

BSA 또는 Fatty Acid Free BSA 첨가가 닭 희석 정자와 동결 정자의 생존성에 미치는 영향

김성우^{1†} · 김민수¹ · 유연희¹ · 김찬란¹ · 전익수¹ · 김종대^{2‡}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터, ²농촌진흥청 국립축산과학원 가금연구소

The Effects of Supplementation of BSA or Fatty Acid Free BAS on the Motility of Fresh or Cryopreserved Rooster Spermatozoa

Sung Woo Kim^{1†}, Min Soo Kim¹, Yeonhui Yu¹, Chan-Lan Kim¹, Ik Soo Jeon¹ and Chongdae Kim^{2‡}

¹Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 55717, Korea

²Poultry Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Pyungchang 25342, Korea

ABSTRACT This study examined factors affecting the analysis of motility of chicken semen. The viability of spermatozoa was estimated using varying dilution ratios and supplementation with BSA or fatty acid free (FAF)-BSA as protein sources in semen diluent. Fresh semen was examined after preparing dilutions in beltsville poultry semen extender (BPSE) of 1/8, 1/16 and 1/32 at 25°C. The motility of incubated semen at each dilution was observed at 3 min (89.9%, 69.9% and 53.2%), 30 min (86.7%, 71.4% and 51.7%), 1 h (89.5%, 74.0% and 53.5%) and 3 h (78.5%, 66.5% and 45.7%), respectively. The addition of BSA or FAF-BSA to BPSE diluent significantly increased the viability of semen in 1/32 dilution with results of 53.2% (control), 84.8% (BSA) and 92.9% (FAF-BSA) ($p<0.05$). This phenomenon was also observed in the dilution of frozen semen, where FAF-BSA treatment increased the viability of thawed semen from 17.6% to 34.0% in a 1/8 dilution ($p<0.05$). When the protein sources were used in the dilution, the survival rates of diluted chicken semen were also increased with time lapse. These results show that FAF-BSA may act to protect chicken semen and is suitable as a basic component of chicken semen diluent for the method of analyzing rooster semen after freezing.

(Key words: rooster semen, Ogye, cryopreservation, BSA, dilution)

서 론

가금 정액의 동결 연구는 비교적 오랜 역사를 가지고 있으며, 동결학(cryobiology)에서 최초로 저온 보존이 가능한 것으로 Polge 등(1949)에 의하여 알려져 있으나, 포유류에 비하여 아직까지 그 이용성이 매우 낮으며, 연구 영역도 실험실 수준에 머무르고 있다(Choi 등, 2013). 그 이유는 첫째, 닭 동결 정액은 대량 생산이 힘들며, 인건비 등 희석제의 생산 단가가 비싸기 때문이라고 생각할 수 있다. 둘째, 가금산업에 필요한 종계는 고도의 육종체계를 거쳐 계통을 확립하였으며, 이에 관한 차별적 보존 전략이 잘 마련되어 있어서 소수의 생축으로 그 특성이 유지될 수 있기 때문이다. 셋째, 가금 종축의 계통별 유지 및 관리가 다른 동물에 비하여 개체 관

리가 비교적 용이하다는 특징이 있으므로 육종농가와 산업계에서는 수정율과 부화율이 낮은 동결정액 사용을 선호하지 않고 있다. 그럼에도 불구하고 닭정자의 동결 보존연구는 악성질병의 위협으로부터 가금유전자원을 보호하기 위하여 유전자원을 수집하는 기본 기술로 매우 중요하며, 보존된 유전자원은 노아의 방주의 기능을 수행하므로 가금 종축을 영구 보존할 수 있다.

닭 동결정액 연구에 있어서 문제점은 대량 생산을 위한 원정액의 희석배율이 제한되어 있다는 점에 존재한다. 소의 경우, 평균 21일에 걸쳐 배란이 이루어지므로 발정기에 맞추어 최소량의 동결정액을 공급하면 정액의 농도와 양이 높을 이유가 없으나, 산란계의 경우, 거의 매일 배란이 이루어지므로 생리적 활성이 있는 정자를 여기에 맞추어 공급하여야

