

소 정자의 생존을 및 침체반응 검사를 위한 간단한 염색법

김계성[†] · 이병천* · 황우석*

미국 펜실베이니아대학교 메디칼센터

Vital and Acrosomal Staining of Bovine Spermatozoa

K. S. Kim[†], B. C. Lee and W. S. Hwang

University of Pennsylvania Medical Center,

Center for Research on Reproduction and Women's Health, PA 19104, U.S.A.

SUMMARY

The object of this study was to find simple and effective methods for the speculation of vitality and scrosome status of bovine spermatozoa. The eosin-nigrosin staining, trypan blue staining, and naphthol yellow S-erythrosin B staining was often used for the speculation of vitality and/or acrosome status of bovine spermatozoa, respectively. This study has shown that the combined trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B staining is more accurate and effective for the examination of acrosome status and vitality of bovine spermatozoa.

(Key words : trypan blue-naphthol yellow S-etythrosin B staining, acrosome status, vitality)

서 론

정자의 생사판별과 침체상태의 검사는 수태능력을 간접적으로 확인할 수 있는 지표로 이용되며 (Yanagimachi, 1994) 이를 검사하기 위한 다양한 방법이 개발, 실용화되어 왔다 (Barth와 Oko, 1989; Keel과 Webster, 1990; Herman 등, 1994). 정자의 침체를 검사하기 위한 방법으로 위상차현미경이나 differential interference contrast (DIC)가 장착된 현미경을 이용하는 법, naphthol yellow S-erythrosin B 또는 Bismark brown-rose Bengal 등으로 염색하거나 형광염색 후 검사하는 방법 등이 보고되었다 (Cross와 Meizel, 1989). 본 연구는 소 정자의 생사 및 침체성상을 검사할 수 있는 간편하고 효과적인 염색법을 규명하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 정자의 생사 및 침체검사법

1) 생사검사

(1) Eosin-nigrosin 염색

Eosin-nigrosin 염색은 Barth와 Oko(1989)의 방법에 준하여, 정자부유액 20 μ l와 동량의 eosin-nigrosin 염색액을 slide glass 위에 점적하여 5초간 혼합, 염색한 후 도말하였으며 alcohol lamp 상에서 건조시킨 후 광학현미경하에서 검경하였다($\times 400$). 정자생사의 판정기준은 두부가 붉게 염색된 것을 사멸정자로, 염색되지 않고 맑게 보이는 것을 생존 정자로 하였으며 (Fig. 1), 한 표본 당 200개의 정자

본 연구는 서울대학교 부속 수의과학연구소 지원에 의해 수행되었음.

*서울대학교 수의과대학 (College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

[†]Correspondence

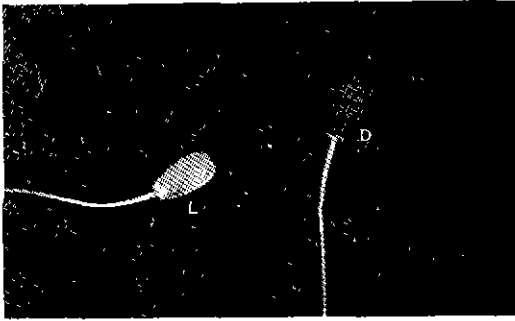


Fig. 1. Evaluation of the vitality after eosin-nigrosin staining. L indicates live sperm and D indicates dead sperm ($\times 1,000$).

를 관찰하여 생존율을 조사하였다.

