

닭 정액 동결 시 동결 보호제가 정액 성상에 미치는 영향

최진석¹ · 신단비¹ · 고응규¹ · 도윤정¹ · 변미정¹ · 박수봉¹ · 성환후¹ · 김 현¹ · 공일근² · 김성우^{1†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²경상대학교 축산학과

Effects of Kinds of Cryoprotectants on the Characteristics of Frozen Fowl Semen

Jin Seok Choi¹, Dan-Bi Shin¹, Yeoung-Gyu Ko¹, Yoon-Jung Do¹, Mijeong Byun¹, Soo-Bong Park,
Hwan-Hoo Seong¹, Hyun Kim¹, Il-Keun Kong², Sung Woo Kim^{1†}

¹Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

²Department of Animal Science, Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science, Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT The purpose of this study was to evaluate the sperm viability, normal acrosome and mitochondrial activity in the frozen-thawed fowl semen by different cryoprotectants. The experiment was carried out on 10 sexually adult roosters of Ogye. The semen was collected twice a week and pooled semen was diluted 1:1 EK extender containing no cryoprotectant at 5°C. After equilibration for 30 minutes, diluted chicken semen was diluted 1:1 extender containing either 7% dimethylacetamide (DMA), 7% dimethylformamide (DMF) or 7.5% methylacetamide (MA) at final concentration and was put in 0.5 mL plastic straws and frozen for 30 minutes by exposure to liquid nitrogen vapor 4 cm above the surface of liquid nitrogen, followed by plunging into liquid nitrogen. Frozen semen was thawed in water bath at 5°C for 2 minutes. For cytometric analysis, the frozen-thawed semen was diluted with EK extender to a final concentration of 90 million spermatozoa per mL. Sperm membrane integrity was evaluated as SYBR-14 and propidium iodide (PI). Acrosome integrity was assessed with fluorescein isothiocyanate-labeled PSA and PI. The percentage of mitochondrial function was estimated by using Rhodamine123 (R123) and PI. In conclusion, freezing rooster semen by using 7% DMF as cryoprotectant was significantly highest in rates of survival and mitochondrial function while its rate of damage of acrosome was significantly lowest. As a result, DMF is the cryoprotectant that has the lowest influences on sperm membranes and acrosome integrity. Therefore it could be used for freezing method of animal genetic conservation method for poultry diversity.

(Key words : semen, FACS, Dimethylacetamide, Dimethylformamide, N-Methylacetamide)

서 론

최근 들어 유전자원이 국가적인 자산으로 인식되면서 세계적으로 생물 다양성의 보존 및 유전자원의 이용문제가 크게 대두되고 있다. 특히, 국가 간 유전자원에 대한 접근과 지식재산권 같은 이익 공유 문제가 야기되면서 선진국과 개발도상국 간 유전자원에 대한 소유권 분쟁이 시작되었고, 지난 2010년에는 생물다양성협약(CBD) “나고야 의정서”의 채택으로 유전자원 확보를 위한 선점 경쟁이 더욱 심화되고 있다. 그러므로 유전자원의 발굴 및 보존을 통한 자원 주권을 국제적으로 강화할 필요성이 커지고 있다. 유전자원은

현재 실질적 이용 가치뿐만 아니라, 미래의 잠재적 가치까지 포함하고 있어 매우 중요하며 유전자원의 다양성 보존은 축산업 발전에도 반드시 필요한 요소이다. 그러나 닭을 포함한 가금류에서는 조류 인플루엔자 등 악성 질병의 발생 및 지구 온난화로 인한 기온상승과 강수량의 변화, 기상 이변 같은 문제로 인하여 다양성 감축이 급격히 이뤄지고 있다. 또한 대량 생산, 대량 공급과 같은 가축 가금사육의 산업화 결과, 소수의 다국적 기업에 품종이 독점되면서, 생산능력이 떨어지는 소규모 재래품종이 다국적 기업에 개발된 소수의 개량품종 또는 합성종으로 대체되어 감소를 더욱 가속화 시키고 있다. 이러한 조류 악성 질병과 다양한 환경 변화에 의한 다양

[†] To whom correspondence should be addressed : sungwoo@korea.kr

성 감소에 대비해 가금 유전자원을 영구 보존할 필요가 있다.

