

소 정자의 동결 및 수정능력 향상을 위한 정액운반법의 개발

이상희¹ · 송은지¹ · 우제석³ · 이승환³ · 강희설³ · 정희태² · 양부근¹ · 박춘근^{1,†}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의학과, ³국립축산과학원 한우시험장

Development of Semen Transport System for Cryopreservation and Fertility in Bull Sperm

Sang-Hee Lee¹, Eun-Ji Song¹, Jea-Seok Woo³, Seung-Hwan Lee³, Hee-Seol Kang³,
Hee-Tae Cheong² Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{1,†}

¹College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³National Institute of Animal Science, Hanwoo Ex, Korea, Chuncheon 232-950, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to develop of semen transport system for cryopreservation and fertility in bull sperm. The ejaculated semen were diluted with Triladyl containing 20% egg-yolk for transportation. Diluted semen was transported by three methods that there were wrapping tissue (Tissue), sinking under 30°C water (Water) and sinking between warm water and air (Air) methods. Semen was transported within 2 hours in 0.3°C. For this study, the freezing of diluted semen were added with Triladyl containing 20% egg-yolk. And frozen-thawed sperm were estimated with SYBR14/PI double stain for viability, FITC-PNA/PI double stain for acrosome reaction analysis and Rhodamine123 double stain for mitochondrial intact assessment. In results, live sperm (SYBR+/PI-) in Air treatment group (43.3±4.7%) was significantly ($p<0.05$) higher than other treatment groups (Tissue: 16.3±2.7% and Water: 27.5±3.1%), dying sperm (SYBR+/PI+) in Air treatment group (55.6±4.7%) was significantly lower than other treatment groups (Tissue: 77.6±3.2% and Water: 67.6±3.3%) ($p<0.05$). Acrosome reaction in Air treatment group (0.2±0.1%) within live sperm (PI negative region) was significantly ($p<0.05$) lower than other treatment groups (Tissue: 0.7±0.2% and Water: 0.5±0.1%), the acrosome reaction in Air treatment group (28.6±2.8%) within all sperm also was significantly lower than other treatment groups (Tissue: 44.2±1.8% and Water: 36.2±2.0%) ($p<0.05$). And mitochondrial intact in Air treatment group within live (97.1±0.4%) and all (61.9±3.3%) sperm were significantly higher than other treatment groups (Tissue: 85.2±3.3%, Water: 87.8±2.9% within live sperm and Tissue: 49.28±3.7%, Water: 42.0±3.1% within all sperm) ($p<0.05$). Therefore, we suggest that transportation by sinking method between warm water and air was beneficial to improvement of fertility in frozen-thawed in bull semen.

(Key words : Bull sperm, Cryopreservation, Transport system, Flow cytometry)

서 론

동결정액의 이용이 발전함에 따라 가축 개량 및 산업에 크게 영향을 미쳤으며, 지난 30여 년 동안 정자의 동결보존에 대한 연구는 끊임없이 이루어져 왔다. 또한, 정액 동결보존 기술과 함께 인공수정 기술이 발전함에 따

라 가축의 개량, 생산성 향상 및 농가경제의 향상에 많은 도움을 주고 있다.

그러나 국내에서는 종모우 위주의 개량이 실시되기 때문에 선발된 개체에서의 정액을 이용하여 인공수정을 해야 하는 상황이다. 이로 인하여 각 농가에 정액이 공급되기 위해서는 동결 정액의 형태로 공급되어야 하기 때문에, 현재 국내 모든 농가에서는 동결정액을 이용하여 인

* 본 연구는 농촌진흥청 국책기술사업(과제번호: PJ907008)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8689, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

공수정을 실시하고 있는 실정이다. 그렇기 때문에 정부의 종모우 정액공급 독점 현상이 발생하고 있으며, 한정된 기관이 정액평가를 수행하고 있기 때문에, 정액의 동결방법이나 운송방법 개선에 대한 연구가 필요한 실정이다.