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

[‡] To whom correspondence should be addressed : chongkim@korea.kr

부화 가능한 수정란을 생산할 수 있다. 이를 위하여 가금은 진화적으로 질과 자궁의 경계부에 정자를 저장할 수 있는 기관(sperm storage tube; SST)을 진화시켰으며, 많은 수의 정자를 장기간에 걸쳐 보존할 수 있는 특징을 가지고 있다. 그러므로 가금은 적은 부피의 고농도 정액이 필요하며, 동결정액의 생존성과 활력도를 고려해 볼 때, 더 많은 정자가 필요하다고 보고되었다(Sexton, 1981). 그러므로 희석율을 더 낮출 수 없다는 점이 동결정액의 생산효율을 낮추는 주 원인이라고 판단된다. 또한, 소의 경우, 동결 정액 생산 방법에 이용되는 동결보호제는 glycerol이며, 이것을 이용한 산업화 기술이 확립되어 있다. 그러나 닭 정액의 동결 보존을 위하여 glycerol을 이용할 경우, 용해된 동결 정자의 생존성과 활력도는 비교적 우수하게 유지되나, 인공수정 후 생산되는 수정란의 발생률과 부화율을 극도로 저해하므로 쉽게 적용할 수가 없다(Lake, 1986; Neville 등, 1971; Hammerstedt와 Graham, 1992). 그러므로 최근에 닭 정액을 동결 보존하기 위하여 비글리세롤 동결보호제를 통하여 이런 한계를 극복하는 연구가 수행되었다(Sasaki 등 2010; Choi 등, 2012; Choi 등, 2013). Glycerol을 대체할 수 있는 동결보호제로서 dimethylformamide(DMF), dimethylacetamide(DMA), dimethylsulfoxide(DMSO), N-methylacetamide(MA)에 대한 결과가 보고되고 있으며, 연구자마다 선호하는 방법이 서로 달라 닭 정액의 동결방법은 아직까지 통일되어 있지 않다는 문제점이 존재한다(Hanzawa 등, 2010; Lake와 Ravie, 1984; Tereshchenko 등, 1992; Tselutin 등, 1999; Sasaki 등, 2010; Choi 등 2013). 그러므로 닭 정액에 관한 많은 연구자의 노력에도 불구하고, 산업화를 위한 희석 배율 문제점과 통일된 동결방법이 존재하지 않아 다양한 성적이 보고되고 있음이 현실이다.

닭 정액을 동결하기 위하여 정액을 희석하는 것은 동결 정자의 생존성을 판별하고, 장수성을 비교하는 연구결과에도 많은 영향을 끼친다. 정자의 생존성 분석은 생리적 기능 분석을 위하여 신선 및 동결 정액의 평가에 주로 많이 이용되고 있다. 정자의 운동성 분석은 비교적 역사가 깊으며, 스크린 막을 이용하거나, 필름 및 디지털 영상을 분석하는 방법이 사용되었으나, 그 방법과 원리는 동일하다. 현미경에서 움직이는 정자를 관찰하고, 단위 시간 안에 정자가 이동하는 방향 및 거리 및 속도에 관한 지표를 설정하여 측정함으로써 기능을 분석하는 기법이 개발되었는데, 컴퓨터를 이용하는 소프트웨어의 개발로 자료 분석이 자동으로 이루어지는 것을 CASA(computer assisted sperm analysis)라고 부르는데, 이는 빠른 시간 안에 객관화 된 자료를 자동으로 제공하기 때문에 시간과 노력이 절약되며, 정확도가 매우 높은 것으로

보고되었다(Farrell 등, 1998; King 등, 2000; Blebois 등, 2008). 이 기술은 포유류 정자분석에는 많이 이용되고 있으나, 가금류의 경우는 연구가 미진한 것으로 판단되며, 그 이유는 가금류 정자는 두부가 얇고 긴 형태의 창형 구조로서 중편부와 미부의 구별이 명확하지 않기 때문이다(Holsberger 등, 1998). 그러므로 움직이는 닭 정자 두부의 중심을 정확히 인지하기 어렵고, 살아서 운동성을 가지고 있는 정자의 긴 편모에 의하여, 죽은 정자일지라도 두부 자체가 움직일 수 있기 때문에 CASA에 의한 자료 확보가 어려운 것으로 판단된다. 또한 CASA는 적절한 농도의 정자수가 필요하며, 여기에는 약 $20 \sim 30 \times 10^6/\text{mL}$ 정도가 적절하다고 알려져 있다(Vantman, 1988). 번식학적 특성상 닭은 정액 내 정자 농도가 평균 $2 \sim 5 \times 10^9/\text{mL}$ 정도로 매우 높은 농도의 정액을 생산하며, 이것을 CASA에 적합한 농도로 희석을 실시하면 정자의 운동성이 소실되어 측정치를 얻기 힘들다고 알려져 있다(Harrison 등, 1982). 그러므로 소나 돼지의 자료에 비하여 닭정자 CASA의 자료는 변이가 심하게 나타날 수 있어서 매우 주의해야 하며, 변이를 낮출 수 있는 최적의 조건을 모색할 필요성이 존재한다.

