

최소 정액 동결을 위한 AndroMed와 Tris-egg Yolk 희석제의 동결성 비교

조상래*, 김성재, 손준규, 최신희, 최창용, 고응규, 이풍연, 김현중
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

Comparison of AndroMed and Tris-egg Yolk Extender for Cryopreservation of Korean Native Bull Semen (Chick Cow)

Sang-Rae Cho*, Sung-Jae Kim, Jun-kyu Son, Sun-Ho Choi, Changyong Choe,
Yeoung-Kyu Ko, Poongyeon Lee and Hyun-Jong Kim

Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the survival rate of AndroMed and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of Korean Native Bull Semen (Chick Cow). Semen was collected from a Korean Native Bull Semen over 3 year's old. The semen was diluted 1:1 by AndroMed and Tris-egg yolk extender. The pellet was diluted to final sperm concentration of 5×10^7 cell/ml by doubling in every 10 minutes at 4°C cold chamber. The semen was equilibrated for 1 hrs at cold chamber and packed to 0.5 ml straw. The semen straws were located above 5 cm of liquid nitrogen for 5 minutes. And then the frozen straw was plunged to LN2. The presented straws were examined the viability and motility after thawed at 37°C water bath. The survival rates was significantly higher ($p < 0.05$) in Tris-egg yolk extender than AndroMed extender (89.7 ± 19.8 vs. 73.4 ± 11.2). However, motility was no significant differences (78.4 ± 18.7 vs. 67.9 ± 14.6). Survival rate in time of equilibration between visual and CASA program had higher in 2 h (86.33 ± 9.4 vs. 92.32 ± 12.4) than in 5 h (78.20 ± 7.8 vs. 88.28 ± 13.1) 15 h (65.24 ± 6.6 vs. 76.48 ± 17.3) 20 h (56.26 ± 4.6 vs. 67.73 ± 18.4). The development rates to cleavage was higher in Tris-egg yolk extender than AndroMed extender (82.2% vs. 81.7%). Similarly, the development rates to blastocyst was significantly higher ($p < 0.05$) in Tris-egg yolk extender than AndroMed extender (42.3% vs. 29.6%). In conclusion, the obvious impact of this study will be its practical application to improve viability and fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa used for *in vitro* fertilization (IVF) and AI, Which in turn will be beneficial to animal genetic resources conservation.

(Key words : bovine, Korean Chick Cow, semen, cryopreservation, AndroMed)

서 론

인공수정은 우량한 유전 형질에 대한 평가를 실시하는데 중요한 기준으로 설정되어 있으며, 소, 돼지, 양 그리고 물소를 포함하는 다양한 가축종에서는 유전력을 개선하기 위해서 성공적으로 사용된다(Sukhato 등, 2001).

정액의 이용은 신선정액과 동결정액을 주로 사용하지만 우수한 종모우의 활용성 증대와 유전자원의 활용도 증대를 위해서는 동결정액을 널리 이용하고 있다. 동결정액의 사용목적은 주로 인공수정을 위함이며, 동결정액 보존을 위해서는 채취한 정액을 -196°C 액체질소에 침지한 상태로 보존하게 된다. 액체질소에 보관하는 방법은 반영구적으로 보관이 가능하다는 장점을 가지고 있다(Bolten 등, 2005). 정자를 포함하는 많은 세포들의 동결 후 생존율은 액체질소에 침지하기 전의

냉각 온도와 동결 속도 그리고 동결 방법에 따라라도 많은 영향을 미친다. 마찬가지로 동결 후의 용해 온도에 따라라도 생존율과 활력에도 영향을 준다(Watson 등, 1992; Gao 등, 1997; Leibo and Bradly, 1999). 현재 우리나라에서 흑우와 흰소는 희소 품종으로서 그 개체수도 1,000두 내·외인 것으로 알려져 있다. 이들 희소 품종에 대해서는 정액의 동결과 수정란 생산을 통한 증식 등의 다양한 형태의 연구 수행으로 우리나라 가축유전자원으로서 보존에 대한 필요성이 대두되고 있다. 왜냐하면 우리나라 고유한 국가유전자원으로서의 가치와 생물종 다양성의 확보를 통해서 세계적인 유전자원 보유국으로서 위치 선점이 필요하기 때문이다. 멸실 위험에 직면한 품종의 보존을 위해서 가장 많이 이용되는 방법은 인공수정을 이용한 개체의 증식방법이다. 인공수정은 정액의 동결 후 활력에 따라서 인공수정 여부를 평가하게 된다. 인공수정을 위한 정액