또한 정자는 다른 일반적인 세포에 비하여 세포분열을 하지 않기 때문에 세포손상에 매우 민감하며, 특히 온도 저하에 대한 내성이 약하며(Maxwell과 Johnson, 1997), 냉각과정 동안 정자는 운동성의 감소, 원형질막의 손상, 첨체막의 손상, 미토콘드리아막의 손상, DNA의 손상 및 apoptosis 인자들의 상승한다는 보고가 있다(Boe-Hansen 등, 2005; Johnson 등, 2000; Lopez Rodriguez 등, 2012; Shimatsu 등, 2002). 이러한 냉각과정 동안의 손상은 결국 수정율을 하락시키는 원인이 되며, 산자수의 감소, 수태율의 감소 및 농가경제에 직접적인 영향을 끼친다. 특히 다른 종에 비하여 소 정자는 온도에 매우 민감하게 작용하며, 작은 온도 변화에도 정액의 성상에 많은 영향을 미친다는 보고가 있다(Hendricks와 Hansen, 2009).

따라서 소 정액은 주로 동결형태로 보존이 이루어지며, 냉각과정 동안 발생하는 문제점을 해결하기 위하여 항산화제의 첨가(Foote 등, 2002), 동결속도 및 삼투압의 변화(Woelders 등, 1997), 광물질 첨가(Lee 등, 2010) 및 동해보호제의 첨가(De Leeuw 등, 1993)와 같은 방법을 이용하여 동결보존의 효율을 높이는 연구가 진행되고 있다.

일반적으로 소 정액은 채취하는 즉시 희석액과 동일 비율로 희석하는 방법을 이용하는데, 소 정액에 사용되는 희석액의 종류로는 egg yolk, milk 희석액, milk가 제거된 희석액, milk-fructose-egg yolk 복합체 희석액, citric acid-phosphate-egg yolk 복합체 희석액 및 Tris 기반의 희석액을 이용하고 있다(Barbas와 Mascarenhas, 2009). 이 중 국내에서는 Tris 기반에 20% egg-yolk를 함유한 Triladyl 제품을 널리 이용하고 있으며, 주로 소 정액 동결보존에 많이 쓰이지만, 그 외에 양(Ollero 등, 1998)과 말(Blottner 등, 2001) 등 정액 동결보존에 이용되었다는 보고가 있다(Barbas와 Mascarenhas, 2009).

대부분의 소 정액은 동결에 이용되며, 정액 채취 장소와 실험장소 사이에는 물리적인 거리가 항상 존재하게 되며, 채취과정, 희석과정 및 운송과정 중에 정자는 빛, 온도 및 화학물질과 같은 외부환경에 노출되어 손상을 입게 된다(Kadirvel 등, 2009). 또한, 정자는 높은 온도에서는 미토콘드리아 활성으로 인하여 에너지를 빨리 소모하게 되며, 낮은 온도에서는 저온충격(cold shock)이 발생하게 된다(Barbas와 Mascarenhas, 2009). 따라서 정액 채취 후의 희석 및 주위 환경은 정액의 수정능력에 많은 영향을 미치게 된다.

그러나 소 정액의 동결 시 항산화제의 첨가(Foote 등, 2002), 동결속도 및 삼투압의 변화(Woelders 등, 1997) 및 동해보호제의 첨가(De Leeuw 등, 1993)와 같은 방법을 이용하여 동결의 효율을 높이는 연구가 진행되어지고 있지만, 정액 채취 후 운송하는 방법 및 냉각하는 시스템에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 한우 정액의 동결 및 용해 후 수정능력 향상을 위해 신선 정액의 운반법 개선에 관하여 새로운 방향을 제시하고자 수행되었다.

재료 및 방법

정액 채취

본 연구에 이용된 소 정액은 국립축산과학원 대관령 한우시험장에서 사육되고 있는 20두의 종모우의 정액을 인공질법을 이용하여 채취하였다. 채취된 정액은 37°C에서 20% egg-yolk가 첨가된 Triladyl(Triladyl®, Minitube, tiefenbach, Germany)에 희석하였다.