이와 같이 닭의 정자 동결 연구에 관한 기초 자료로서 정자 생존성 분석을 객관화하는 것은 포유류의 정자보다 더 어렵기 때문에 여러 요인에 관한 검증이 필요하다고 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 닭 정자의 생존성 분석을 위하여 디지털 동영상을 얻고, 스크린 상에서 직접 분석된 자료를 활용하여 생존성 분석을 실시할 때, 필요한 최적의 조건을 얻기 위하여 BPSE를 기본 배양액으로 이용하여 닭 정액을 희석으로부터 보호할 수 있는 방법을 강구하였다. 닭 신선정액과 동결정액에서 희석 충격의 효과를 조사하였으며, 희석 충격을 최소화 하고 정확한 운동성 분석을 위한 기본 자료를 확보하기 위하여 정자 보호제로 활용할 수 있는 BSA를 첨가하여 닭 정자의 생존성을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

공시축은 국립축산과학원 가축유전자원센터가 보유하고 있는 오계(Ogye) 수컷 20수를 사용하였다.

2. 시약 및 희석액의 조성

특별히 언급되지 않은 경우, 모든 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(USA)의 한국 대리점을 통하여 구입하였으며, 닭 정액 희석액의 제조에 이용된 물은 Irvine Scientific(Santa Ana, USA)에서 제조한 체외수정 클리닉 등급(Water for Assi-

sted Reproductive Technology)을 이용하였다. 닭 정액 분석을 위하여 희석제로 이용되는 BPSE-I(Beltsville Poultry Semen Extender-I)는 potassium phosphate dibasic trihydrate 1.27 g, sodium L glutamate 0.867 g, D-fructose(anhydrous) 0.5 g, sodium acetate trihydrate 0.43 g, TES 0.195 g, potassium citrate 0.064 g, potassium phosphate monobasic 0.065 g, magnesium chloride anhydrous 0.034 g을 최종 부피가 100 mL이 되도록 세포배양용 초순수를 용해하여 제조하였다(Sexton과 Fewlass, 1978). HS-1 희석액은 Hanzawa 등(2010)의 방법에 따라 제조하였으며, sodium L glutamate 1.2 g, potassium acetate 0.3 g, D(+)-glucose 0.2 g, D(+)-trehalose dihydrate 3.8 g, BES 0.5 g, Bis-TRIS 0.5 g을 최종 부피가 100 mL가 되도록 세포배양용 초순수에 용해하여 제조하였다.

3. 정액의 채취 및 동결정액의 제조

닭 정액 채취는 마사지 방법으로 눈금이 있는 15 mL 튜브에 계통별로 주 1~2회 채취하였고, 5°C의 실험용 얼음에 담아 20분간 정치하여 실험실로 운반하였다. 동일하게 준비된 동결 보호제가 첨가되지 않은 HS-1 희석액으로 1:1 비율로 희석 후 20분간 평형시간을 가졌다. 희석된 정액은 1:1의 비율로 희석할 경우, MA 동결 보호제의 최종농도가 8%가 되도록 조정된 MA를 포함하는 HS-1 희석액으로 다시 희석하였다. 동결보호제가 들어간 희석액으로 희석된 정액은 평형시간 없이 0.5 mL straw(FHK, Japan)에 충전하고 끝 부위를 초음파 밀봉기(Minitube, Germany)를 이용하여 밀봉하였다. 작업 과정에서 동일한 온도를 유지하기 위하여 5°C로 조정된 저온정액처리장치(FHK, Japan) 안에서 희석, 충전 및 밀봉 작업을 실시하였다. 희석 정액이 충전된 스트로의 동결방법은 액체질소 상면 4 cm에서 30분간 정치하여 예비동결을 실시하고, 액체 질소에 침지하는 간이 동결법을 이용하였다.

4. 동결 정액의 용해

5°C 저온수조(FHK, Japan)에서 2분간 용해 후 5 mL 둥근 시험관으로 옮기고, 실험용 얼음에 두고 동일하게 처리된 희석제를 첨적하는 방법으로 희석하였다. 가온관에 미리 준비된 슬라이드 또는 세포수측정기(cell counter)에 약 3~4 μ L를 점적하고, 커버 글라스를 직접현미경으로 10 또는 20배 대물렌즈로 관찰하였다.

5. 닭 정자 생존성과 장수성 검사

닭 정액의 생존성 검사를 위하여 동영상을 Olympus IX

51현미경으로 관찰하면서 DM20 디지털 카메라로 동영상을 촬영하였으며, 약 10초간 디지털동영상으로 저장하고, 영상 재생프로그램을 활용하여 1초간 연속재생을 실시하였다. 모니터에서 연속 움직임을 나타내는 닭 정자의 움직임을 트리이싱 페이퍼를 이용하여 움직이지 않는 정자는 죽은 정자로, 움직이는 정자는 살아 있는 정자로 간주하였다. 전체 정자수가 최소 200개 이상이 되도록 자료를 수집하였다. 원 정액을 BSA 1%가 포함된 희석액 또는 fatty acid free BSA 1%를 함유한 희석액으로 희석을 실시하여 동결정자와 신선정자의 장수성을 비교하였다. 20~50배로 희석된 원정액과 동결 및 용해된 정자를 Markler counting chamber와 세포수 측정기(cell counter)를 이용하여 정자 세포수를 측정하였고, 농도에 따른 생존 정자의 운동성을 동영상에서 직접 분석하였다. 정자의 장수성은 25°C로 맞추어 놓은 디지털 가온장치(eppendorf Thermomixer C, Germany)에서 진탕없이 온도만 유지시켜 동일한 방법으로 생존율을 조사하여 시간에 따른 생존 정자의 비율로 관찰하였다.