생식세포의 동결보존은 가금 산업 및 유전자원 보존을 위한 유용한 방법으로 이용되고 있으며, 정액의 동결보존 기술의 시작은 glycerol이 닭 정자의 동결보존에 효과가 있다는 사실을 입증하면서 세포 동결에 관한 과학적 접근이 가장 먼저 시도되었다(Polge et al., 1949). Glycerol은 포유류 정액동결에서 가장 많이 사용되는 동결 보호제로서, 다른 동결 보호제에 비해 독성이 낮고 정자 생존율이 높다(Chalah et al., 1999; Tselutin et al., 1999) 포유류뿐만 아니라, 가금 정액 동결에서도 널리 사용된 보고가 있다(Watanabe and Terada, 1976; Lake et al., 1981; Seigneurin and Blesbois, 1995; Gill et al., 1996; Purdy et al., 2009). 그러나 닭에 있어서 glycerol의 사용은 수정 능력을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 인공수정 전 정액의 glycerol 농도가 2% 이상일 경우 수정률이 급격히 떨어지는 현상이 많은 연구자에 의하여 보고하였다(Allen and Bobr, 1955; Clark and Shaffner, 1960; Neville et al., 1971; Sexton, 1973). 특히 닭에서 glycerol을 이용하여 동결정액을 활용할 경우, 용해 후 glycerol의 농도를 2% 이하로 낮추기 위하여 다양한 방법을 적용하고 있으며(Long and Kulkarni, 2004; Phillips et al. 1996), 용해 후 닭 정자에 대한 물리적 처리 방법은 정액의 품질을 떨어트리는 직접적인 요인으로 작용하기 때문에 비 글리세롤성 동결 보호제인 dimethylformamide(DMF)와 dimethylacetamide(DMA)를 동결 전 6~8%로 최종 희석하여 이러한 문제점을 해결하는 연구가 진행되었다(Lake and Ravie, 1984; Schramm, 1991; Tereshchenko, 1988; Tselutin et al., 1999). 특히 최근 연구에서는 7.5%의 N-methylacetamide(MA)를 동결 보호제로 사용하여 닭의 수정률을 향상시켰다는 연구 결과(Hanzawa et al., 2010; Sasaki et al., 2010; 최진석 등, 2012)가 보고되고 있다.

동결보존은 정자에 유해한 영향을 미치며, 미토콘드리아와 침체 부위의 구조적 손상(Harris et al., 1973; Xia et al., 1988)과 세포막 투과성 변화를 야기하는 것으로 보고되었다(Blesbois et al., 2005). 유세포분석기(fluorescence activated cell sorting : FACS)는 주로 면역세포와 박테리아와 같은 부유세포의 물리·생화학적 특징을 판별하고, 각 세포의 동정 및 분리를 위하여 개발되었으나, 닭 정자의 구조적 손상과 생화학적 변화도 및 물리적 특성을 관찰하는 방법으로 닭 정자 특성을 더 자세히 평가하는데 이용할 수 있는 것으로 보고되었다(Graham et al., 1990). FACS는 형광색소나 형광 probe에 의해 발견될 수 있는 정자의 세포 수, 모양, 구조적 변화와 기능적 특성분석을 실시할 수 있어 짧은 시간 안에

많은 수의 세포를 객관적으로 판단할 수 있으므로 포유류의 정액 판단에 많이 이용되어 왔으며, 최근 가금 정액의 평가에도 응용되기 시작하였다(Patryka et al., 2010). 동결정액의 품질 평가에서 용해 후 살아서 움직이는 정자는 온도와 시간 및 배양액의 영향을 많이 받기 때문에 생리적 특성상 짧은 시간 안에 분석하는 것이 필수적이며, 많은 수의 정자에 관한 자료를 정량화하고 분석하는 것은 자료의 신뢰도를 높일 수 있다. 이러한 요건을 충족시키는 FACS 분석법은 조류 정자의 정량적 분석에 있어서 그 중요도가 높아지고 있으며, 다양한 방법으로 활용되고 있다(Gillan et al., 2005). 죽은 정자의 막 투과성이 없어지는 현상을 이용하여 동결정자의 용해 후 생존율을 평가하고 있으며, 정자의 생사평가에는 SYBR-14와 PI을 주로 이용하는 생사염색법이 확립되어 있다(Garner and Johnson, 1995; Donoghue et al., 1996; Christensen et al., 2004). 전자는 세포 사망이 일어나 세포막의 투과성이 떨어지게 되어 DNA와 결합된 형태가 유리되어 형광이 소실되는 특성을 보유하며 살아있는 정자만을 염색하여 녹색 형광 반응을 나타내며, 후자는 죽은 세포에서 막 투과성이 낮아지면 세포막을 쉽게 침투하여 염색되어 죽은 세포만을 염색되는 특성을 보유하여 적색 형광 반응을 나타낸다. 정자 침체의 이상 유무를 판단하는 방법은 정자의 수정 능력을 추정하는 방법으로 PNA(peanut agglutinin)나 PSA(pisum sativum agglutinin)와 같은 lectin 이 형광시약에 결합된 물질을 주로 활용하고 있다. 이는 당 서열 차이에 따라 단백질에 특이적으로 결합하는 lectin 류의 특성을 활용하여 정량화하고 있으며(Patryka et al., 2010), 동결 과정에서 살아남은 정자의 두부 손상 여부를 판단하는 근거로 활용되고 있다. 미토콘드리아 활성도 분석은 닭의 정자에 있어서 활성도를 짐작하게 하는 자료로 이용되고 있으며, Rhodamine123과 같이 정자의 이중막에서 탈분극이 유지될 때 미토콘드리아의 내막에 축적되는 성격을 가진 시약을 주로 FACS 분석에 활용하고 있다(Graham, 2001).