정액의 희석 및 운송

채취된 정액은 20% egg-yolk가 첨가된 Triladyl에 1:1로 희석되었다. 희석된 정액의 운반법에 따른 효능을 비교하기 위하여 정액 튜브는 휴지로 감싸기(Tissue), 30°C로 가온된 물에 침지(Water) 및 가온된 물과 희석된 정액 튜브 사이에 공기층을 생성(Air)하는 방식을 이용하여 채취된 장소로부터 2시간 동안 0.3°C 환경 하에서 실험실로 운반되었다. 실험에 이용된 한우 정액은 총 16두에서 채취하여 이용하였으며, 총 20회의 반복실험을 실시하였다.

정액 동결 및 용해

앞에서 기술한 3가지 방법으로 2시간 동안 운반된 정액은 4°C에서 18시간동안 평형과정을 거친 후 동결에 이용되었다. 동결에 사용된 동결보존액은 희석액과 동일한 20% egg-yolk가 첨가된 Triladyl을 이용하였으며, 최종정자 농도를 5×10^7 개/ml가 되도록 하였다. 그 후 0.5 ml straw를 제작하여 -120°C에서 10분 동안 예비동결 후 액체 질소 내에 침지하여 -196°C에서 실험에 이용할 때까지 보관하였다. 정액분석을 위하여 동결된 정액은 38°C에서 45초 동안 용해 후 Beltsville thawing solution(BTS) 희석제(205.4 mM glucose, 3.358 mM EDTA, 20.4 mM sodium citrate, 14.879 mM sodium bicarbonate, 10.06 mM potassium chloride)로 희석한 뒤 원심분리(1,500 rpm, 5분)하여 상층액을 제거한 후에 실험에 사용하였다.

생존율 검사

생존율 검사는 SYBR14(Live/Dead sperm viability kit, Molecular probes, USA)와 propidium iodide(PI, Sigma, Spruce, USA) 이중염색 방법을 이용하여 실시하였으며, 정자 두부의 원형질막 손상 유무를 판단하여 생존율을 판단하였다(Silva와 Gadella, 2006). 정액은 1×10^6 개/ml 농도에 SYBR-14 시약의 최종농도를 2.4 μ M로 희석하여 5분 동안 37°C에서 배양 후 PI 시약의 최종농도를 2 μ M로 희석하여 5분 동안 37°C에서 배양 후 실험에 사용되었다.

첨체막 손상 검사

첨체막 손상 검사는 peanut agglutinin conjugated with phycoerythrin(PNA-FITC, Sigma, Saint Louis, USA)와 PI 이중염색 방법을 이용하여 실시하였으며, 첨체 내막의 손상 유무를 판단하여 첨체 손상율을 측정하였다(Papaioannou 등, 1997). 정액은 1×10^6 개/ml 농도에 PNA-FITC 시약의 최종농도를 2.4 μ M로 희석하여 5분 동안

37 °C에서 배양 후 PI 시약의 최종농도가 2 μM가 되도록 희석하여 5분 동안 37°C에서 배양 후 실험에 사용되었다.

미토콘드리아 온정성 검사

미토콘드리아 온정성 검사는 Rhodamine123(Sigma, Saint Louis, USA)과 PI 이중염색 방법을 이용하여 실시하였으며, 미토콘드리아 내막의 활성 정도를 판단하여 미토콘드리아 온정성을 검사하였다(Fraser 등, 2002). 정액은 1×10⁶개/ml 농도에 Rhodamine123 시약의 최종농도를 2.4 μM로 희석하여 5분 동안 37°C에서 배양 후 PI 시약의 최종농도가 2 μM가 되도록 희석하여 5분 동안 37°C에서 배양 후 실험에 사용되었다.

정자의 분석

각각의 시약으로 염색된 정자는 flow cytometry(FACS caliber, Becton Dickinson, USA)에서 형광의 발현치를 이용하여 총 10,000개의 정자를 분석하였다. 분석된 정자는 CELLQuest version 6.0(Becton Dickinson, USA)을 이용하여 Fig. 1과 같이 정자의 생존율, 침체 손상을 및 미토콘드리아 보존율을 분석하였다.

통계분석

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.3을 이용하여 General linear mode(GLM)을 적용하여 Duncan 다중검정에 의하여 p<0.05 수준에서 유의차를 검정하였다.