6. 통계 자료 분석

각 실험은 3회 반복 실시하였으며, 정자의 생존율에 대한 분석은 Student's *t*-test로 분석을 실시하였다. *P*값이 0.05보다 낮은 실험군은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. BPSE 희석액이 닭 정자의 생존성에 미치는 영향

닭 정액의 희석배율이 분석에 미치는 영향을 알아보기 위하여 우선 신선정액에 HS-1 희석액을 첨가하여 원정액을 1/4로 희석한 후, 다시 BPSE 희석액으로 1/2로 연속적으로 희석하여(3회 실시)하여 1/8 희석, 1/16 희석 및 1/32 희석 정액을 제조하였다. 희석 과정은 실험용 얼음에서 실시되었으며, 4~5°C에서 냉각된 정액과 희석제를 사용하였다. 희석이 완료되고 25°C로 조절된 heating block에서 3분, 30분, 1시간 및 3시간 동안 방치하여 37°C에서 역상현미경으로 정자의 움직임을 관찰하고 동영상을 촬영하였다. Table 1에서는 동영상에서 운동성 있는 정자를 총 정자수에 대한 비율을 조사하였으며, 희석배율에 따른 정자의 생존성에 관한 자료를 검토하였다. 정자의 생존성은 희석배율이 높아질수록 전반적으로 신선 정액임에도 불구하고 유의적 수준으로 낮아지는 경향을 나타내었다. 신선 정액을 1/8로 희석하였을 때, 1시간까지 89.5%가 운동성을 유지하였으나, 3시간 동안 25°C에 보존하면 78.5%로 유의적인 차이가 존재하였다($P <$

Table 1. The effects of dilution ratio of fresh semen on the viability of Ogye rooster spermatozoa

Dilution ratio	% of motile sperm examined at time of			
	3 min	0.5 h	1 h	3 h
1 : 8	89.9± 4.0	86.7± 5.9	89.5± 0.1	78.5± 4.0 ^a
1 : 16	69.9± 4.7 ^A	71.4± 4.3 ^A	74.0± 3.9 ^A	66.5±10.5
1 : 32	53.2±11.5 ^A	51.7±12.9 ^A	53.5±10.4 ^B	45.7±10.9 ^A

^{A,B} Means with capital letters of superscripts were significantly different within columns ($p<0.05$).

^a Means with small letters of superscripts were significantly different within rows ($p<0.05$).

The experiment was replicated 3 times.

0.05). 원 정액을 1/16로 희석하면 3시간까지 희석정액의 생존성은 66.5%로 낮아졌으나, 이것은 희석 직후(3분)의 생존율인 69.6%와 유의적 차이가 존재하지 않았다($P>0.05$). 그럼에도 불구하고 1/8 희석에 비하여 1/16로 희석하는 것은 생존성을 저하시켰으며, 닭의 원정액을 BPSE로 희석할수록 희석배율에 따라 급격히 생존성이 낮아지는 경향을 관찰할 수 있었다.

2. BSA 첨가 BPSE 희석액이 닭 신선 정자의 생존성에 미치는 영향

닭 정액의 희석배율이 높아질수록 희석 충격에 의한 생존성 저하효과를 완화시키기 위하여 BSA 1%를 함유하는 BPSE 희석액을 2차 희석액으로 사용하여 생존율을 조사하였다. Table 2에서는 1%(w/v) BSA가 함유된 BPSE를 이용하여 희석배율을 증가시켰을 때, 운동성 있는 정자의 비율은 희석율이 낮아질수록 유의적 수준으로 낮아지는 경향을 나타내었다. 신선 정자를 1/8로 희석을 실시할 때, 1시간까지 유의적 차이가 없었으며, 3시간 동안 25℃에 보존하면 생존율이 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. 신선정액을 1/16 또는 1/32 희석할 때, 각 실험군에는 30분 동안 유의적 차이가 존재하지 않았으며(89.1% 대 84.8%, 93.8% 대 84.4%), 1시간 이후 생존성에 관한 유의적 차이가 존재하였다($P<0.05$).