* Correspondence : E-mail : chosr@korea.kr

의 이용 방법으로는 액상정액의 이용과 동결정액으로 보존하는 방법이 있는데, 채취한 정액은 정액 회석제로 전처리를 실시한 후 -196°C 액체질소에 직접 침지로 보존하게 된다. 이렇게 하면 정액은 반영구적으로 보관이 가능하나(Bolten 등, 2005), 액상 정액 상태로 인공수정에 이용할 수 있는 기간은 축종과 품종에 따라 보존 기간은 다양하게 보고되고 있다(돼지, Johnson 등, 2000; 양, Salamon과 Maxwell, 2000; 소, Verberckmoes 등, 2005; 염소, Peterson 등, 2007).

일반적으로 가축 정액의 동결 보존을 위해서 주로 난황이나 정액 회석제를 사용한다(Watson 등, 1992). 정액을 보존하는 방법으로는 탈지유, Laiciphos[®], BTS, Biociphos Plus[®] 회석액(Paulenz 등, 2005)과 정장에 포함된 Egg yolk coagulating enzyme(EYCE) 같은 물질도 이용이 된다. 정장은 정액의 활력을 떨어뜨려 정액을 사출할 때 BSA가 정자막을 코팅함으로써 정자의 활력 유지에 영향을 준다고 보고하였다(Yamashiro 등, 2006). 본 연구에서는 레시틴을 기본 회석제로 하는 AndroMed와 Tris-egg yolk 회석제를 사용하여 최소 정액의 동결성을 조사함으로써 유전자원으로서의 안전한 보존과 이용 효율성 제고를 위해서 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 정액 채취

정액 채취로 사용된 쫄소는 3세의 수컷 1두를 선발하여 별도 공간에서 자유 급식하여 사육하였으며, 정액 채취는 인공질(Model 66000-D, Nasco, FHK, 일본)을 사용하여 채정하였다. 정액 채취를 위해서 암컷을 시험장내 안전정액 채취실 보정틀에 고정시킨 후, 수컷을 2~3회 암컷 주위를 맴돌게 하여 흥분을 유도하였다. 승가가 이루어지면 수컷의 penis를 인공질에 삽입하여 정액 채취를 하였다. 인공질의 온도는 38°C 로 유지하였으며, 인공질에는 penis의 삽입을 부드럽게 하기 위하여 젤리를 발랐다. 정액 회수를 위해서 인공질 끝부분에 15 ml 튜브를 정액을 채취하기에 앞서 연결하였다. 회수된 정액은 37°C 온장고에 넣어 신속하게 실험실로 이동하였다.

2. 정액 처리 및 제조

사출 정액은 채취 즉시 37°C 이동식 온장고에 넣어 10분 이내에 실험실로 운반하였다. 정액의 동결을 위해서 사용된 회석제로는 AndroMed(Minitüb, Tiefenbach, Germany; patent pending)와 Tris-egg yolk extender를 사용하였다.

Tris-egg yolk extender는 Tris 121.1 mM, fructose 180.2 mM, citric acid 294.1 mM, egg yolk 10%(v/v), glycerol 7%, gentamycin(Gibco)10 mg으로 조성된 회석제를 사용하였다. AndroMed 회석제를 이용한 정액의 동결 과정(Aires 등, 2003)은 원정액과 회석제를 1:1의 비율로 회석한 다음, 2차 회석은 콜드 챔