결 과

정자의 생존능력(Viability)

운송방식에 따른 한우 정자의 동결-융해 후의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 1에서 설명한 살아 있는 정자(Live sperm, SYBR+/PI-)의 비율은 Fig. 2A에서 보는 바와 같이 Air 처리구(43.3±4.7%)가 다른 처리구(Tissue: 16.3 ±2.7% 및 Water: 27.5±3.1%)에 비하여 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 또한, 죽어가는 정자(Dying, SYBR+/PI+)의 정자 비율은 Fig. 2B에서 보는 바와 같이 Tissue(77.6±3.2%)와 Water(67.6±3.3%) 처리구 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, Air 처리구(55.6±4.7%)에서 유의적으로 감소하였다(p<0.05). 종합적인 결과를 보았을 때 운송방식에 있어 정액의 운반 시 공기층을 생성하여 운반하는 방식이 정자의 생존율에 효과적인 영향을 미쳤다.

정자의 침체 손상(Acrosome Reaction)

운반 방식을 달리하여 동결-융해 된 한우 정액의 침체 손상율에 대한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 침체 손상을 평가하기 위하여 Flow cytometry로 분석된 부분 중 PI가 염색된 부분을 기준으로 살아있는(Live, PI-) 정자(Fig. 3A)와 전체적인(All, PI+/PI-) 정자(Fig. 3B)의 부분을 나누어 비율로 계산하였다. 실제로 수정에 관여하는 정자는 살아있는 정자(Live)이기 때문에 다음과 같은 실험을 실시하였으며, 그 결과 살아있는 정자 중 침체 손상이 일어난 정자는 Fig. 3A에서 보는 바와 같이 1% 이하였으며,