3. FAF-BSA 첨가 BPSE 희석액이 닭 신선 정자의 생존성에 미치는 영향

희석배율이 높아질수록 신선정액의 생존성이 저하되는 현상을 더 정제된 형태의 fatty acid free BSA(FAF-BSA)를 이용하여 생존성을 조사하였다. 1%(w/v) FAF-BSA를 함유하는 BPSE 희석액을 2차 희석액으로 사용하였고, 정자 생존성을

Table 2. The effects of dilution ratio of fresh semen with BSA on the viability of Ogye rooster spermatozoa

Dilution ratio (% of BSA)	% of motile sperm examined at time of			
	3 min	0.5 h	1 h	3 h
1 : 8 (0.5)	95.7±2.0	96.4±1.2	93.8±1.5	89.8±2.5 ^a
1 : 16 (0.75)	89.1±3.7 ^A	93.8±0.8 ^A	84.6±4.3 ^A	77.1±2.5 ^{aA}
1 : 32 (0.875)	84.8±1.3 ^A	84.4±3.0 ^B	74.0±6.3 ^{aA}	72.5±3.2 ^{aA}

^{A,B} Means with capital letters of superscripts were significantly different within columns ($p<0.05$).

^{a-c} Means with small letters of superscripts were significantly different within rows ($p<0.05$).

The experiment was replicated 3 times.

조사하였다. Table 3에서 1% FAF-BSA가 함유된 BPSE를 이용하여 신선정액을 1/8, 1/16 및 1/32로 희석하면 운동성 있는 정자의 비율은 희석율이 낮아질수록 낮아지는 경향을 관찰할 수 있었으나, 25℃에서 3시간동안 보존하더라도 약 90%의 생존율을 유지하는 것으로 관찰되었다. 신선 정자를 1/8로 희석할 때, 1시간까지 생존 정자의 비율은 유의적 차이가 없었으며(96.9% 대 94.8%), 신선 정자를 1/16 또는 1/32로 희석할 때, 3시간까지 운동성을 유지하는 정자는 1/16 희석 실험군에서 93.9%에서 90.9%로 저하되었고, 1/32 희석 실험군에서 92.9%에서 89.8%로 저하되어 유의적인 차이가 존재하지 않았다($P>0.05$).

4. BPSE 희석액이 닭 동결 정자의 생존성에 미치는 영향

닭 동결 정액에서 희석배율이 동결정자의 운동성 분석에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동결을 실시하였으며, 융해한 동결 정액을 BPSE 희석액으로 1/2로 연속적으로 희석하

Table 3. The effects of dilution ratio of fresh semen with FAF-BSA on the viability of Ogye rooster spermatozoa

Dilution ratio (% of FAF-BSA)	% of motile sperm examined at time of			
	3 min	0.5 h	1 h	3 h
1 : 8 (0.5)	96.9±0.7	96.7±1.0	94.8±1.2	92.1±0.9 ^{aA}
1 : 16 (0.75)	93.9±2.0	92.2±2.2 ^A	91.1±2.0 ^A	90.9±1.4 ^{AB}
1 : 32 (0.875)	92.9±2.3	93.5±2.7 ^A	90.7±3.0 ^A	89.8±0.7 ^B

^{A,B} Means with capital letters of superscripts were significantly different within columns ($p<0.05$).

^a Means with small letters of superscripts were significantly different within rows ($p<0.05$).

The experiment was replicated 3 times.

여 정자의 생존율을 조사하였다. Table 4에서 보는 바와 같이, 동결 정액을 용해하여 희석을 실시하지 않고 정자 운동성을 관찰하면 59.8%에서 62.9%로 관찰되었으나, BPSE 희석액으로 1/8 희석, 1/16 희석 및 1/32 희석을 실시하면 정자 생존율은 17.6%, 13.9% 및 10.4%로 급격히 낮아졌으며, 1시간 동안 정자의 장수성을 조사하면 거의 모든 정자가 생존하지 못하여 3.6%, 4.8% 및 5.4%의 생존율을 관찰할 수 있었으며, 유의적 차이가 존재하지 않았다($P>0.05$).

5. FAF-BSA 첨가 BPSE 희석액이 닭 동결 정자의 생존성에 미치는 영향

닭 동결 정액에서 희석배율이 동결정자의 운동성 분석에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동결을 실시하고, 용해한 동결 정액을 1%(w/v) FAF-BSA를 첨가한 BPSE 희석액으로 1/2로 연속적으로 희석하고, 정자의 생존율을 조사하였다. Table 5에서 보는 바와 같이, 용해된 동결정액과 1/8, 1/16 및 1/32로 희석된 동결정액을 조사하면 희석율이 낮아질수록 운동성 있는 정자의 비율이 낮아지는 경향을 관찰할 수 있었다. 용해 직후인 3분간 배양된 동결정자의 생존율은 34.0%, 22.7% 및 12.9%로 관찰되었으며, 30분간 배양될 때 정자의 생존율은 17.6%, 13.9% 및 8.5%로 낮아졌으며, 유의적 차이가 존재하였다($P<0.05$). 그러나 1시간 배양 시 동결 정자의 장수성을 조사하면 거의 모든 정자가 생존하지 못하여 2.7%, 3.6% 및 5.2%의 생존율을 관찰할 수 있었으며, 유의적 차이가 존재하지 않았다($P>0.05$).