버 내에서 10분간 평형 후 7차까지 동일한 방법으로 평형을 유도한다. 마지막 7차 회석후 0.5 ml 스트로에 충전하기 전까지는 1시간 동안 평형을 실시한 다음, 0.5 ml 스트로에 최종 5×10^7 cell/ml 농도가 되게 하여 스트로 내에 충전한 다음 1시간 동안 콜드 챔버 내에서 평형을 실시하였다. Tris-egg yolk extender는 1차 회석 시는 동량을 회석한 후 5°C 콜드 챔버 내에서 14% Glycreol을 첨가한 다음 동결을 실시하였다. 김 등(2006)의 정액동결 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 정액 동결은 동결 스트로우에 정액을 충전한 다음 액체질소가 담긴 스티로폼 박스 상단 5 cm 높이에서 5분 동안 정액동결 스트로우를 냉각시킨 후 액체질소에 바로 침지하였다. 정액의 용해는 공기 중에 약 10초간 용해한 후 37°C 온수에서 20초간 스트로우를 침지하여 용해하였다.

3. 정자 생존성 및 운동성 평가

정액의 활력과 생존성의 평가는 MicroLux 현미경($\times 70$, Olympus, Japan)하에서 용해 정액을 MARKER CHAMBER에 넣은 후 정자를 평가하였다. 육안적 검사는 혈구 계산판에 $5 \mu\text{l}$ 의 정액을 넣고 커버글라스를 덮은 후 100배율에서 정자의 운동성을 평가하고 200배율에서 삼투압 충격이나 저온 충격으로 발생할 수 있는 정자 꼬리 꺾임 등의 기형 변화가 발생되었는지 확인하였다. 혈구 계산판의 격자 2군데를 반복적으로 관찰하여 생존 정자 비율을 퍼센트로 나타내었다. 관찰되는 거의 모든 정자들이 소용돌이 치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 정자들이 격자별로 100개 가량을 관찰하여 활발하게 움직이는 정자들이 80% 이상일 때 80%로, 70% 이상일 때 70% 등으로 보고, 50% 이하는 움직이는 정도가 전진 운동 혹은 느리게 전진 운동하는 수준이며, 20% 이하는 느리게 전진 운동하거나 진자 운동 혹은 미동하는 수준으로 평가하였다. 그리고 CASA(Computer-Aided Semen Analysis) 분석 장치를 이용한 정자의 생존성과 활력 평가를 위해 자동 분석 장치(SIAS, Medical Supply, 한국)를 이용하여 조사하였다. 동결 정액의 발생능 확인을 위해서 일반적인 체외수정란 생산은 조 등(2008)의 방법에 준하여 실시하였다.

4. 한우 난자의 체외성숙

한우 도축 암소로부터 적출된 난소를 회수하여 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다. 본 실험의 조건에 맞춘 난소 수송 온도는 0.9% 생리식염수의 온도를 25°C 이상의 조건으로 맞추어 보온병에 담아 실험실로 2시간 이내로 운반하였다. 직경이 2~6 mm의 난포로부터 난자를 난포액과 함께 19 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡입 방법으로 난자를 채취하였으며, 체외성숙을 위한 난자는 1.2 등급(IETS 기준)만을 사용하였다. 체외성숙은 TCMI99(Sigma, U.S.A)를 기본 배양액으로 5% FBS(Gibco, U.S.A), $10 \mu\text{g/ml}$ LH(Sigma, U.S.A)

및 35 µg/ml FSH(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 22시간 동안 실시하였다.

5. 체외수정

체외수정에 사용된 정액은 가축유전자원시험장에서 생산된 흑우동결정액을 이용하였고, 정자분리는 BO 배양액을 이용하였으며 1,800 rpm에서 5분 동안 2회 원심분리 후 체외수정용 배양액에서 1회 원심 분리하여 체외수정에 사용하였다. 사용된 정액의 최종 농도는 2 × 10⁶ /ml 이었다. 체외성숙된 난자의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 0.3% BSA(Bovine Serum Albumin)가 첨가된 D-PBS (Sigma) 배양액에서 약 5초간 vortexing 후 방사관층이 붙어있는 난자를 선별하여 수정 배양액인 IVF 100(IFP, Japan) 50 µl 미소적에 15개의 난자와 정자를 6시간 동안 공동 배양으로 체외수정을 유도하였다.