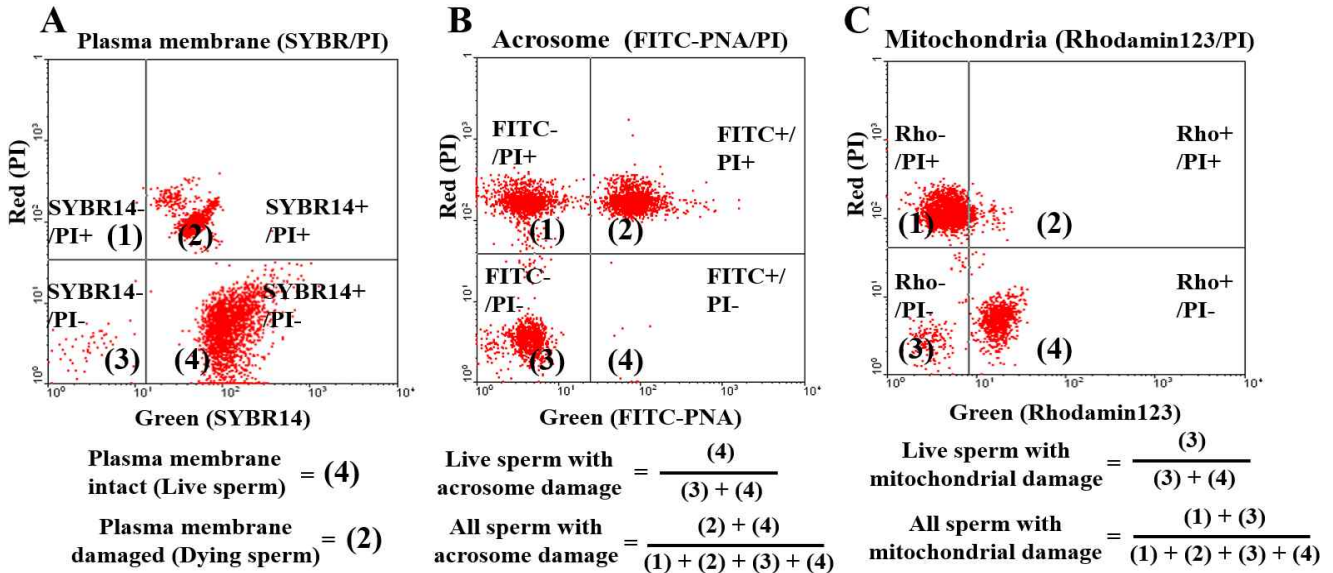


Fig. 1. Standard of flow cytometry analyses for assessing sperm membrane integrity. (A) Dot plot of SYBR14 and propidium iodide (PI) fluorescence. Quadrants can be divided into SYBR14+/PI-: viable sperm, SYBR14+/PI+: Dying sperm, SYBR14-/PI-: Dead sperm. (B) Dot plot of FITC-PNA and PI fluorescence. FITC-/PI-: Live and intact acrosome membrane, FITC+/PI-: Live and damaged acrosome membrane, FITC-/PI+: Dead and intact acrosome membrane, FITC+/PI+: Dead and intact acrosome membrane. (C) Dot plot of Rhodamin123 and PI fluorescence. Rho-/PI-: Live and damaged mitochondrial membrane sperm, Rho+/PI-: Live and intact mitochondrial membrane, Rho-/PI+: Dead and damaged mitochondrial membrane, Rho+/PI+: Dead and intact mitochondrial membrane.

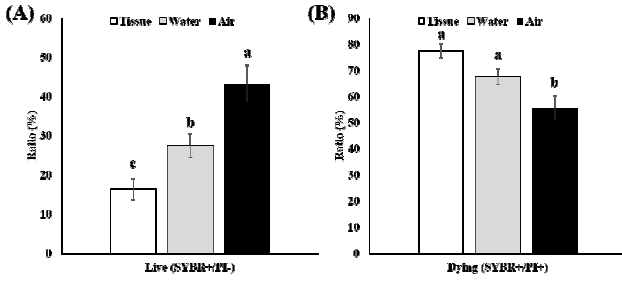


Fig. 2. Comparison of transport methods on sperm viability during the cryopreservation in Hanwoo, Live sperm is SYBR positive and PI negative position (A) and dying sperm is SYBR positive and PI positive position (B). ^{a,c} Different letters within in the same column represent a significant difference ($p<0.05$), All treatments were conducted in 20 replication.

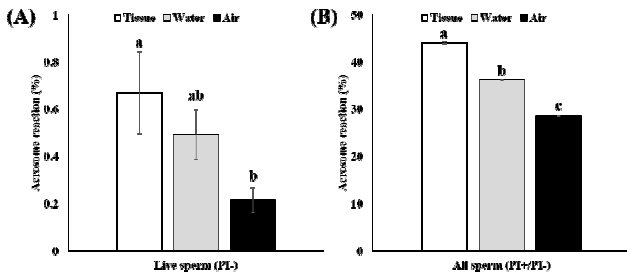


Fig. 3. Comparison of transport methods on sperm acrosome reaction during the cryopreservation in Hanwoo, Live sperm is PI negative position (A) and all sperm is PI negative and positive position (B). ^{a,c} Different letters within in the same column represent a significant difference ($p<0.05$), All treatments were conducted in 20 replication.

이 중 Air 처리구($0.2\pm 0.1\%$)가 다른 처리구(Tissue: $0.7\pm 0.2\%$ 및 Water: $0.5\pm 0.1\%$)에 비하여 첨체 손상율이 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). 또한, 전체 정자를 분석한 경우에도 Fig. 3B에서 보는 바와 같이 Air 처리구($28.6\pm 2.8\%$)가 다른 처리구(Tissue: $44.2\pm 1.8\%$ 및 Water: $36.2\pm 2.0\%$)에 비하여 첨체 손상율이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다($p<0.05$).

정자의 미토콘드리아 온전성(Mitochondrial Intact)

미토콘드리아 기능검사는 정자의 에너지 생산에 관련된 항목이기 때문에, 운동성이 있는 정자에 있어 매우 중요한 지표로 작용하게 된다. Fig. 4는 운반 방식에 따른 동결-융해된 한우 정액의 첨체 손상율에 대한 결과로써, 첨체 손상율 평가와 마찬가지로 PI가 염색된 기준으로 살아있는(Live, PI-) 정자(Fig. 4A)와 전체적인(All, PI+/PI-) 정자(Fig. 4B)의 부분을 나누어 미토콘드리아 온전성을 평가하였다. 그 결과, 동결-융해 후 살아있는 정자 중 미토콘드리아 온전한 정자의 비율은 Fig. 4A에서 보는 바와 같이 15% 이하였으며, Air 처리구($97.1\pm 0.4\%$)가 다른 처리구(Tissue: $85.2\pm 3.3\%$ 및 Water: $87.8\pm 2.9\%$)에 비하여 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 또한, Fig. 4B에서 보는 바와 같이 전체 정자 중 미토콘드리아 온전성이 Air 처리구(61.9