(2) Trypan blue 염색

Trypan blue 염색은 염색은 Sanchez 등(1995)의 방법을 변형하여 실시하였다. 원심관에 정자부유액과 동량의 0.2% trypan blue(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 염색액을 혼합한 후 37°C 수조에서 10분간 배양하여 염색하였으며, modified Tyrode's 배양액으로 2회 원심세정하였다. 정자를 1×10^7 sperm cells/ml 농도로 재 부유한 후 slide glass에 도말하고 공기 중에서 건조시킨 후 광학현미경 하에서 검경하였다($\times 400$). 정자생사의 판정기준은 두부가 푸르게 염색된 것을 사멸정자로, 염색되지 않고 밝게 보이는 것을 생존정자로 하였으며(Fig. 2), 한 표본 당 200개의 정자를 관찰하여 생존

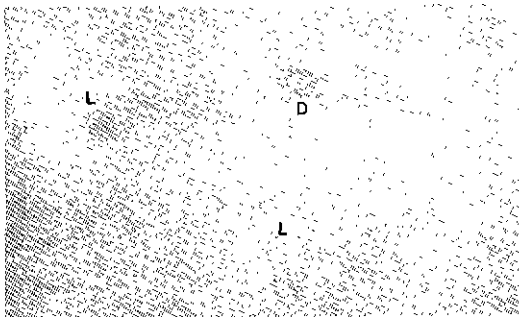


Fig. 2. Evaluation of the vitality after trypan blue staining. L indicates live sperm and D indicates dead sperm ($\times 1,000$).

율을 조사하였다.

2) 침체반응검사

(1) Naphthol yellow S-erythrosin B 염색

정자의 침체염색은 Lenz 등(1983)의 방법에 준하여 실시하였다. 정자부유액을 slide glass에 도말하여 40°C 가온판에서 건조시켰으며, 0.1% naphthol yellow S 염색액에서 30분간 염색한 후 1% aqueous acetic acid로 10초간 세정하였다. 정자 도말표본을 0.2% aqueous naphthol yellow S와 0.2% aqueous erythrosin B를 동량 혼합한 염색액(pH 4.8)에서 13분간 염색하였고, 증류수로 세정한 후 공기 중에서 건조시켰으며, cover slip으로 덮여 광학현미경 하에서 검경하였다($\times 400$, $\times 1000$).

정자의 침체반응판정기준은 두부의 침체부위가 탈색된 것처럼 염색이 되지 않은 것을 침체반응이 일어난 것으로, 침체의 막부위가 짙게 염색된 것을 침체반응이 일어나지 않은 것으로 하였다(Fig. 3). 침체반응률은 표본 당 200개의 정자를 관찰하여 백분율로 표시하였다.

3) 생사 및 침체반응 동시 검사

(1) 복합 Trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색

이 방법은 각각의 생사염색법 및 침체염색법을 응용한 것으로서, 정자부유액에 trypan blue 염색을

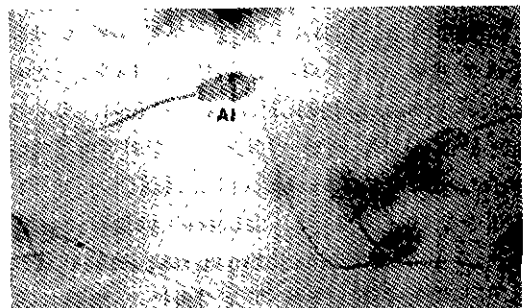


Fig. 3. Evaluation of the acrosomal status after naphthol yellow S-erythrosin B staining. AI indicates acrosome intact sperm and AR indicates acrosome reacted sperm ($\times 1,000$).

한 후 slide glass에 도달하고 naphthol yellow S-erythrosin B 염색을 하였다.

정자의 침체반응판정은 trypan blue 염색과 naphthol yellow S-erythrosin B 염색법의 기준에 따라 네 가지로 구분하였다. 즉, 생사의 판정기준은 postacrosomal region이 푸르게 염색된 것을 사멸 정자로, 분홍빛으로 염색된 것을 생존정자로 하였으며, 각각의 경우에 대하여 침체부위가 탈색된 것처럼 염색이 되지 않은 것을 침체반응이 일어난 것으로, 침체의 막부위가 짙게 염색된 것을 침체반응이 일어나지 않은 것으로 하였다(Fig. 4). 현미경검사시 1차로 생사판정을 위하여 200개의 정자를 관찰하여 생존율을 산정하였으며, 2차로 생존 정자 중에서 200개를 관찰하여 침체반응률을 조사하였다.