6. 수정란의 체외배양

체외수정 후 체외 배양을 위해서 CR1aa 배양액에 5% FBS를 첨가하여 체외배양을 실시하였다. 체외배양은 5% CO₂, 90% N₂ Incubator에서 체외발달을 유도하였으며, 배양 dish는 6-well(IFP, Japan) 50 µl 배양액에 15개의 수정란을 넣어 배양을 실시하였다. 수정란의 발달을 조사는 체외수정 후 48 시간에 도립현미경(IX 70, Olimpus)하에서 분할율을 조사하였으며, 72(3일) 시간과 120(5일) 시간에 신선한 배양액 약 25 µl를 각 well에 첨가하였으며, 배반포기까지의 발달을 조사는 수정 후 7일과 8일째 실시하였다.

7. 통계 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 SAS package(version 6,12) 이용과 GLM producer를 사용하여 각 처리구 간 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Table 1은 정액의 동결을 위해서 두 종류의 희석제제를 사용하여 동결 후의 생존율과 활력에 대한 조사를 실시하였다. 정액의 동결을 위한 정액의 희석제는 정액의 생존율에 중대한 영향을 미치는 요인으로 분석된다(Sansone 등, 2000) Table 1은 최소로 부터 인공질을 이용하여 채취한 정액을 상용화된 AndroMed 희석제(Fukui 등, 2008)와 Tris-egg yolk 희석제 사용하여 정액을 동결한 다음 생존율과 활력 결과를 CASA(Computer-Aided Semen Analysis) 시스템으로 분석하였다. AndroMed를 사용하였을 때 정자의 생존율은 73.4%, 활력은 67.9%의 결과를 나타내었으나, Tris-egg yolk 희석제는 생존율과 활력이 89.7%와 78.4%의 결과를 각각 나타내었다. 생존율은 Tris-egg yolk 희석제가 유의적으로 높은(p<0.05) 결과를 보인 것과

Table 1. A comparison of survival and motility between two different extender sources for freezing of Korean Native Bull Semen

Semen extender	Evaluation to sperm (%)	
	Survival	Motility
AndroMed	73.4 ± 11.2 ^a	67.9 ± 14.6
Tris-egg yolk	89.7 ± 19.8 ^b	78.4 ± 18.7

Replicate 6. Korean Native Bull Semen : Chick Cow.

^{a,b} Percentage with different superscripts within columns indicate significant different (p<0.05).

는 대조적으로 활력에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 사출된 신선 정액에 있어서 활력은 90% 이상의 상태를 유지하고 있었다. 컴퓨터에 의한 정액의 분석 시스템은 정액의 활력을 평가하기 위해서 지난 10년 동안 지속적으로 사용되고 있다.

Paulenz 등(2005)은 희석제 종류에 따른 실험 결과를 보고 하였다. 정액을 우유와 난황을 첨가한 희석액, sodium citrate에 난황을 첨가한 희석액, Tris, fructose, citric acid에 난황을 첨가하였을 때 정자의 활력이 다른 희석액들보다 좋은 것으로 보고하였고, Hollinshead 등(2003)은 유세포 분리기를 이용하여 암수 정자를 분리한 후 5°C로 액상 보존했을 때 고온 열처리된 우유가 Tris에 난황을 첨가한 희석액이나, Androhep나 TEST buffer에 난황을 첨가한 희석액보다 정자 보존 활력이 좋았다고 보고하였다. 우유나 난황에는 인지질들을 함유되어 있는데, 이 물질은 저온 충격으로부터 정자 세포막을 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다. 정장에는 난황을 응결시키는 효소가 있어 정액의 동결 보존을 위해서는 반드시 정장을 제거하여야 생존성의 저하를 막을 수 있다고 알려져 있다(Roca 등, 1997). 최근에는 AndroMed를 희석제로 사용하여 숫양의 정액을 동결 보존 후 인공수정을 실시하였을 때 57%의 산자 생산율을 보고하였는데, 이것은 일반적으로 난황이 첨가된 희석제를 이용한 것과 비교하였을 때 65%의 결과와 유사하게 나타났다고 보고하였다(김 등, 2006). Paulenz 등(2005)은 정액을 우유에 난황을 첨가한 희석액, sodium citrate에 난황을 첨가한 희석액, Tris, fructose, citric acid에 난황을 첨가하였을 때 정자의 활력이 다른 희석액들보다 좋은 것으로 보고하였고, Anel 등(2006)은 콩의 레시틴 성분이 함유된 AndroMed는 난황과 유사한 phospholipid를 함유하고 있어 인공수정에 안전하게 이용할 수 있다고 보고하기도 하였다. 그러나 본 실험의 결과와 비교할 때 난황을 직접 첨가한 것과 비교하였을 때 상대적으로 낮은 결과를 보이기도 하였다. 일반적으로 소의 정액 동결 보존을 위해서 사용하는 동결 보존액으로는 TriladylTM과 AndorMed[®] 상업적으로 판매되는 합성 동결 보존액으로 소의 동결 보존을 위해 개발되었으며, 최근에는 양(Perez-Garnelo