본 연구에서는 DMA, DMF 및 MA를 동결 보호제로 사용하여 동결 보존한 닭 정액에 관하여 용해 후 상술된 기법을 활용하여 정자 생존율, 정상 침체를, 미토콘드리아 활성도를 비교하였으며, 가금 유전자원의 효율적 보존 방법에 적합한 동결 보호제를 선발하는 기초 자료로 활용하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

공시축은 국립축산과학원 가축유전자원시험장에서 보존 중인 연산오계 수탉 10수를 정액 채취용으로 사용하였다.

2. 정액 채취

정액 채취는 마사지 채취법(Burrows and Quinn, 1935)의 변형인 횡취법(side collection)으로 주 2회 채취하였으며, 눈금이 있는 15 mL 튜브(Becton Dickinson, USA)를 이용하여 정액의 부피를 정량하였다. 채취된 정액은 5°C 보온병에 담아 신속하게 실험실로 운반하였다.

3. 정액의 처리 및 제조

본 실험에서는 닭 정액은 EK 희석액을 이용하여 희석하였으며, 그 조성은 Table 1과 같다. 운반된 정액은 5°C 하에서 동결 보호제가 첨가되지 않은 EK 희석액으로 1:1 비율로 희석 후 30분간 평형시간을 가졌다. 희석된 정액은 1:1 동일 비율로 동결 보호제의 최종농도가 DMA, DMF는 7%, MA는 7.5%가 되도록 희석하였다. 희석된 정액은 0.5 mL straws(FHK, Japan)를 사용하여 충전하였고, 동결방법으로 액체질소 상면 4 cm에서 30분간 동결 후 -196°C 액체 질소에 침지하였다.

4. 정자의 생존율의 검사(SYBR-14/PI Staining)

실험군별 생존율 검사는 SYBR-14와 PI(Live/Dead sperm viability Kit, Invitrogen, USA) 이중형광 Probe를 이용하여 EK 희석액에 최종농도 90×10⁶/mL로 희석된 400 µL 정액에 DMSO를 이용하였다. 20 µM 농도로 조정된 SYBR-14 5 µL를 첨가하여 실온의 밀실에서 5분간 배양하고, 2.4 mM 농도

의 PI 5 µL를 첨가하여 다시 5분간 배양한 후에 유세포 분석기(BD FACS AriaII, USA)로 형광의 발현차를 분석하였다.

5. 정자의 정상 침체율 검사(FITC-PSA/PI Staining)

침체 손상 검사는 Fluorescein isothiocyanate-labeled PSA (FITC-PSA; Lectin from Pisum sativum, Sigma, USA)와 PI 형광염색을 이용한 이중염색 방법을 이용하여 FACS로 형광 발현도를 분석하였다. EK 희석액으로 90×10⁶/mL로 희석된 500 µL 정액에 0.1 mg/mL 농도로 FITC-PSA 20 µL/PBS를 첨가하여 실온의 밀실에서 5분간 배양하여 닭 정자의 침체를 염색하였다. 염색된 정자는 500 g에 3분간 원심 분리하여 회수하였고, EK 희석액 500 µL를 첨가하고, PI 염색을 실시하고, FACS로 분석하였다.

6. 정자의 미토콘드리아 활성도 검사(Rhodamine123/PI Staining)

미토콘드리아 활성도 검사는 Rhodamine123(R123, Sigma, USA)와 PI 형광 염색을 이용한 이중염색 방법을 이용하여 FACS로 형광의 발현차를 분석하였다. EK 희석액으로 90×10⁶/mL로 희석된 500 µL 정액에 methanol을 이용하여 1 mg/mL로 희석된 R123 stock solution을 증류수를 이용하였다. 0.1 mg/mL로 희석한 R123 5 µL를 첨가하여 실온의 밀실에서 20분간 배양하고, 500 g에 3분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 뒤 EK 희석액 500 µL를 점적하여 재 부유하였다. 여기에 PI 염색을 실시하고, 다시 5분간 배양한 후에 FACS로 분석하였다.

7. 통계처리

통계 분석은 통계분석프로그램(SPSS version 18.0)을 이용하여 일원분산분석(ANOVA) 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test 방법을 이용하여 검정하였다.