2. 실험설계

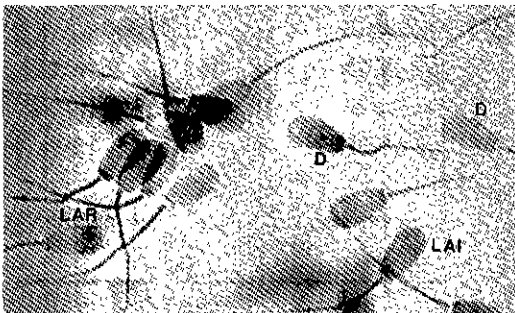


Fig. 4. Evaluation of the vitality and the acrosomal status after trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B staining. LAI indicates live acrosome intact sperm, LAR indicates live acrosome reacted sperm and D indicates dead sperm, respectively ($\times 1,000$).

1) Eosin-nigrosin 및 trypan blue 염색

다른 염색을 병행할 수 있는 trypan blue 염색과 일반적인 정자생사판정법인 eosin-nigrosin 염색을 비교 검토할 목적으로 동결정액을 용해하여 각각 2시간 및 10시간 배양 후의 생존율을 조사하였다.

2) Naphthol yellow S-erythrosin B 염색과 trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색의 비교

정자침체염색의 정확성과 편리성을 조사하기 위하여 기존의 naphthol yellow S-erythrosin B 염색 (생존율은 eosin-nigrosin 염색으로 검사)과 이를 응용한 복합 trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색을 비교 실험하였다. 동결용해 직후 및 heparin으로 수정능획득을 유도한 5시간 후의 생존율과 침체반응률을 각각 조사하여 비교 검토하였다.

결 과

1. 생사 및 침체염색법 비교

1) Eosin-nigrosin 및 trypan blue 염색

Trypan blue 염색법의 정확성과 유용성을 검증하기 위하여, 동일 조건의 정자를 대상으로 eosin-nigrosin 염색과 생존율을 비교하여 얻은 결과는 Table 1과 같다.

소 동결정액의 용해 직후, 배양 2시간 후 및 10시간 후의 생존율은 eosin-nigrosin 염색 군에서 각각 90.0, 79.0 및 56.3%였으며, trypan blue 염색 군에서는 각각 90.5, 79.0 및 56.2% 이었다.

배양시간이 경과할수록 생존율은 유의적으로 감소하였으나 ($p < 0.05$), 동일 조건하에서 염색법에

Table 1. Comparison of bovine sperm vital rates between eosin-nigrosin stain and trypan blue stain

	At thawing		Post-thawing (hours)			
	E-N ¹	TB ²	2		10	
	E-N	TB	E-N	TB	E-N	TB
Vital rate(%) ³	90.0 \pm 2.0 ^a	90.5 \pm 1.5 ^a	79.0 \pm 3.9 ^b	79.0 \pm 4.8 ^b	56.3 \pm 3.5 ^c	56.2 \pm 3.8 ^c

^{1,2} E-N indicates eosin - nigrosin stain and TB indicates trypan blue stain

³ Mean \pm S.D.

^{a-c} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

다른 생존율에는 유의적인 차이가 없었다. 결과적으로 정자의 생존율을 검사하는데 있어서 trypan blue 염색은 eosin-nigrosin 염색과 유사한 정확도를 보여 유용성이 확인되었다.

2) Naphthol yellow S-erythrosin B 염색과 trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색의 비교

정자의 침체반응률을 보다 정확하고 신속하게 관찰할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 기존의 eosin-nigrosin 염색 및 naphthol yellow S-erythrosin B 염색과 생존율검사를 동시에 할 수 있도록 변형시킨 복합 trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색을 비교 검토한 결과는 Table 2 및 3과 같다.

동결정액 용해 후 및 수정능획득 5시간 후의 생존율은 eosin-nigrosin 염색 및 naphthol yellow S-erythrosin B 염색에서 각각 88.0 및 75.3%이었고, trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색에서는 각각 89.2 및 76.7% 이었다(Table 2). 생존율은 두 염색법 모두에서 배양시간의 경과에 따라 유의적으로 감소하였으나($p < 0.05$), 동일 조건하에서 염색법에 따른 생존율에는 유의적인 차이가 인

정되지 않았다.