등, 2005; Perez-Garnelo 등, 2006; Kasimanickam 등, 2007), 가젤(Garde 등, 2003), 유럽 들소(Perez-Garnelo 등, 2006), 사슴(Esteso 등, 2003) 등 다른 축종이나 멸종 동물의 정액 동결 보존에 활발히 활용되고 있다. 상업적으로 판매되는 제품의 특성상 희석제의 조성은 정확하게 알려져 있지 않으나, 동해 방지를 위해 비침투성 동해 방지제로 lactose가 들어 있으며, 침투성 동해 방지제로 glycerol이 첨가되어 있다. 최소와 흑우의 정액 동결을 위해서 희석제에 대한 검토는 더 많은 연구를 수행할 필요가 있을 것으로 사료된다.

Table 2에서는 최소의 정액을 Tris-egg yolk 희석제를 첨가하여 평형 시간에 따른 활력의 평가를 육안적 평가와 CASA 프로그램으로 구분하여 정액의 활력을 조사한 결과이다. 평형시간을 4가지 시간대로 구분하여 평가하였다. 현재의 결과에서 알 수 있듯이 육안 검사와 CASA 방법에 대한 분석에서 시간이 경과될수록 활력이 감소하는 경향을 보이고 있다. 그러나 육안적 평가와 CASA 평가에 대한 결과에서 두 방법 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 평형 2시간제는 육안적 검사에서는 86.14%였으나, CASA 프로그램 분석에서는 92.32%로 나타났다. 원정액을 채취한 후 활력 평가는 90% 이상의 결과를 보였다. 그러나 5시간이 경과하였을 때는 약 80% 수준의 활력을 보였고, 15시간이 경과하였을 때는 65~75% 범위의 활력을 보였으며, 20시간이 경과하였을 때는 56~76%의 결과를 보여 2시간 경과 시와 비교하였을 때보다 약 30% 수준의 차이를 보였다. 이러한 결과를 볼 때 희석제를 첨가한 후 시간이 경과하였을 때 온도 충격으로 인한 정자의 활력이 감소하는 것으로 보여 정액 희석 처리는 2시간 이내에 완료해야 할 것으로 사료된다. De Pauw 등(2003)은 소의 정액을 Triladyl® 희석액에 20% 난황과 6.7%의 글리세롤을 첨가하여 6일간 상온과 4°C에서 보존하였을 때 정자 운동성이 유지된 반면, Hapes-TALP에서는 급격하게 운동성이 저하되었다는 결과를 보고하기도 하였다. 이와는 반대로 James와 Graham(2001)은 각기 다른 4마리의 수컷의 성감별 동결정액을 용해하였을 때 육안적 평가와 CASA 프로그램의 활력 평가 결과로서 제일 높은 개체에서는 40%와 49%, 제일 낮은 개체는 15%와 28%로 보고하여 본 연구의 결과와 비교했을 때 상당한 차이가 있음을 알 수 있으나,

Table 2. A comparison of sperm motility from various equilibration conditions for freezing of Korean Native Bull Semen

Motility	Equilibration condition (% , mean ± S.E)			
	2 h	5 h	15 h	20 h
Visual	86.33 ± 9.4	78.20 ± 7.8	65.24 ± 6.6	56.26 ± 4.6
CASA	92.32 ± 12.4	88.28 ± 13.1	76.48 ± 17.3	67.73 ± 18.4

Replicates 4. Korean Native Bull Semen : Chick Cow.

