 methylene blue (MB) 염색법을, 미국 식품 의약국(Food and Drug Administration, FDA)은 pyronin y-methyl green (PYMG) 염색법을 표준 공정법으로 추천하고 있어서 나라마다 각각 다른 염색법을 사용하고 있다. 그러나 MB 염색법은 세포들과 CPS와 감별이 어렵고 PYMG 염색법은 염색과정이 복잡하여 야외에서 간편하게 이용하기 어려운 실정이다(14, 17). 이 연구에서는 젖염소 유즙 염색 시 소요시간이 가장 빠르고, 체세포 감별이 용이한 염색방법을 알아보기 위하여 현재 혈액세포 염색에 사용되는 Wright's stain, Giemsa stain, Diff-

¹Corresponding author.
E-mail : cylee@chonnam.ac.kr

Quik stain, 면양 유즙 염색법인 Newman's stain, 그리고 젖염소 유즙 염색법인 PYMG stain을 수행하여 젖염소 유즙의 체세포 염색성을 비교하고자한다.

재료 및 방법

재료의 채취

2007년 4월에 전남지역 농가에서 사육되는 젖염소 중 califoria mastitis test (CMT) 음성 및 체세포 10만/ml 이하의 Saanen 종 20두, 40 분방을 대상으로 유두를 알코올로 소독한 다음 처음 2-3 줄기는 짜버린 후 약 20 ml를 채유하여 멸균된 용기에 받아 아이스박스 안에 넣어 실험실로 운반하여 실험하였다.

젖염소유 도말 및 고정

Gonzalo 등(8)과 김 등(1)의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다.

가검유를 37°C incubator에 넣어 15분 가운 시킨 가검유를 교체번호와 좌, 우 분방 그리고 각각의 염색법을 연필로 표시하고 슬라이드를 알코올 솜으로 닦은 후 알코올램프로 화염멸균 시켜 준비한 5장의 슬라이드 밑에 가로 1 cm, 세로 1 cm의 정사각형이 표시된 밑종이를 대고 0.01 ml micropipet 으로 각각 5 ul씩 떨어뜨리고 platinum wire로 유즙을 균질

하게 도포했다. PYMG stain을 할 슬라이드를 제외 한 나머지 4장의 슬라이드는 건조 후 methanol에 3-5분간 고정시켰다. PYMG stain 할 슬라이드는 고정액 처리 없이 24시간 건조시켰다. 각 슬라이드는 고정 및 건조 후 Wright's stain (Youngdong, Korea) (9), Giema stain 용액 (Merck, USA) (4), Diff-Quik solution I (Sysmex, Japan) (20), Newman's stain (22), PYMG stain (17)등의 염색을 실시하였다.

염색법의 비교

Maisi (15)와 Schalm 등(19)의 방법에 준하여 광학 현미경으로 혈액 세포와 상피세포를 분류하였으며 해상력 등급을 4단계로 구분하여 배경, 체세포, CPS, 지방구의 염색상을 각각 비교하였다(Table 2). 그리고 각 염색법에 대하여 염색의 간편성, 염색시간 및 비용을 비교하였다.

결 과

5가지 염색법에 대한 염색성은 Table 1과 Fig 1-5에 나타내었다. 5가지 염색법 모두 체세포내 핵 염색성은 배경과 차이를 보이는데 반해 체세포내 세포질과 CPS 염색성에서는 PYMG stain이 배경과 뚜렷한 차이를 보였다. 지방구 염색성은 PYMG stain을 제외한 나머지 4가지 염색법에서 배경과 차이를 보였다.

Table 1. Stain color of 5 staining methods on goat milk constituents

	Staining methods				
	Wright's stain	Giema stain	Diff-Quik stain	Newman's stain	Pyronin Y methyl green stain
Nucleus in somatic cell	Blue	Blue	Dark blue	Dark blue	Black
Cytoplasm in somatic cell	Light dark purple	Light Pink	Light purple	Blue	Red
Background	Light dark purple	Light Pink	Light purple	Blue	Light pink
CPS*	Light dark purple	Light Pink	Light purple	Blue	Red
Fat globule	White	White	White	White	Light pink

*Cytoplasmic particles.

Table 2. Resolution score of 5 staining methods on goat milk constituent

	Staining methods				
	Wright's stain	Giema stain	Diff-Quik stain	Newman's stain	PYMG stain**
Background & somatic cell	1 ⁺	1	1	1	1
Background & CPS*	4 [§]	4	4	4	1
Background & fat globule	1	1	1	1	4
Epithelial cell & blood cell	1	1	1	1	1
classification of epithelial cell	4	4	4	3 [†]	4
classification of blood cell	4	4	4	3	4

* ;Cytoplasmic particles.