Table 1. Composition of EK extender

Components	Amount(g)
Sodium glutamate	1.4
Potassium citrate	0.14
Glucose	0.7
D-Fructose	0.2
Inositol	0.7
Polyvinylpyrrolidone	0.1
Protamine sulfate	0.02
Anhydrous sodium hydrogen phosphate	0.98
Anhydrous sodium dihydrogen phosphate	0.21
Distilled water	Up to 100 mL

결 과

1. 동결 보호제에 따른 정자 생존율 평가

정자의 생존율은 SYBR-14와 PI 형광 염색 후 FACS를 이용하여 형광발현 분포로 조사하였다(Fig. 1). SYBR-14 대 PI의 형광 발현은 2차원적 dot plots으로 표현되었으며, 4가지 집단으로 나누어 분석하였다. PI-SYBR- population은 염색이 되지 않은 것을 나타내며, DNA를 포함하지 않는 debris로 간주 되었다. PI-SYBR+ population은 PI 적색 형광이 발현되지 않았고, SYBR의 녹색 형광만 발현하는 cells로 정자

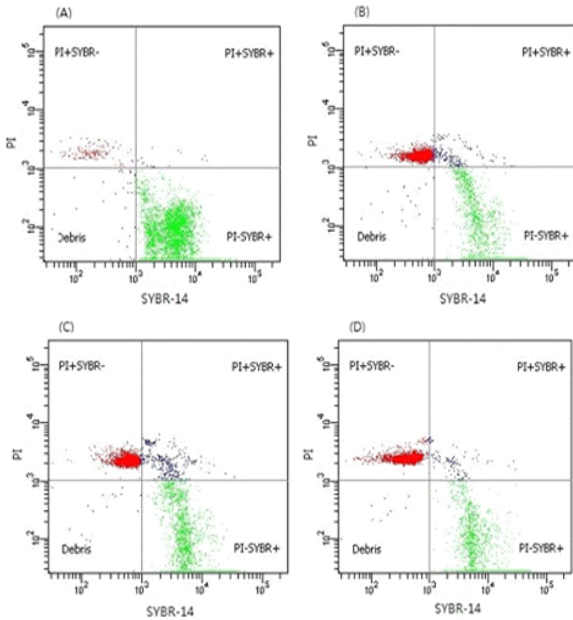


Fig. 1. FACS analysis on sperm membrane integrity of chicken spermatozoa stained with SYBR-14 and PI. PI-SYBR- quadrant contains debris, PI-SYBR+ quadrant contains live spermatozoa, PI+SYBR- quadrant contains dead spermatozoa and PI+SYBR+ quadrant contains dying spermatozoa. (A) fresh semen, (B) frozen-thawed with dimethylacetamide (DMA), (C) frozen-thawed with dimethylformamide (DMF), (D) frozen-thawed with methylacetamide (MA)

원형질막이 손상되지 않음을 나타내었다. PI+SYBR- population은 적색 형광만 발현되고, 녹색형광은 발현되지 않는 죽은 cells을 나타냈으며, PI+SYBR+ population은 PI와 SYBR의 염색이 둘 다 이루어진 경우로 죽어가는 세포군으로 분석하였다. 동결 보호제에 따른 정자 생존율의 결과는 Table 2와 같다. 동결 보호제로 DMF를 사용하여 동결 융해한 정자의 생존율(PI-SYBR+ population)은 $52.1 \pm 5.52\%$ 로 가장 높았으며, DMA는 $46.94 \pm 5.06\%$, MA는 $36.56 \pm 4.66\%$ 순으로 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 죽은 정자의 비율(PI+SYBR- population)은 DMF $45.43 \pm 5.72\%$ 와 DMA $49.27 \pm$

4.98% 는 유의적 차이가 없었으나, MA 처리군은 다른 동결 보호제에 비해 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 죽어가는 정자의 비율(PI+SYBR+ population)은 DMA와 MA는 유의적 차이가 없었으나, DMF는 유의적으로 낮았다($p < 0.05$).

2. 정자의 정상 침체율 평가

동결 보호제에 의하여 닭 정액의 동결 및 융해과정에서 나타날 수 있는 정상 침체율을 관찰하기 위하여 FITC-PSA와 PI 염색 후 FACS를 이용하여 정자세포를 분석하였으며(Fig. 2), 그 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서와 같이 침체막이 온전한 생존 정자의 비율(PSA-PI- population)은 DMF를 이용하여 동결한 정액이 $53.84 \pm$