이러한 차이는 정자의 성 감별 시 유세포 분석기에 의한 손상으로 보여진다. 이 결과에서도 육안적 평가와 CASA 프로그램을 이용한 결과의 차이는 약 10% 내외로서, 본 연구 결과와 유사함을 알 수 있었다. 한편, Yamashiro 등(2006)은 염소의 정액 동결을 위해서 희석제 종류에 BSA(bovine serum albumin)를 첨가하였을 때 동결성이 강화되었다고 보고하였다. 이러한 원인은 종간의 특이적인 생리적 현상과 변이 때문인 것으로 추정할 수 있을 것으로 보인다. 정액을 동결할 때 일반적인 사실은 동결에 앞서 동결 보호제에 노출시키는 시간은 용해 후의 정액의 특성에 영향을 준다. 그리고 정액을 동결 시 액체질소를 이용한 동결 방법에 따라라도 생존성은 차이가 발생하며, 액체질소의 상단 끝에서 정액 스트로를 올려놓는 높이와 시간에 따라서 생존성과 용해 후 활력의 차이를 보이는 것으로 사료된다.

Table 3은 한우 난자와 서로 다른 희석제로 동결된 최소의 동결 정액을 사용하여 체외수정을 유도한 후 체외발달율을 조사한 결과이다. 수정후 난자의 배양액 교환은 수정 후 72시간째와 120시간째 신선한 배양액으로 교환하여 체외 발달을 유도하였다(조 등, 2008). 체외수정 후 48시간째 난자가 이등분으로 균일하게 분할된 것을 수정이 된 것으로 평가하였다. 분할율 결과에서 AndroMed 희석제를 사용한 정액의 분할율은 81.7%, Tris-egg yolk를 이용한 동결정액은 82.2%의 결과를 보였고, 배반포 발달은 이등분으로 분할된 수정란 중에서 초기 배반포 이상 발달한 수정란으로 평가하였다. 배반포 발달율의 결과에서도 비슷한 경향을 보였다. AndroMed 희석제에서는 39.7%, Tris-egg yolk에서는 42.3%의 결과를 보였다. 본 실험의 결과에서 보듯이 난황을 이용하였을 때가 다소 높은 경향을 보였다. 그러나 정액의 희석제에 스테로이드 호르몬과 그 전구 물질이 함유된 난황이 포함되면 위생적 위험이 생기게 된다(Hartman 등, 1998). 또한 표준화된 희석제의 질이 떨어질 때 난황을 첨가하여 정액의 손상을 방지하기도 한다(Müller-Schlösser, 2001). 희석제의 종류를 선택하는 것도 정액 동결 보존을 위해서는 중요한 요인이다. 이것은 축종에 따라라도 다소 차

Table 3. Cleavage and embryo development rates obtained with different frozen semen extender in Korean Native bull Semen

Extender	Used oocytes	To developmental competence (%)	
		Cleavage	Blastocysts
AndroMed	120	98 (81.7)	29 (29.6) ^a
Tris-egg yolk	118	97 (82.2)	41 (42.3) ^b

Replicates 7. Korean Native Bull Semen : Chick Cow.

^{a,b} Percentage with different superscripts within columns indicate significant different ($p < 0.05$).