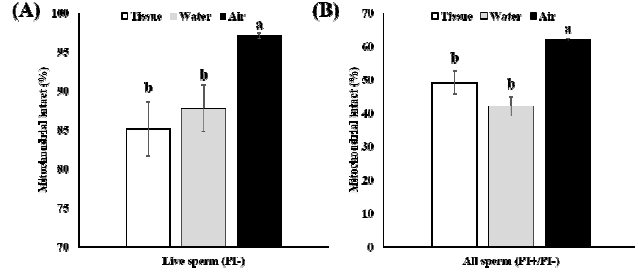


Fig. 4. Comparison of transport methods on sperm mitochondrial intact during the cryopreservation in Hanwoo, Live sperm is PI negative position (A) and all sperm is PI negative and positive position (B). ^{a,b} Different letters within in the same column represent a significant difference ($p<0.05$), All treatments were conducted in 20 replication.

$\pm 3.3\%$)에서 유의적으로 증가한 것을 관찰하였다($p<0.05$).

고찰

가축산업의 발전과 인공수정의 기법은 가축의 정액을 이용한 개량과 가축 생산성에 있어 농가에게 높은 이익을 가져다주었다. 또한, 이러한 기술이 발전함에 따라 동결정액을 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 동결의 효율을 높이기 위하여 동결 시 발생하는 활성산소를 제거하기 위한 항산화제의 첨가(Andrabi, 2009; Sansone 등, 2000), 빙정 형성을 막아주는 여러 종류의 동결보호제 첨가 및 냉각속도 조건의 변화(De Leeuw 등, 1993), 비침투성 동해보호제인 당의 첨가(Woelders 등, 1997) 및 삼투압 조건을 달리한 동결액 종류의 변화(Liu 등, 1998)에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다.

그러나 실제 현장에서는 정액을 채취하는 장소와 실험 장소 사이에는 물리적인 거리가 항상 존재하기 때문에, 정액을 운송하는 과정이나 채취 후 처리하는 과정이 매우 중요하다. 또한, 채취된 정액은 희석한 후 물중탕을 이용하여 온도를 하강시키는 방법을 많이 이용하지만, 이러한 방법은 희석된 정액이 물이 담겨있는 튜브와 직접적으로 접촉하여 온도충격이 생기게 되기 때문에, 채취환경, 냉각과정 및 운반과정에서 온도에 민감한 소 정액은 충격을 많이 받게 된다. 그러나 정액 냉각용기에 대한 개선, 장거리를 이동할 때의 운송방법에 대한 연구는 저조한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 정액의 온도가 하강할 때 발생하는 충격을 최소화하는 방식을 개선하고자 하였다. 일반적으로 37℃의 물 500 ml는 0.3℃의 환경에서 2시간 동안에 4℃로 떨어지게 된다. 이러한 방식을 이용하여 37℃의 희석액으로 희석된 정액을 물 500 ml 내에 침지하여 온도를 하강시키는 방식을 이용하였다. 또한, 물과 희석된 정액튜브 사이에 발생하는 직접적인 온도 충격을 감소시키기 위하여 튜브를 이용하여 정액과 물 사이에 공기층을 만들어 실험에 이용하였으며, 이러한 방식으로 운반된 정액은 동결-융해 후 생존율, 첨체 손상율 및 미토콘드리아 보존율이 유의적($p<0.05$)으로 증가한

것을 확인할 수 있었다(Fig. 2~4). 이러한 기술은 모든 농가가 동결 정액으로 인공수정을 하는 국내의 현황으로 비추어 볼 때 정액을 채취하여 동결 정액을 제조하는 기관 또는 업체에 도움이 될 것으로 기대된다.