고 찰

최근 조류인플루엔자(avian influenza; AI)와 같은 악성질

Table 4. The effects of dilution ratio of frozen/thawed semen on the viability of Ogye rooster spermatozoa

Dilution ratio	After thawing (W/O dilution)	% of motile sperm examined at time of		
		3min	0.5 h	1 h
1 : 8	60.4±4.8	17.6±1.8 ^{aA}	8.0±0.1 ^b	3.6±1.4 ^c
1 : 16	59.8±5.1	13.9±4.5 ^{aAB}	9.9±5.0 ^{ab}	4.8±1.0 ^b
1 : 32	62.9±3.3	10.4±1.6 ^{aB}	6.9±1.0 ^b	5.4±3.3 ^b

^{A,B} Means with capital letters of superscripts were significantly different within columns ($p<0.05$).

^{a~c} Means with small letters of superscripts were significantly different within rows ($p<0.05$).

The experiment was replicated 3 times.

Table 5. The effects of dilution ratio of frozen/thawed semen with FAF-BSA on the viability of Ogye rooster spermatozoa

Dilution ratio (% of BSA)	After thawing (W/O dilution)	% of motile sperm examined at time of		
		3min	0.5 h	1 h
1 : 8 (0.5)	63.2±2.7 ^A	34.0±2.4 ^a	17.6±1.6 ^{ba}	2.7±1.2 ^c
1 : 16 (0.75)	62.2±2.7 ^{AB}	22.7±2.4 ^{aA}	13.9±4.5 ^{baB}	3.6±0.3 ^c
1 : 32 (0.875)	58.2±1.4 ^B	12.9±1.2 ^{aB}	8.5±3.8 ^{abB}	5.2±2.2 ^b

^{A,B} Means with capital letters of superscripts were significantly different within columns ($p<0.05$).

^{a~c} Means with small letters of superscripts were significantly different within rows ($p<0.05$).

The experiment was replicated 3 times.

병의 창궐로 수많은 가금류가 피해를 보고 있으며, 이러한 가금유전자원 망실에 대한 위협은 점차 높아질 것으로 예상된다. 특히 가금류의 증축은 재래닭을 제외하면 주요 유전자원은 전적으로 수입에 의존하고 있으며, 이러한 자원을 소실하게 되면 경제적 타격이 막대하다고 판단된다. 그러므로 동결정액을 계통 및 개체 별로 보존하여 유전자원의 복원을 위한 수단과 방법을 제공하는 것은 국가적 재난에 직면한 가금산업을 보호하기 위하여 매우 중요하다고 판단된다.

닭은 인공수정 방법을 이용하여 손쉽게 육종을 실시할 수 있는 가축으로 번식연구에 중요한 동물이다. 특히 동결보호제로서 glycerol의 기능이 처음 밝혀진 축종으로 다른 포유류와는 달리 닭 정자의 생존성에는 glycerol이 영향이 없으나, 인공 수정 후 생산된 수정란은 발생이 되지 않는 특이한 현상이 있음이 알려져 왔다(Shaffner 등, 1941; Polge 등, 1949; Lake, 1986; Hammerstedt 등, 1992; Gill 등, 1996). 그러므로 닭 정액에서 glycerol은 피임 효과를 나타내는데, 그 정확한 생리적 기작은 아직까지 잘 밝혀져 있지 않다. 또한, 닭 정자 운동성을 분석하는 것은 정자의 생리적 현상을 분석하고, 정액의 품질을 판별하는데 있어 매우 중요한 기법이며, 동결 정액의 이용성을 증진하기 위하여 반드시 필요한 기술이라고 할 수 있다. 특히, 동결정액과 신선정액을 비교하여 정자 생존성에 관한 객관적 자료로 제시되어야 하나, 아직까지 닭에 있어서 정확한 자료를 제공하는 연구 결과는 미진한 편이다. 보다 정확한 정자의 활성도 분석을 위하여 흔히 이용되는 CASA 분석 방법에는 보통 세포수 측정용 슬라이드 또는 마클러 챔버(Makler's counting chamber)를 주로 활용하는데, 이 때 도구의 특성상 정자의 농도는 약 20~30×10⁶개의 정액이 필요하다고 밝혀졌다(Makler, 1980; Vantman,

1988). 그러나 닭 동결 정액을 제조하기 위하여 매우 높은 농도 정액을 이용하고 유지해야만 하는 이유가 있는데, 닭에서 신선정액의 경우 $50\sim 100\times 10^6$ 개 정자수가 1회 인공수정을 위하여 필요하며, 동결정액의 경우 $5\sim 7\times 10^8$ 개 이상의 정액이 필요하기 때문이다(Sexton, 1981; Lake, 1986). 그러므로 닭 정자의 운동성 분석을 위하여 높은 농도의 정자를 빨리 분석 및 관찰하는 방법이 필요하며, 이는 정확한 자료를 얻는데 있어 제한 요인으로 작용한다고 판단된다. 본 연구에서는 닭 정액의 특성을 감안하여 희석정자의 생존율에 관한 정확한 자료를 분석하고자 슬라이드 글라스와 커버슬립을 이용하여 움직이는 정자를 현미경으로 관찰하면서 동영상 촬영하였으며, 희석비율에 따라 생존 정자의 비율을 신선정액과 동결정액에서 비교하였다.