이가 있을 수 있기 때문이다. 인공수정이나 수정란이식을 위해서 정액을 사용하였을 때 수태율과 수정란 생산성 저하를 가져오는 원인이 되기도 한다. 현재의 결과를 보았을 때 최소 한우측 최소와 흑우의 정액 동결 보존 시 AndroMed보다는 Tris-egg yolk 희석제를 사용하는 것이 더 효과적인 방법일 것으로 사료된다. 하지만 흑우를 비롯한 개체의 수를 증가시켜 비교 실험을 수행해야 할 것으로 보인다. 정액의 성공적인 동결 보존은 수정율과 태아의 생산에 중요한 영향을 미칠 것이다. 정액의 동결에 따라서 수정 능력에 차이를 주는 침체 반응 여부가 결정되기 때문이다. 정액 동결 시에 침체의 손상은 수정율에 치명적일 수 있기 때문이다. 물론 체외배양을 위한 배양액 조건도 체외수정란 생산을 위해서는 중요한 사안이 될 수도 있기 때문이다(Camous 등, 1984; Rosenkrans와 Frist, 1994). James와 Graham(2001)는 유세포 분석기로 성 감별된 정액을 사용하여 육안적 검사와 CASA 프로그램을 이용한 정자의 활력 조사에서도 알 수 있듯이 수컷 4개체에서 제일 높은 활력을 가진 개체가 정자 침체 반응 조사에서도 정상적인 침체 반응을 지닌 정자가 67% 그리고 제일 낮은 활력을 지닌 개체에서는 28%의 침체 반응을 보였다. 따라서 육안적 또는 CASA 프로그램에서 높은 성적을 보인 개체가 수정 능력도 향상이 될 것으로 예측되었으며, 본 연구에서도 Table 2에서 정액 희석제별 비교에서 Tris-egg yolk 희석제가 AndroMed보다 높은 활력의 결과를 보였고, Table 3에서도 Tris-egg yolk 희석제로 동결된 정액을 이용하였을 때 높은 배반포 생산율을 보인 것과 일치하는 결과를 알 수 있었다. 체외수정 후 분할율에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 배반포 생산에서는 Tris-egg yolk 희석제가 유의적으로($p < 0.05$) 높은 결과를 보였다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 Tris-egg yolk 희석제가 정액의 동결 시 정자의 침체 손상을 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

최소 한우인 최소의 정액 동결을 위해서 레시딘을 기본 희석제로 하는 AndroMed와 Tris-egg yolk extender를 사용하여 정자의 생존율과 활력 조사를 위해서 본 연구를 수행하였다. AndroMed 희석제를 사용하였을 때 생존율과 활력은 $73.4 \pm 11.2\%$ 와 $67.9 \pm 14.6\%$ 의 결과를 보였다. 그리고 Tris-egg yolk extender의 경우는 각각 $89.7 \pm 19.8\%$ 와 $78.4 \pm 18.7\%$ 결과를 보여 생존율에서는 Tris-egg yolk 희석제가 AndroMed 희석제를 사용하였을 때보다 유의적으로($p < 0.05$) 높은 결과를 보였다. 그러나 활력에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 Tris-egg yolk 희석제에서 높은 경향을 보였다. 정액의 동결을 위해서 평형 시간에 따른 정자의 활력 조사를 위해서 육안적 방법과 CASA 프로그램 방법으로 조사를 실시한 결과, 처음 2시간부터 20시간까지 평형을 유도한 결과 육안적 방법보다는 CASA 프로그램

분석 방법의 결과 높은 수치를 확인할 수 있었다. AndroMed와 Tris-egg yolk extender 두 종류의 희석제로 사용된 동결 정액 사용으로 체외수정란을 생산 결과로서 분할율은 유의적인 차이를 보이지 않았으나($81.7\% \text{ vs. } 82.2$), 배반포 발달율에서는 $29.6\% \text{ vs. } 42.3\%$ 로서 Tris-egg yolk 희석제를 사용하였을 때 유의적으로($p < 0.05$) 높은 발달율을 보였다. 이러한 결과를 볼 때 최소 한우 품종인 최소 정액 동결을 위해서 Tris-egg yolk 희석제 사용이 동결된 정자의 생존율과 수정 능력 개선으로 실제적인 인공수정과 체외수정란 생산 및 가축유전자원 보존을 위해서도 효과적일 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aires VA, Hinsch KD, Schloesser M, Bongner K, Schlosser SM and Hinsch E. 2003. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60:269-279.
- Anel L, Alvarez M, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Anel E and de Paz P. 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reprod. Dom. Anim.* 41:30-42.
- Bolten M, Weissbach L and Kaden R. 2005. Cryopreserved human sperm deposits: Usability after decades of storage. *Urologie A.* 44:904-908.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W and Menezo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicle. *J. Reprod. Fert.* 72:479-485.
- De Pauw IMC, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S and de Kruif A. 2003. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of *in vitro* stored bovine spermatozoa. *Theriogenology* 59:1109-1122.
- Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ and Garde JJ. 2003. Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *Cryo. Letters.* 24: 261-268.
- Gao D, Mazur P and Crister JK. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow, AM., Crister JK.(Eds.), *Reproductive Tissue Bankang*, Academic Press, San Diego, pp. 263-328.
- Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M and Roldan ERS. 2003. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorh* and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.* 69:602-611.
- Hartmann S, Lacorn M, Steinhardt H. 1998. Natural occurrence