소 정액은 온도변화에 있어 다른 개체보다 매우 민감하기 때문에 채취 후 즉시 가온된 희석액으로 희석하고 바로 동결을 위하여 냉각해야 하는 것이 특징이다. 실제로 희석 후 37°C의 환경에 장시간 노출되면 DNA fragment가 증가하고, caspase-9 단백질이 증가한다는 보고가 있다(Hendricks와 Hansen, 2009). 또한, 희석하지 않은 원정액 상태로 본 연구방법을 이용하여 운송하게 되면 모두 사멸하는 것을 실험을 통해 확인하였다. 이와 같이 소 정액은 온도에 매우 민감하기 때문에 적절한 운송방식 및 냉각용기가 필요하다고 판단되며, 소 정액의 채취 후 운반하는 방법을 연구를 통하여 개선하였다.

실제로 운반 방식에 따른 동결-융해 후 정액의 생존율을 관찰하였을 때 낮은 온도에 직접적으로 노출된 Tissue 처리구가 SYBR14가 적게 염색된 것을 관찰할 수 있었으며, 이러한 결과는 정자의 원형질막이 많이 손상된 것으로 판단된다. 또한, 직접적인 냉각충격은 정자의 원형질막에 악영향을 끼치게 되어, 정자 세포 내 지질에 영향을 끼친다는 보고(Drobnis 등, 1993)가 있기 때문에 정액 동결 시 온도 충격을 최소화하는 방안이 필요하여 가온된 물에 정액을 침지하여 냉각하는 방식을 많이 이용하고 있는 실정이다. 하지만 가온된 물에 직접적으로 정액을 침지시킬 경우에 정액과 가온된 물 사이에는 온도 차이가 존재하기 때문에 온도에 민감한 정자가 손상을 입게 된다. 실제로 정액 채취 후 보존액과 희석하게 되면 처음 보존액의 온도와 달라지게 된다. 따라서 현장에서 정액의 채취, 희석 및 운반이 효율적으로 이루어지기 위해서는 간편한 방식의 정액 운반법이 필요하다고 생각된다.

첨체 손상율은 정자의 수정능력을 판단하는데 있어 중요한 지표중에 하나이며, 첨체 손상능력을 평가하는 항목에는 첨체의 내막을 확인하는 peanut agglutinin conjugated with phycoerythrin FITC(FITC-PNA)가 널리 이용되고 있다(Silva와 Gadella, 2006). 동결-융해 하는 동안에는 콜레스테롤 유출로 인한 수정능력 획득이 인위적으로 일어나게 되어 정자의 첨체 손상과 apoptosis가 일어나게 되어 신선정액에 비하여 수정능력이 낮아진다는 보고가 있다(Martin 등, 2004). 따라서 이러한 첨체 손상을 개선하고자 유출된 콜레스테롤의 인위적인 첨가(Purdy와 Graham, 2004), 세포막을 안정시키기 위한 동해 보호제의 첨가(De Leeuw 등, 1993) 및 활성산소를 제거하기 위해 항산화제를 첨가(O' Flaherty 등, 1999)하여 동결에 이용한다라는 보고가 있다. 하지만 동결액 자체에 물질들을 첨가하여 동결의 효율성을 높이는 연구가 진행되어 왔지만, 냉각하는 시스템에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구의 결과, 신선 및 동결-융해 후 PI를 기준으로 나누어 살아있는 정자에서의 첨체 손상율을 분석한 결과, 모두 1% 이하로 나타났으며, 처리구의 첨체 손상율이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 수정에 직접적으로 관련이 있는 살아있는 정자가 첨체 손상율이 낮아진 결과이며, 동결-융해 된 소 정액의 수정능력을 향상시킬 수 있을 것이라 판단된다. 또한, 생존 유무에

관계 없이 Air 처리구의 첨체 손상율이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 16마리의 개체 중 3마리의 개체(개체번호 247, 257 및 303번)에서 본 연구방법을 이용하였을 경우 다른 경향을 보였으며, 이러한 결과는 개체마다 동결-융해 후 첨체 손상에 대한 개체 차이가 존재하는 것으로 판단된다.