신선 정액의 경우, 기본 희석액을 BPSE를 이용할 때, 희석배율이 1/32로 낮아질수록 생존성은 급격하게 낮아지는 것을 관찰하였다. 한편, 마클러 챔버를 이용하여 관찰을 실시할 경우, 닭 신선정액은 1/32로 희석하여도 정자의 미부와 두부가 겹쳐서 이미지에서 구별이 불가능하였으며, 1/100에서 1/200 이하로 희석을 실시하여야 구별이 가능하였다. 그러나 희석 충격에 의하여 정자의 운동성은 급격히 떨어졌으며 운동성에 관한 정확한 자료 획득이 불가능하였다. 또한 자료를 제공하지 않았으나, PBS(calcium magnesium free), EK, HS-1 등을 이용하여 예비실험을 실시하였을 때, 닭 정액의 희석에는 BPSE가 가장 우수하다는 결론을 얻었기에 본 연구에서는 BPSE를 기본 희석액으로 이용하였다. 닭 원정액의 농도는 평균 $2\sim 5\times 10^9$ /mL로 알려져 있는데, 10 μ L에는 1×10^7 개 이상이 존재하므로 마클러 챔버를 활용한 닭 정자의 최적조건을 위하여 최소 100배 이상으로 희석해야만 하는 한계점이 존재한다. 그러므로 정확한 닭 정자 운동성을 분석하기 위하여 현미경으로 관찰할 수 있는 정자의 활동 영역(z 축)을 최소화하는 것이 중요하다고 판단되었다. 닭과 같이 비교적 높은 희석배율로 정확한 생존율 자료를 얻기 위하여 슬라이드 자체로 이용하는 것이 틈을 최소화 할 수 있고, 정확한 자료를 획득할 수 있다고 판단된다. 또한 본 연구에서 관찰된 바와 같이, 닭 정액의 희석배율을 1/4 이하로 낮추더라도 정자를 보호할 수 있는 단백질원이 필요하다고 보여진다. 닭 신선 정자의 운동성을 분석하기 위하여 최소 0.5% BSA를 첨가하는 것이 안정적인 것으로 판단되며, 이러한 결과는 소의 정액 연구와 같이 동일한 결과를 얻었다(Harrison 등, 1982; White 등, 1984). 그럼에도 불구하고 지방성분이 제거된 BSA(FAF-BSA)는 더 우수한 성적을 제공하였다. 이는 닭 정자의 장수성을 유지하는데 BSA에서 유래되는 지방산은 정

자의 생존성을 저해하는 요인이 될 수 있음을 간접적으로 시사하고 있는데, 이 기능을 밝히기 위하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

동결정액의 경우, 용해 후 희석하지 않은 정자의 생존성은 약 60% 정도의 성적을 관찰할 수 있었는데, 희석을 실시하면 닭 신선정액보다 더 많은 비율의 정자가 생존하지 못한다는 것이 본 연구를 통하여 밝혀졌다. 또한 FAF-BAS가 함유된 BPSE로 희석을 실시하더라도 신선정액의 성적에 미치지 못하였고 신선정액의 경우, 90% 이상의 정자가 3시간까지 생존한 반면, 동결정액은 1/8로 희석을 실시하더라도 약 50%의 정자가 죽는 결과(63.2% 대 34.0%)를 보여주고 있는데, 이는 닭 동결정자는 희석에 더욱 취약하다는 것을 보여주고 있다. 그러므로 동결된 정자를 희석하여 인공수정에 사용하는 것은 바람직하지 못하다는 것을 반증하고 있으며, 용해 직후 바로 사용하는 것이 유리하다고 판단된다. 또한 많은 연구 결과에서도 닭 동결정액의 최종 희석배율은 1/4로 고정되어 연구하는 것이 대부분인데, 이러한 희석율에 대한 정자의 생존 반응도가 희석을 더 이상 실시할 수 없는 한계를 설명하는 것으로 추정된다. 그러므로 희석배율을 유지시키면서 정자의 생존율을 높일 수 있는 방법을 찾아내는 것이 닭 정액 동결의 실용화에 중요하다고 판단된다.