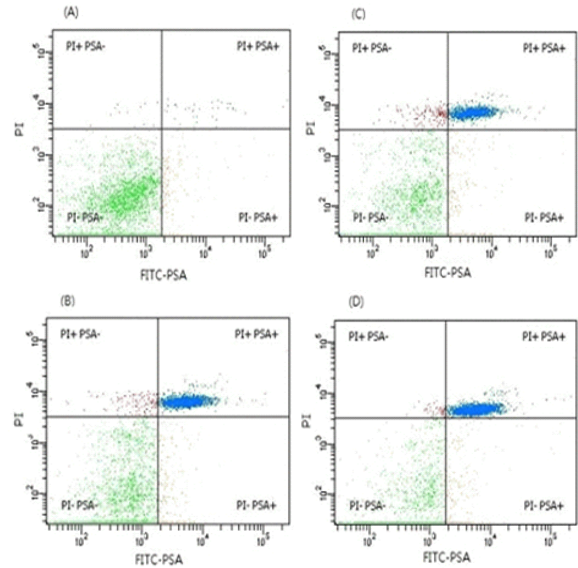


Fig. 2. FACS cytometric detection of chicken spermatozoa stained with FITC-PSA and PI. PI-PSA- quadrant contains live cells with intact acrosome; PI-PSA+ quadrant contains live cells with damaged acrosome; PI+PSA- quadrant contains dead cell with intact acrosome, and PI+PSA+ quadrant contains dead cells with damaged acrosome. (A) fresh semen, (B) frozen-thawed with DMA, (C) frozen-thawed with DMF, (D) frozen-thawed with MA.

Table 2. Effects of cryoprotectants on sperm viability of frozen-thawed chicken spermatozoa

Kinds of semen	Live(PI-SYBR+)	Dying(PI+SYBR+)	Dead(PI+SYBR-)
Fresh	95.04 ± 1.1	0.57 ± 0.23	3.53 ± 0.71
Frozen with DMA	46.94 ± 5.06^a	3.2 ± 0.72^b	49.27 ± 4.98^a
Frozen with DMF	52.1 ± 5.52^b	1.43 ± 0.39^a	45.43 ± 5.72^a
Frozen with MA	36.56 ± 4.66^c	3.73 ± 0.85^b	58.71 ± 4.25^b

Values are expressed as mean \pm SD.

^{a~c} Means with different superscripts in the same column differ significantly, $p < 0.05$ (n=5).

Table 3. The normal acrosome of chicken spermatozoa in frozen-thawed chicken spermatozoa

Kinds of semen	PI-PSA-	PI-PSA+	PI+PSA-	PI+PSA+
	(Live with intact acrosome)	(Live with ruptured acrosome)	(Dead with intact acrosome)	(Dead with ruptured acrosome)
Fresh	93.86 ± 1.53	4.38 ± 1.51	0.56 ± 0.89	1.22 ± 0.11
Frozen with DMA	45.14 ± 2.60 ^a	4.66 ± 1.34	2.70 ± 0.35 ^a	47.48 ± 1.9 ^a
Frozen with DMF	53.84 ± 1.72 ^b	3.76 ± 0.78	5.86 ± 0.65 ^b	36.56 ± 1.42 ^b
Frozen with MA	31.74 ± 2.22 ^c	5.10 ± 0.85	2.00 ± 0.19 ^c	61.16 ± 1.86 ^c

Values are expressed as mean ± SD.

^{a-c} Means with different superscripts in the same column differ significantly, $p < 0.05$ (n=5).

1.72%로서 가장 높았고, DMA 45.14 ± 2.6%, MA 31.74 ± 2.22 순으로 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 침체막이 파열된 생존 정자의 비율(PSA-PI+ population)은 실험군 간 유의적 차이가 없었다. 침체막이 온전한 죽은 정자의 비율(PSA+PI- population)은 DMF를 이용하여 동결한 정액에서 5.86 ± 0.65%, DMA는 2.7 ± 0.35%, MA는 2.0 ± 0.19% 순으로 관찰되었으며, 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 침체막이 파열되고 죽은 정자의 비율(PSA+PI+ population)은 이와는 반대로 MA를 이용하여 동결한 정액이 61.16 ± 1.86%로서 가장 높았고, DMA 47.48 ± 1.9%, DMF 36.56 ± 1.42% 순으로 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$).

3. 정자의 미토콘드리아 활성도 평가

정자 미토콘드리아의 활성도 평가는 R123와 PI 형광 염색 후 FACS를 이용하여 분석하였다(Fig. 3). 염색되지 않은 PI-SYBR- population은 세포 잔여물(debris)로 간주 하였다. PI-R123+ population은 살아 있으며, 미토콘드리아 활성도가 높은 군으로 간주하였으며, PI+R123와 PI+R123+ population은 죽은 정자로 미토콘드리아의 활성도가 없거나 낮아지는 정자군으로 분석하였다(Fig. 4). 정자의 미토콘드리아 활성도가 유지되면서 살아있는 정자는 DMF를 이용하여 동결한 정액에서 52.68 ± 1.07%로 가장 높게 나타났고, DMA 44.46 ± 1.04%, MA 38.36 ± 1.88% 순으로 유의적 차이를 나타냈다($p < 0.05$).