동결정액 용해 후 및 수정능획득 5시간 후의 침체 반응률은 eosin-nigrosin 염색 및 naphthol yellow S-erythrosin B 염색에서 각각 4.2 및 91.0%이었고, trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색에서는 각각 4.7 및 91.8%이었다(Table 3). 각각의 침체반응률은 배양시간의 경과에 따라 유의적으로 증가하였으나($p < 0.05$), 동일 조건하에서 염색법에 따른 침체반응률에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 결과적으로 trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색의 생존율과 침체반응률은 각각 eosin-nigrosin 염색 및 naphthol yellow S-erythrosin B 염색과 유사한 정확도를 보여 유용성이 확인되었다.

고 찰

Eosin-nigrosin 염색은 정자의 생사 염색으로 이용되어 왔으며, 최근에는 정자형태검사까지 결합할 수 있는 방법으로 알려져 있다 (Barth와 Oko, 1989). Trypan blue 염색은 온수조 내에서의 배양과 염색액을 제거하기 위한 원심세정 등 과정이 복

Table 2. Comparison of bovine sperm vital rates between eosin-nigrosin stain and trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B stain

	At thawing		5 h after thawing	
	E-N ¹	TB-NYS-EB ²	E-N	TB-NYS-EB
Vital rate(%) ³	88.0±1.5 ^a	89.2±1.5 ^a	75.3±3.0 ^b	76.7±3.1 ^b

^{1,2} E-N indicates eosin-nigrosin stain and TB-NYS-EB indicates trypan blue - naphthol yellow S -erythrosin B stain

³ Mean ± S.D.

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3. Comparison of bovine sperm acrosome reaction rates between naphthol yellow S-erythrosin B stain and trypan blue -naphthol yellow S -erythrosin B strain

	At thawing		5 h after thawing	
	NYS-EB ¹	TB-NYS-EB ²	NYS-EB	TB-NYS-EB
vital rate(%) ³	88.0±1.5 ^a	89.2±1.5 ^a	75.3±3.0	76.7±3.1

^{1,2} NYS-EB indicates naphthol yellow S -erythrosin B stain and TB-NYS-EB indicates trypan blue - naphthol yellow S-erythrosin B stain

³ Mean ± S.D.

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

잡한 단점이 있지만 생사판별이 확실하고 다른 염색법과 병행 할 수 있다는 장점을 가진다(Talbot와 Chacon, 1981; Varner 등, 1987; Cross와 Meizel, 1989; Sanchez 등, 1995). 본 실험에서 동일 조건하의 소 정자에 대하여 위의 두 가지 염색법을 비교 검토한 결과, 생존성 판정에 있어 염색법 사이에 비슷한 결과를 보였으며 두 방법 모두 정자의 생사판별에 적합하였다. 정자의 검사목적, 정자 표본수 및 실험조건 등에 따라 eosin-nigrosin 염색은 정자의 생사판별과 형태검사를 할 때, trypan blue 염색은 침체반응검사를 위하여 다른 염색과 병용할 때 이용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