** ;Pyronin Y Methyl Green stain.

⁺ ;Distinct differential classification of cells is possible in × 40 field.

[†] ;Distinct differential classification of cells is impossible in × 40 field.

[‡] ;Distinct differential classification of cells is impossible in × 40 field but is possible in × 100 field.

[§] ;Distinct differential classification of cells is impossible both in × 40 and × 100 field.

이 연구에서 공시한 5가지 염색법에 대한 각각의 해상력 등급은 Table 2에 나타내었다. Newman's stain이 배경과 상피 및 혈구세포의 분류에서 나머지 4가지 염색법보다 해상력이 우수하였다. 배경과 CPS 감별에서는 PYMG stain이 가장 해상력이 우수하였다. Wright's stain, Giemsa stain, Diff-Quik stain은 상피, 혈구세포의 분류에서 해상력이 낮았다.

5가지 염색법에 대한 염색과정과 염색에 소요되는 시간 및 비용은 Table 3에 나타내었다. 유즙 도말에서 검경까지의 염색과정은 Newman's stain과 Giemsa stain이 8단계로 가장 간단하고 Wright's stain와 Diff-Quik stain이 9단계였으며 PYMG stain이 12단계로 가장 복잡했다. 유즙 도말 후 검경

까지의 염색시간은 Newman's stain과 Diff-Quik stain이 15분으로 가장 짧았으며 Wright's stain 30분, Giemsa stain 45분이었고 PYMG stain은 하루 도말 건조 후 70분으로 다른 염색법에 비해 많은 시간이 소요되었다. 염색 비용은 Wright's stain, Giemsa stain, Newman's stain, Diff-Quik stain 순으로 저렴하였고 PYMG stain이 가장 고가였다.

고 찰

우유에서도 많은 방법의 염색법이 추천 되었지만 현재 짧은 시간에 다량을 처리 할 수 있는 Fossomatic 기기 등을 이용한

Table 3. Comparison of 5 staining methods on processing step, time and cost

	Staining methods				
	Wright's stain	Giemsa stain	Diff-Quik stain	Newman's stain	PYMG stain***
Process* (step)	9	8	9	8	12
Time** (minute)	30	45	15	15	70 after overnight
Cost (Won)	24,000	34,000	132,000	41,000	283,000

*From smear to microscopic examination.

**After smear to microscopic examination.

***Pyronin Y Methyl Green stain.

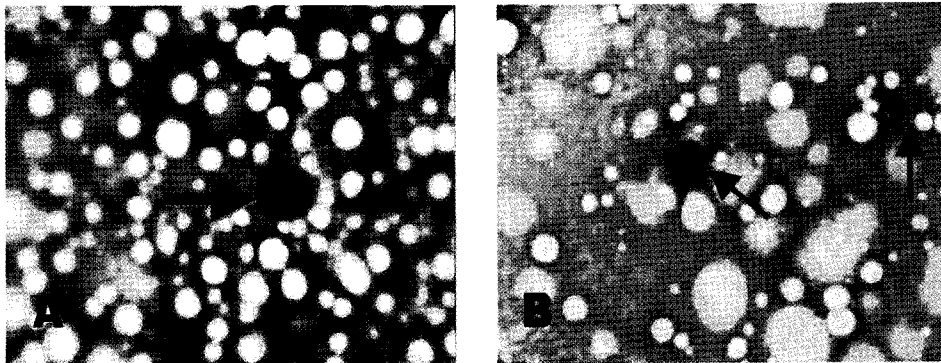


Fig 1. Cytological findings of somatic cells by Wright's staining method. A, epithelial cell (arrow), $\times 100$; B, blood cells (small arrows), $\times 100$.