미토콘드리아는 대사활동에 의하여 필요한 에너지를 생산하며 정자에 있어 운동성을 제공하는 중요한 세포 내 소기관이다(Ramio-Lluch 등, 2011). 정자의 미토콘드리아를 검증하는 방법에는 미토콘드리아 내막 보존능력 및 미토콘드리아에서 생성되는 ATP의 양을 측정하는 방법 등이 이용되고 있다(Silva와 Gadella, 2006). 본 연구에서는 Rhodamine123을 이용하여 미토콘드리아 내막의 온전성을 flow cytometry 분석을 통해 분석하였다. 그 결과, 미토콘드리아 온전성 역시 Air 처리구가 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났고, 살아있는 정자 및 모든 정자에서도 같은 경향이 나타났다.

이러한 결과를 종합하면 소 정액을 채취한 후 동결보존 하기 위하여 운송하는데 있어 가온된 물에 직접적으로 침지시켜 온도를 냉각시키는 방법보다는 물과 희석된 정액 튜브 사이에 공기층을 두어 정액을 냉각시켜 동결-융해하였을 때 정자의 생존율, 첨체 손상을 및 미토콘드리아 온전성에 있어 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 현장에서 정액 채취 후 바로 본 연구 방법의 이용이 가능하며, cold shock 및 직접적인 온도 충격을 최소화하여 정액 운반 시 발생하는 운동충격을 최소화 할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 정액의 채취를 협조해 주신 농촌진흥청 한우시험장과 강원대학교 동물자원공통 연구소에 감사드립니다.

인용문헌

1. Andrabi SMH (2009): Factors affecting the quality of cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 44:552-569.
2. Barbas J, Mascarenhas R (2009): Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* 10:49-62.
3. Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H (2001): Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci* 65:75-88.
4. Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Greve T, Christensen P (2005): Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogeno-*

- logy 63:2006-2019.
5. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ (1993): Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30:32-44.
 6. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH (1993): Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *Zoology* 265:432-437.
 7. Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT (2002): Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 71: 13-23.
 8. Fraser L, Lecewicz M, Strzezek J (2002): Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Pol J Vet Sci* 5:85-92.
 9. Hendricks KEM, Hansen PJ (2009): Can programmed cell death be induced in post-ejaculatory bull and stallion spermatozoa. *Theriogenology* 71:1138-1146.
 10. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
 11. Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A (2009): Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci* 114:125-134.
 12. Lee SH, Lee JH, Chung HT, Yang BK, Kim HM, Lee SB, Kwon SS, Choi SK, Shim JM, Kim JD, Park CK (2010): Effects of brine mineral water on sperm preservation in miniature pig. *Annals Anim Resource Sci* 21:19-25.
 13. Liu Z, Foote RH, Brockett CC (1998): Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 37:219-230.
 14. Lopez Rodriguez A, Rijsselaere T, Vyt P, Van Soom A, Maes D (2012): Effect of dilution temperature on boar semen quality. *Reprod Domest Anim* 47:63-66.
 15. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R (2004): Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 71:28-37.
 16. Maxwell WMC, Johnson LA (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
 17. O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT (1999): Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 52:289-301.
 18. Ollero M, Perez-Pe R, Muiño-Blanco T, Cebrian-Perez JA (1998): Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* 37: 1-12.
 19. Papaioannou KZ, Murphy RP, Monks RS, Hynes N, Ryan MP, Boland MP, Roche JF (1997): Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Theriogenology* 48:299-312.
 20. Purdy PH, Graham JK (2004): Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod* 71:522-527.
 21. Ramio-Lluch L, Fernandez-Novell JM, Pena A, Colas C, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Ramirez A, Concha, II, Rigau T, Rodriguez-Gil JE (2011): 'In vitro' capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive subpopulational structure. *Reprod Domest Anim* 46:664-673.
 22. Sansone G, Nastri MJF, Fabbrocini A (2000): Storage of Buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci* 62:55-76.
 23. Shimatsu Y, Uchida M, Niki R, Imai H (2002): Liquid storage of miniature boar semen. *Exp Anim* 51: 143-147.
 24. Silva PF, Gadella BM (2006): Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65:958-978.
 25. Woelders H, Matthijs A, Engel B (1997): Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35:93-105.

(Received: 28 August 2013/ Accepted: 6 September 2013)