여러 포유동물에서 정자의 침체상태를 검사하는 것은 중요하며 그 이유는 침체가 정자의 수태능력과 직접적으로 연관되어 있기 때문이다(Yanagimachi, 1994). 소 정자를 광학현미경하에서 검사하기 위해 여러 가지 염색법이 개발되었는데(Cross와 Meizel, 1989; Cross와 Watson, 1994), Bryan과 Akruk(1974)은 처음으로 naphthol yellow S-erythrosin B로 소 정자의 침체염색을 시도하여 그 효용성을 제시하였으며, Lenz 등(1983)은 naphthol yellow S-erythrosin B로 염색하는 것이 소 정자의 침체반응을 검사하는데 가장 적합하다고 하였고, 전자현미경검사를 이용하여 이를 증명하였다. 그러나 이 방법은 정자 침체의 이상유무 검사만 가능하고 생사판정은 불가능하기 때문에 침체반응검사시 생존정자의 진성침체반응인지 아니면 사멸정자에서 변성에 의한 침체소실인지를 정확히 판정할 수 없는 단점이 있다고 하였으며, 이를 보완하기 위하여 정자의 생사판별과 침체검사를 동시에 할 수 있는 방법으로 Bismark brown, rose Bengal 및 trypan blue를 이용한 triple 염색이 개발되었다(Talbot과 Chacon, 1981). 그러나 이 방법은 사람, 마우스, 말과 염소의 정자를 검사하는 데는 유용하지만, 소에는 부적합하여 일관성 있는 결과를 얻을 수 없었다(Cross와 Meizel, 1989). 본 실험에서는 이러한 문제를 해결하고자 소 정자의 침체염색에 유용한 방법인 naphthol yellow S-erythrosin B 염색과 생사판별염색인 trypan blue 염색을 병용하여 효용성을 검토하였다. Trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색으로 생존율과 침체반응률을

동시에 검사한 군과 기존의 eosin-nigrosin 염색으로 생존율을 검사하고 naphthol yellow S-erythrosin B 염색으로 침체반응률을 검사한 군에서 일치되는 결과를 보여 trypan blue 염색과 naphthol yellow S-erythrosin B 염색이 서로의 염색을 방해하지 않고 정확한 생존율과 침체반응률을 검사할 수 있는 것으로 확인되었다. 더불어 eosin-nigrosin 염색과 naphthol yellow S-erythrosin B 염색으로 생사와 침체상태를 검사하는 것은 별개의 표본을 대상으로 하기 때문에 정자의 사멸에 의한 침체소실과 생존정자의 진성침체반응을 감별할 수 없어 결과의 신뢰도가 떨어지지만, trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색은 동일 표본을 대상으로 1차로 생사판정을 하고 2차로 생존정자 중에서만 침체반응검사를 하므로 정자의 사멸에 의한 변성의 결과인 침체소실을 완전히 배제할 수 있다는 장점이 있으며, 앞으로 소뿐만 아니라 다른 동물의 침체 검사시에도 응용이 가능할 것으로 생각된다.

적 요

소 정자의 침체염색은 eosin-nigrosin 염색으로 생사판정을 하고 naphthol yellow S-erythrosin B 염색으로 침체반응을 조사하는 것보다 trypan blue-naphthol yellow S-erythrosin B 염색으로 동시에 생사 및 침체반응 판정을 하는 것이 더 정확하고 효과적이었다.

참고문헌

- Barth AD and Oko RJ. 1989. Preparation of semen for morphological examination. In Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa. Iowa State University Press, pp:8-18.
- Bryan JHD and Akruk SR. 1977. A naphthol yellow S and erythrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. Stain Technology, 52:47-51.
- Cross NL and Meizel S. 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian

- sperm. Biol. Reprod., 41:635-641.
- Cross NL and Watson SK. 1994. Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. Theriogenology, 42:89-98.
- Herman HA, Mitchell JR and Doak GA. 1994. Evaluation of semen; extenders (processing); frozen semen; custom collection. In The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. Danville. IL. Interstate Publishers Inc. pp:59-142.
- Keel BA and Webster BW. 1990. Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. Boca Raton, FL. CRC press.
- Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL and Ax RL. 1983. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy, and *in vitro* fertilization. Biol. Reprod., 28:683-690.
- Sanchez R, Risopatron J, Sepulveda G, Pena P and Miska W. 1995. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: Effects of proteinase inhibitors. Theriogenology, 43:761-768.
- Talbot P and Chacon RS. 1981. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J. Exp. Zool., 215:201-208.
- Varner DD, Ward CR, Storey BT and Kenney RM. 1987. Induction and characterization of acrosome reaction in equine sperm. Am. J. Vet. Res., 48:1383-1389.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In *The physiology of reproduction*. (Knobil, E. and Neill, J.D. ed.). New York. Raven press, 189-318.

(접수일 : 2000. 4. 5 / 채택일자 : 2000. 4. 29)