적 요

본 연구에서는 닭 정액의 운동성 분석에 미치는 요인을 분석하기 위하여 희석배율에 따른 생존성을 조사하고, 신선정액의 희석 시에 필요한 조건을 확보하기 위하여 희석제에 단백질원으로서 BSA와 FAF-BSA의 첨가가 닭정자의 생존성에 미치는 영향을 관찰하였다. 최종 희석율이 1/4이 되도록 닭 정액을 희석하여 생존성을 조사하면 신선정액에서 희석율이 1/8, 1/16 및 1/32로 낮아질수록 89.9%, 69.9% 및 53.2%로 생존율이 낮아지는 것을 관찰하였으며, 단백질원으로 BSA나 FAF-BSA를 이용하면 생존율을 유의적으로 증진시킬 수 있음을 증명하였다. 또한 이러한 현상은 동결정액의 희석에도 중요한 요인으로 관찰되었는데, FAF-BSA를 이용하여 희석할 때 단백질이 없는 경우보다 양호한 생존율이 나타난다는 것을 관찰하였다(17.6% 대 34.0%). 그러나 단백질원을 활용하더라도 닭정액의 희석율이 낮아질수록 생존율이 저하하는 현상은 지속적으로 나타나고 있으며, 신선정액에 비하여 동결정액은 장수성이 낮은 것으로 추정되었다. 그러므로 본 연구에서 사용된 정자의 분석방법은 닭 정액 동결을 실시하여 운동성을 분석할 때 필요한 기본 정보를 제

공할 수 있을 것으로 판단되며, 닭 희석배율을 낮추어 동결 정액의 효율성을 높이는 연구에 기여할 것으로 추정된다.

사 사

본 연구는 농림부 Golden Seed Project의 2016년도 연구 사업(세부과제명: 신품종 작출용 유전자원 수집 및 수집집단의 순수화 세부과제번호: PJ00992302)과 2017년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM 2008 Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* 69: 252-261.
- Choi JS, Kim SW, Shin DB, Ko YG, Do YJ, Kim DH, Kong IK, Park SB 2012 Effects of N-methylacetamide on the viability, fertility and hatchability of cryopreserved Ogye (Korean native black fowl) semen. *Korean J Poult Sci* 39:291-295.
- Choi JS, Shin DB, Ko YG, Do YJ, Byun M, Park SB, Seong HH, Kim H, Kong IK, Kim SW 2013 Effects of kinds of cryoprotectants on the characteristics of frozen fowl semen. *Korean J Poult Sci* 40:171-178.
- Farrel PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH 1998 Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49:871-879.
- Gill SP, Buss EG, Mallis RJ 1996 Cryopreservation of rooster semen in thirteen and sixteen percent glycerol. *Poult Sci* 75:254-256.
- Hanzawa S, Niinomi T, Miyata T, Tsutsui M, Tajima A 2010 Cryopreservation of chicken semen using N-methylacetamide as cryoprotectant. *Jp Poult Sci* 47:J27-J32.
- Hammerstedt RH, Graham JK 1992 Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38.
- Harrison RA, Dott HM, Foster GC 1982 Bovine serum albumin, sperm motility and the "dilution effect". *J Exp Zoo* 222:81-88.
- Holsberger DR, Donoghue AM, Froman DP, Ottinger MA 1998 Assessment of ejaculated quality and sperm characteristics in turkeys: Sperm mobility phenotype is independent of time. *Poult Sci* 77:1711-1717.
- King LM, Holsberger DR, Donoghue AM 2000 Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in turkeys. *J Androl* 21:65-71.
- Lake PE 1986 The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm. *Poult Sci* 65:1-15.
- Lake PE, Ravie O 1984 An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br Poult Sci* 25:145-150.
- Makler A 1980 The improved 10 micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril* 33:337-338.
- Neville WJ, Macpherson JW, Reinhart B 1971 The contraceptive action of glycerol in chickens. *Poult Sci* 50:1411-1415.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS 1949 Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666.
- Sasaki K, Tatsumi T, Tsutsui M, Tatsuya N, Imai Y, Naito M, Tajima A, Nishi Y 2010 A method for cryopreserving semen from Yakido roosters using N-methylacetamide as a cryoprotective agent. *J Poult Sci* 47:297-301.
- Sexton TJ 1981 Sperm number required for maximum fertility of chicken semen processed for freezing. *Reprod Nutr Dev* 21:1043-1048.
- Sexton TJ, Fewlass TA 1978 A new poultry semen extender. Effect of the diluent components on the fertility of chicken semen stored at 5°C. *Poult Sci* 57: 277-284.
- Shaffner CS, Henderson EW, Card GC 1941 Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. *Poult Sci* 20:259-265.
- White LM, Beal WE, Bame JH, Saacke RG, Marshall CE 1984 Characteristics of bovine spermatozoa after migration through a bovine serum albumin gradient. *J Anim Sci* 59: 454-459.
- Vantman D, Koukoulis G, Dennison L, Zinaman M, Sherins RJ 1998 Computer-assisted semen analysis: Evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertil Steril* 49: 510-515.

Received Feb. 27, 2017, Revised Mar. 29, 2017, Accepted Mar. 29, 2017