고 찰

정액의 동결은 유전자원을 안전하게 보존할 수 있을 뿐만 아니라, 증식효율을 조절할 수 있어 집단관리에도 효과적으로 활용될 수 있다. 그러나 정액의 동결과정 중에서 세포내의 결정 형성으로 인하여 막 손상, 삼투압 차이로 인한 전해질 대사의 심각한 변화, 정자 막 손상으로 인한 침체반응 유

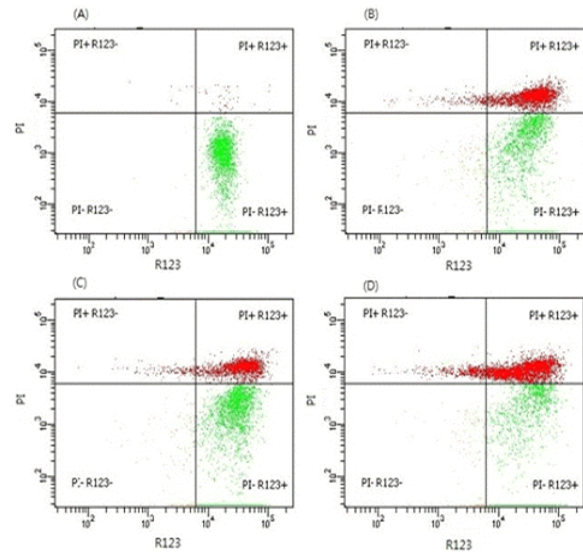


Fig. 3. FACS cytometric detection of chicken spermatozoa stained with Rhodamine123 and PI. PI-R123- quadrant contains events without fluorescence; PI-R123+ quadrant contain spermatozoa with functional mitochondria, PI+R123- and PI+R123+ quadrants contain dead spermatozoa. (A) fresh semen, (B) frozen-thawed with DMA, (C) frozen-thawed with DMF, (D) frozen-thawed with MA.

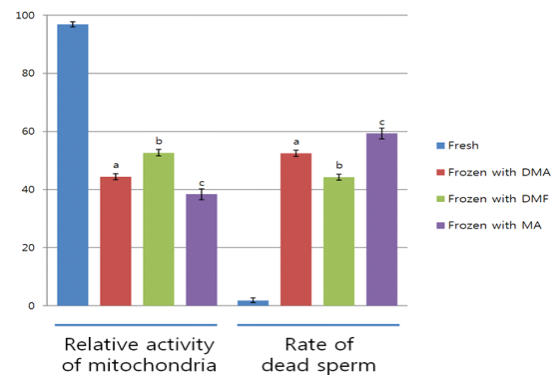


Fig. 4. The relative activity of mitochondrial activity in frozen-thawed chicken spermatozoa.

^{a-c} Means with different superscripts in the same column differ significantly, $p < 0.05$ (n=5).

발 등이 이루어지게 된다(Salisbury et al., 1978). 이러한 손상을 피하기 위해 동결 보호제를 사용하여 수분의 빙점을 강화시키고, 세포의 탈수를 감소시킨다. Amide 계열의 DMA, DMF 및 MA 동결 보호제가 동결 과정 동안에 정자 세포를 보호하는 동일한 역할을 하지만, 각기 동결 보호제들은 서로 다른 기작으로 동결 보호제로서의 역할을 수행한다(오신애 등, 2012). 본 연구에서는 닭 정액의 동결보존에 있어서 DMA, DMF 및 MA 동결 보호제를 이용하여 동결 용해 후 정자의 생존율, 정상 침체율, 미토콘드리아 활성도는 FACS를 이용한 후 평가하여 수정률과의 상관관계를 알아보고자 수행하였다. Kirby et al.(1998)은 정자의 수정 능력은 살아있는 정자의 비율에 따라 차이가 많이 난다고 볼 수 있다고 하였고, 정상 침체는 자성 생식기관에 저장되고, 난모세포의 난황막에 침투하는 동안 정자 기능들을 유지하기 위해 필요하다고 하였다(Bongalhardo et al., 2002). SYBR-14와 PI형광 염색 후 FACS로 분석한 결과, 정자막은 DMF를 이용한 동결 정액제조 방법이 가장 높은 정상 침체율을 나타냈고, MA를 이용한 동결 정액에서 가장 낮은 비율을 관찰하였다.