- of steroid hormones in food. *Food. Chem.* 62:7-20.
- Hollinshead FK, O'Brien JK, Gillan L, Meyers M, Maxwell WMC and Evans G. 2003. Liquid storage of flow cytometrically sorted ram spermatozoa. *Theriogenology* 62:587-605.
- James K and Graham. 2001. Assessment of sperm quality: A flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.* 68:239-247.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:143-172.
- Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer KD and Dascanio JJ. 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4°C. *Anim. Reprod. Sci.* 101:60-73.
- Leibo SP and Bradley L. 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon. C. (Ed.), *The Male Gamete: Basic Science to Clinical Applications*, Cache Raven Press, Vienna, pp. 501-516.
- Müller-Schlösser F, Aires V, Hinsch E and Hinsch K-D. 2001. Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk-free semen diluters for cryopreservation of bovine semen. 34. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Giessen 2001:54.
- Paulenz H, Soltun K, Adnoy T, Berg KA and Soderquist L. 2005. Effect of different extender on sperm viability of buck semen stored at room temperature. *Small Ruminant Research* 59:89-94.
- Perez-Garnelo SS, Borque C, Madrid-Bury N, Delclaux M, Talavera C, Martinez E, Palasz AT and De La Fuente J. 2005. Basic characteristics and cryobanking of barbary sheep (*Amotragus lervia*) semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 17:249-250.
- Perez-Garnelo SS, Oter M, Borque C, Talavera C, Delclaux M, Martinez-Nevado E, Palasz AT and De la Fuente J. 2006. Post-thaw viability of european bison (*Bison bonasus*) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous *in vitro* fertilization assay. *J. Zoo. Wildl. Med.* 37:116-125.
- Peterson K, Kappen MAPM, Ursem PJF, Nothling JO, Colenbrander B and Gadella BM. 2007. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology* 67:863-871.
- Roca J, Carrizosa JA, Campos I, Laufuente A, Vazquez JM and Martinez E. 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research* 25:147-153.
- Rosenkrans CF Jr and First NL. 1994. Effect of free amino acid and vitamin on cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 72:434-437.
- Salamon S and Maxwell WM. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:77-111.
- Sansone G, Nastro MJF and Fabbrocini A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:55-76.
- Sukhato P, Thongsodseang S, Utha A and Songsasen N. 2001. Effect of cooling and warming condition on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 67:69-77.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J and de Kruif A. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology* 63:912-922.
- Watson PF, Crister JK and Mazur P. 1992. Sperm preservation: fundamental cryobiology and practical implication. In Templeton, AA, Drife JO.(Eds.), *Infertility* Springer London, pp. 102-114.
- Yamashiro H, Wang H, Yamashita Y, Kumamoto K and Terada T. 2006. Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). *J. Reprod. Dev.* 52:407-414.
- 김현종, 최창용, 최선호, 손동수, 최순호, 상병돈, 한만희, 류일선, 김인철, 김일화, 임경순, 김성재, 조상래. 2006. 희석액의 종류가 재래 흑염소 액상 정액의 생존율에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 21:339-344.
- 조상래, 최창용, 김현종, 최선호, 손동수. 2008. 한우 수정란의 동결 보존 후 발달 효율 비교. *한국수정란이식학회지* 23:223-227.