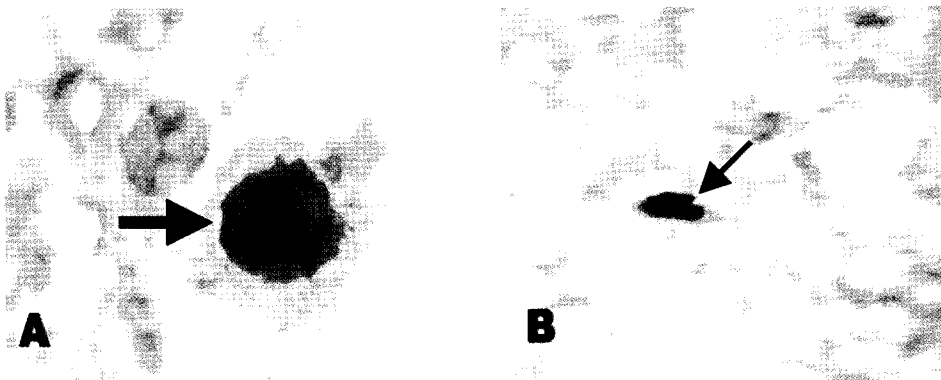


Fig 2. Cytological findings of somatic cells by Giemsa staining method. A, epithelial cell (arrow), $\times 100$; B, blood cell (small arrow), $\times 100$.

방법이 널리 사용되고 있다. 그러나 젖염소와 면양에서는 이런 기기들이 유즙에 함유되어 있는 DNA 편이나 세포질 편 그리고 지방구 등은 감별되지 않아 이들이 체세포로 함께 계산될 뿐만 아니라 혈액세포와 상피세포를 감별하지 못하여 이들의 비율(%) 측정이 불가능하여 유질 및 유방염 평가에서 잘못된 관정을 할 수 있는 것으로 보고되고 있다(7, 16, 21).

이 연구에서는 젖염소 유즙 염색 소요시간이 가장 빠르고,

체세포 감별이 용이한 염색방법을 알아보기 위하여 현재 혈액세포 염색에 사용되는 Wright's stain, Giemsa stain, Diff-Quik stain, 유즙 염색법인 Newman's stain, PYMG stain을 수행하여 젖염소 유즙의 체세포 염색성을 비교하였다. Maisi (15)와 Schalm 등(19)의 방법에 준하여 광학 현미경으로 혈액 세포와 상피세포를 분류하고 세포들의 염색성을 관찰한 결과, 5가지 염색법 모두 세포내 핵을 뚜렷히 구분 할 수



Fig 3. Cytological findings of somatic cells by Diff-Quik staining method. A, epithelial cell (arrow), × 100; B, blood cell (small arrow), × 100.

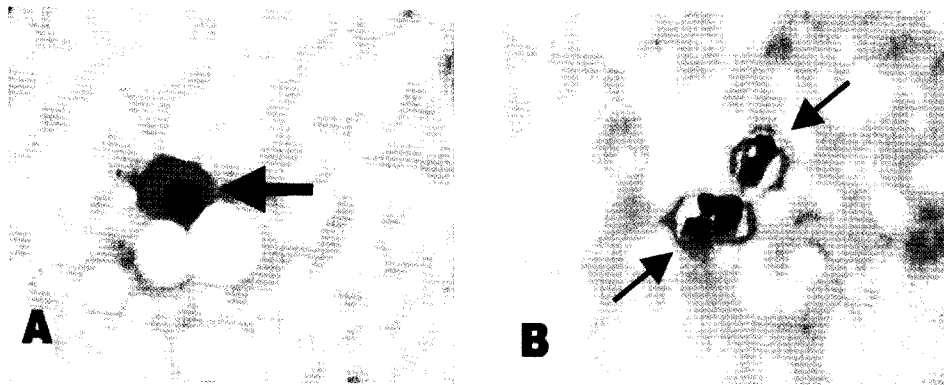


Fig 4. Cytological findings of somatic cells by Newman's staining method. A, epithelial cell (arrow), × 100; B, blood cells (small arrows), × 100.

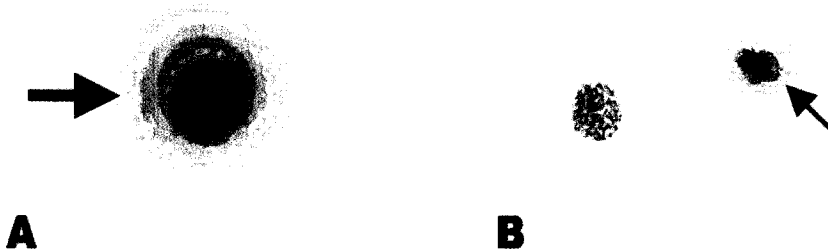


Fig 5. Cytological findings of somatic cells by Pyronin Y-methyl green staining method. A, epithelial cell (arrow), × 100; B, blood cells (small arrow), cytoplasmic particle (white arrow), × 100.

있었으나, 세포내 세포질과 CPS 염색성은 PYMG stain에서 배경과 뚜렷한 차이를 나타내고 있음을 확인하였다. 또한 체세포의 관독에 영향을 미치는 지방구의 경우 PYMG stain에서 지방구가 보이지 않아 눈의 피로도에 미치는 영향이 적었다.