일반적으로 동결정액의 성상평가에 있어 운동성, 생존율 뿐만 아니라, 침체반응 또한 매우 중요하다. 닭의 정자는 적절한 시간에 수정을 촉진하게 하기 위하여 정상적인 침체상태를 유지해야 한다(Estevés et al., 2007). FITC-PSA/PI 염색 후 FACS를 이용하여 정자의 정상 침체율을 분석한 결과에서 생존율과 동일하게 DMF 처리군이 가장 높은 비율을 나타냈으며, DMF, MA를 이용한 동결정액 순으로 유의적으로 낮은 비율을 나타냈다. 그리고 손상된 침체는 죽은 정자에서 대부분 관찰할 수 있었으며, 살아있는 정자에서는 정상적인 침체를 보유하여 침체반응도가 거의 없으므로 침체 파열은 동결과 관련되어 세포가 죽은 뒤에 손상된 두부에서 노출된 침체와 반응하여 침체반응이 일어난다고 사료된다. Nagy et al. (2004)도 침체 파열과 죽은 정자 군집에서 침체반응 후 죽은 세포와 세포막을 뚫고 나온 침체의 반응이 혼재할 가능성이 있음을 추정된 결과와 일치한다.

미토콘드리아는 세포 내에 존재하는 소기관으로 자체 DNA를 가지고 있으며, 에너지원인 adenosine triphosphate(ATP)를 합성하여 정자가 운동하기 위한 에너지를 공급하는 중요한 역할을 한다. 또한 기능이 상실된 세포를 다른 세포로 변이되는 것을 막는 역할을 하기도 한다. 미토콘드리아 활성도 검사에 이용한 Rhodamine123은 미토콘드리아 내막에 축적되어 형광을 띄며, 미토콘드리아 막이 손상된 정자는 형광물질이 내막에서 유출되어 형광을 띄지 않게 된다. 미토콘

드리아 활성도 검사에서도 미토콘드리아 막이 온전한 정자 생존율은 DMF 처리군이 가장 높았으며, DMA와 MA 처리군 순으로 유의적으로 낮아지는 것을 나타냈다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 닭 정액 동결 보호제로 7% DMF를 사용하여 동결하였을 때 생존율 및 미토콘드리아 활성도가 유의적으로 가장 높았으며, 정상 침체율 또한 유의적으로 높게 관찰되었다. 이는 DMF를 이용한 닭 정자 동결법이 정자의 세포막 및 침체 손상에 미치는 영향이 가장 낮은 동결 보호제인 것으로 사료되며, 가금유전자원의 동결 보존 방법의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

본 연구는 닭 정액 동결 보존을 위하여 동결 보호제로 7%의 DMA, DMF 그리고 7.5%의 MA를 이용하여 동결 용해 후 정자의 생존율, 정상 침체율 및 미토콘드리아의 활성도를 FACS를 이용하여 평가하고, 수정률과의 상관관계를 조사하고자 수행하였다. 닭 정액을 동결한 결과, DMF를 사용하였을 때 생존율은 $52.1 \pm 5.52\%$ 로 DMA와 MA에 비해 유의적으로 높았으며($P < 0.05$), DMA $46.94 \pm 5.06\%$, MA $36.56 \pm 4.66\%$ 순으로 나타났다($P < 0.05$). 침체막이 파열되고 죽은 정자는 이와 반대로 MA를 이용하여 동결한 정액이 $61.16 \pm 1.86\%$ 로서 가장 높았고, DMA $47.48 \pm 1.9\%$ DMF $36.56 \pm 1.42\%$ 순으로 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). 정자 미토콘드리아 막이 손상되지 않은 생존 정자는 DMF를 이용하여 동결한 정액에서 $52.68 \pm 1.07\%$ 로 가장 높게 나타났고, DMA $44.46 \pm 1.04\%$, MA $38.36 \pm 1.88\%$ 순으로 유의적 차이를 나타냈다($p < 0.05$). 7% DMF를 사용하여 동결하였을 때 수정률은 유의적인 차이가 없었지만, 생존율 및 미토콘드리아 활성도가 유의적으로 가장 높았으며, 정상 침체율이 유의적으로 높았다. 이는 DMF를 이용한 닭 정자 동결법이 정자의 세포막과 침체의 손상에 미치는 영향이 가장 낮은 동결 보호제인 것으로 사료된다.

(색인어 : 정액, Dimethylacetamide, Dimethylformamide, FACS, N-Methylacetamide)

사 사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업의 닭 유전자원의 다양성 보존 및 복원기술 개발 과제(PJ0082402013)와 농촌진흥청과 경상대학교 축산학과 산학연의 지원에 의하여 수행

되었습니다.