한편 Romanowsky stain인 Wright's stain, Giemsa stain, Diff-Quik stain는 약간의 차이는 있지만, 일반적으로 염기성의 Azure B (methylene blue)는 DNA, RNA, 핵단백질, 호염기구 과립을 blue-violet이나 blue로, 호중구 과립은 light deep purple로 염색하고, 산성인 eosin이 호산구 과립을 red로 염색되어 혈구 세포를 명확히 구별 할 수 있는 것으로 알려졌지만(11) 젖염소 유즙에서는 배경과 세포질 그리고 CPS의 염색차가 뚜렷하지 않을 뿐 아니라, 배경, 핵, 그리고 세포질의 색상대비가 거의 없었다(Fig 1, 2, 3). 이런 현상은 혈액과 우유의 조성 차이 때문이라고 생각되어 진다. MB stain을 변형한 방법인 Newman's stain은 염기성 염색염료로서 DNA와 RNA를 blue로 염색함으로써 세포와 미생물을 구별 할 수 있다(6). 젖염소 유즙에 적용한 결과 배경과 세포질 그리고 CPS 염색차가 나타나지 않았지만 배경, 핵의 색상대비는 있어 보다 쉽게 구별 할 수 있었다(Fig 4). PYMG stain에서 핵은 black, 세포질은 red, 그리고 배경은 pink로 염색되어 보다 쉽게 CPS의 감별이 가능하다(13). 또한, PYMG stain에서는 다른 염색법과는 달리 N-Butyl alcohol과 xylene으로 처리하여 지방구가 많이 존재 하지 않았다(Fig 5). 그러나 이런 유기용제들은 인체에 유해하므로 안전관리 및 처리에 유의하여 한다(1).

이 연구에서 공시한 5가지 염색법에 대한 각각의 해상력 등급은 Table 3에 나타난 바와 같이 Wright's stain, Giemsa stain, Diff-Quik stain은 배경, 핵, 그리고 세포질의 염색차가 크게 나지 않았고 체세포의 핵과 세포질간의 해상력이 매우 떨어져서 상피 및 혈구세포 분류에서 해상력이 낮아 젖염소 유즙 염색방법으로는 적용이 불가능하다고 생각된다. 배경과 CPS 감별에서는 PYMG stain이 현미경 400배상에서도 명확한 감별이 가능하여 가장 우수하였지만 상피 및 혈구세포를 분류하기는 어려웠다. 이런 현상은 핵 속에 존재하는 chromosome을 blue-lavender 또는 blue-green하게 염색하고, 핵 속에 존재하는 nucleoli와 세포질과 핵 속에 동시 존재하는 RNA를 red로 염색되기 때문에 기인된 것으로 사료된다(13). 또한 PYMG stain은 소요 비용이 가장 높았으며(Table 3), 염색과정이 복잡하고 고정액(Carnoy's fixate 용액)도 다른 염색법에서 사용되는 고정액(methanol)과 호환이 불가능하여 따로 제조해야 하는 어려움이 있으며, 유즙 도말 후 하루정도 충분히 건조하지 않거나 PYMG 용액에 염색 후 완전히 건조하지 않으면 균질 도포된 재료가 N-Butyl alcohol과 xylene으로 씻어 낼 때 떨어져 나가는 것을 방지하기 위해 충분히 건조해야 하므로 검경까지의 시간이 오래 걸린다는 단점이 인정되었다.

한편 Quervel과 Trossat (14)은 젖염소 유즙에서 PYMG stain을 이용한 방법이 MB stain을 이용한 방법보다 총 체세포수가 적게 측정 되었다고 보고하였으며, Gonzalo 등(8)은

면양유즙에서는 MB stain이 May-grunwald-giemsa stain과 PYMG stain 보다 더 유효한 염색이라고 보고하고 있다.

이 연구에서 나타난 결과 Newman's stain은 상피 및 혈구 세포 분류가 현미경 1,000배상에서 명확한 감별이 가능하여 다른 4가지 염색법보다 해상력이 가장 우수하였으며 염색과정이 가장 간단하였고 염색시간도 가장 짧았을 뿐만 아니라 비용 또한 비교적 저렴하였다. 따라서 젖염소유의 체세포 검사법으로 염색시간, 상피세포와 혈구세포의 감별에서 가장 효율적인 Newman's stain이 적합할 것으로 사료되며 앞으로 젖염소유 유질 검사 및 유방염 진단에 효과적으로 적용 할 것으로 생각된다.

결론

2007년 4월에 전남지역 농장에서 사육되는 젖염소 40 분방의 CMT 음성 및 체세포 10만/ml 이하 유즙에서 체세포를 Wright's stain, Giemsa stain, Diff-Quik stain, Newman's stain, 그리고 Pyronin Y-Methyl Green stain을 포함한 총 5가지 염색법을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다. Newman's stain이 젖염소 유즙의 체세포 염색방법 중 경검시 혈액세포와 상피세포의 감별이 용이하고, 염색에 소요 되는 시간이 가장 짧았다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 전남대학교 동물의학연구소의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. 강성규, 이동배, 이영수. 유기용제의 위해도 평가 및 일부 유기용제의 생물학적 폭로지표. 충남대의잡지 1993; 20: 113-134.
2. 김혜라, 이정치, 정지영, 이윤경, 신성식, 이채용. 젖염소 분방유즙에서 체세포에 대한 연구. 한국수의임상학회지 2007; 24: 177-181.
3. 윤준철, 이정치, 김상기, 박영석, 김종택, 이정길, 이채용. 젖염소 분방유즙에서 분리한 세균 및 항균제 감수성조사. 대한수의학회지 2004; 44: 151-157.
4. 이삼열, 정운섭. 임상병리검사법. 3판. 서울: 연세대학교출판부. 1987: 102.
5. 함준상, 정석근, 인영민, 김동운, 김용곤, 김현욱. 영동군에서 생산된 자야넨 산양유의 특성. 한국축산식품학회 23차 학술발표 1999: 195.
6. Deitch AD. A method for the cytophotometric estimation of nucleic acids using methylene blue. J Histochem Cytochem. 1964; 12: 451-461.
7. Dulin AM, Paape MJ, Wergin WP. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. J Food Prot 1982; 45: 435-439.
8. Gonzalo C, Martinez JR, Carriedo JA, Primitivo FS. Fossomatic Cell-Counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. J Dairy Sci

- 2003; 86: 138-145.
9. Gurr E. A practical manual of medical and biological staining techniques. 2nd ed. New York: Interscience Publishers. 1956: 387-388.
 10. Haenlein GFW. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J Dairy Sci* 2001; 84: 2097-2115.
 11. Horobin RW, Walterl KJ. Understanding romanowsky staining. *Histochem Cell Biol* 1987; 86: 331-336.
 12. Jenness R. Composition and characteristics of goat milk. *J Dairy Sci* 1980; 63: 1605-1630.
 13. Kaufmann BP, Mcdonald M, Gay H. Enzymatic degradation of ribonucleoproteins of chromosomes, nucleoli and cytoplasm. *Nature* 1948; 162: 814.
 14. Ljutovac KR, Pirisi A, Cremoux RD and Gonzalo C. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. 2007; 68: 126-144.
 15. Maisi P. Analysis of physiological changes in caprine milk with CMT, NAGase and anti-trypsin. *Small Rumin Res* 1990; 3: 485-492.
 16. Paape MJ, Capuco AV. Cellular defense-mechanisms in the udder and lactation of goats. *J Anim Sci* 1997; 75: 556-565.
 17. Packard VS, Tatini S, Fugua R, Heady J, Gilman C. Direct microscopic methods for bacterial or somatic cells. In: *Standard methods for the examination of dairy products*, 16th ed. Washington DC: Marshall RT. 1992; 309?325.
 18. Sanchez A, Sierra D, Luengo C, Corrales JC, Morales CT, Contreras A, Gonzalo C. Influence of storage and preservation on fossomatic cell count and composition of goat milk. *J Dairy Sci* 2005; 88: 3095-3100.
 19. Schalm OW, Caroll ES, Jain NC. *Bovine mastitis*. 1st ed. Philadelphia: Lea and Fiebiger. 1971: 113-127.
 20. Selvi E, Manganelli S, Catenaccio M, Stefano RD, Frati E, Cucini S, Marcolongo R. Diff-Quik staining method for detection and identification of monosodium urate and calcium pyrophosphate crystals in synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 194-198.
 21. Wooding FB, Peaker PM, Linzell JL. Theories of milk secretion: Evidence from the electron microscopic examination of milk. *Nature* 1970; 226: 762-764.
 22. Young CC, Breed RS. The newman combined fat extraction, fixing and staining solution for use in the direct microscopic technic for coutig bacteria in milk. *Am J Public Health* 1929; 19: 99-100.