인용문헌

- Allen TE, Bobr LW 1995 The fertility of fowl spermatozoa in glycerol diluent after intrauterine insemination. *Poultry Sci* 34:1167-1169.
- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F 2005 Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction* 129:371-378.
- Bongalhardo DC, Somnapan-Kakuda N, Buhr MM 2002 Isolation and unique composition of purified head plasma membrane from rooster sperm. *Poultry Sci* 81:1877-1883.
- Burrows WH, Quinn JP 1935 A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poultry Sci* 14:251-254.
- Clark CE, Shaffner CS 1960 The fertilizing capacity of frozen chicken sperm and the influence of related *in vitro* processes. *Poultry Sci* 39:1213-1220.
- Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP 1999 *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. *Cryobiology* 39:185-191.
- Christensen P, Stenvang JP, Godfrey WL 2004 A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. *J Androl* 25:255-264.
- Donoghue AM, Thistlethwaite D, Donoghue DJ, Kirby JD 1996 A new method for rapid determination of sperm concentration in turkey semen. *Poultry Sci* 75:785-789.
- Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal TA 2007 Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *Int Braz J Urol* 33:364-376.
- Garner DL, Johnson LA 1995 Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53:276-284.
- Gill SPS, Buss EG, Mallis RJ 1996 Cryopreservation of rooster semen in thirteen and sixteen percent glycerol. *Poultry Sci* 75:254-256.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC 2005 Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63:445-457.
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH 1990 Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using FACS. *Biol Reprod* 43:55-64.
- Graham JK 2001 Assessment of semen quality : a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 68:239-247.
- Hanzawa S, Niinomi T, Miyata T, Tsutui M, Tajima A 2010 Cryopreservation of chicken semen using N-methylacetamide as cryoprotectant. *Jp Poult Sci* 47:J27-J32.
- Harris GC, Thurston RJ, Cundall J 1973 Changes in the ultrastructure of the fowl spermatozoon due to rapid freezethaw. *J Reprod Fertil* 34:389-394.
- Kirby JD, Tressler CJ, Kirby YK 1998 Evaluation of the duration of sperm fertilizing ability in five lines of commercial broiler breeder and Delaware cross males. *Poultry Sci* 77:1688-1694.
- Lake PE, Ravie O 1984 An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br Poult Sci* 25:145-150.
- Lake PE, Ravie O, McAdam J 1981 Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programmes. *Br Poult Sci* 22:71-77.
- Long JA, Kulkarni G 2004 An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poultry Sci* 83:1594-1601.
- Nagy S, Hallap T, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H 2004. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor FACS. *Anim Reprod Sci* 80: 225-235.
- Neville WJ, Macpherson JW, Reinhart B 1971 The contraceptive action of glycerol in chickens. *Poultry Sci* 50:1411-1415.
- Partyka A, Niz'an'skib W, Łukaszewicz E 2010 Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by FACS. *Theriogenology* 74:1019-1027.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS 1949 Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666.
- Phillips JJ, Bramwell RK, Graham JK 1996 Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose. *Poultry Sci* 75: 915-923.

- Purdy PH, Song Y, Silversides FG, Blackburn HD 2009 Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications for breed and/or line regeneration. *Poultry Sci* 88:2184-2191.
- Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR 1978 *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. W. H. Freeman and Co. 2nd (eds), San Francisco, USA
- Sasaki K, Tatsumi T, Niinomi T, Imai T, Naito M, Tajima A, Nishi Y 2010 A method for cryopreserving semen from Yakido roosters using N-methylacetamide as a cryoprotectant. *Jp Poult Sci* 47:297-310.
- Schramm GP 1991 Eignung verschiedener gefrierschutzstoffe zur kryoprotektion von hahnensperma.(German) *Monatsh Veterinärmedizin* 46:438-440.
- Seigneurin F, Blesbois E 1995 Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1351-1358.
- Sexton TJ 1973 Effect of various cryoprotectants on the viability and reproductive efficiency of chicken spermatozoa. *Poultry Sci* 52, 1353-1357.
- Tereshchenko AV 1988 Cock sperm integrity dependence on the conditions of cryopreservation. *Cand Sci Thesis Ukrainian Poultry Research Institute, Borky*.
- Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E 1999 Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Sci* 78:586-590.
- Watanabe M, Terada T 1976 A new diluent for deep freezing preservation of fowl spermatozoa. *Proceed 8th Inter Congress Anim Reprod Artific Insem* 4:1096-1099.
- Xia L, Lalli MF, Ansah GA, Buckland RB 1988 Ultrastructure of fresh and frozen-thawed spermatozoa of high and low fertility lines of chickens. *Poultry Sci* 67:819-825.
- 오신애, 최선호, 고민희, 강태영, 조상래, 고문석, 오영미, 조원모 2012 제주흑우 동결정액 제조 시 Amide 계열의 동결 보호제가 동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지* 56(2): 95-101.
- 최진석, 김성우, 신단비, 고응규, 도윤정, 김동훈, 공일근, 박수봉 2012 N-methylacetamide 동결 보호제가 오계 동결정액의 생존성, 수정 및 부화율에 미치는 영향. *한국가금학회지* 39(4): 291-295.

(접수: 2013. 7. 9, 수정: 2013. 7. 30, 채택: 2013. 7. 30)