

## Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류가 동결·융해정자의 운동성에 미치는 영향

유대중·정수룡·오인석·김홍률<sup>1</sup>·이계웅<sup>2</sup>·조성균·배인휴·양철주·공일근<sup>†</sup>  
순천대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

## Effect of Kind of Sugar Added in Tris-buffer on Motility of Post-thaw Spermatozoa in Canine

D. J. Yu, S. R. Jeong, I. S. Oh, H. R. Kim<sup>1</sup>, G. W. Lee<sup>2</sup>, S. G. Cho, I. H. Bae,  
C. J. Yang and I. K. Kong<sup>†</sup>

*Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University*

### SUMMARY

This study was conducted to evaluate the effect of sugar kinds and combination of various sugars, and straw size and pre-freezing time on motility of post-thaw spermatozoa in canine. In general, the extender was supplemented with fructose or glucose for semen freezing. The extender used in this study was Tris-citric acid extender (Tris-buffer) supplemented with 20% Egg-yolk, 8% glycerol, 1% Equex STM paste, and 70 mM sugars such as monosaccharide (fructose and xylose) and disaccharide (trehalose). To evaluate of sugar combination, the sugars supplemented in Tris-buffer were combined such as control (fructose, xylose, trehalose), two combinations (Fru + Tre, Fru + Xyl, Tre + Xyl) and three combinations (Fru+Tre+Xyl).

The motility after CASA analysis in Fru + Tre + Xyl was higher than those in fructose, trehalose, xylose, Fru + Tre, Fru + Xyl, Tre + Xyl (69 vs. 58, 61, 50, 65, 20, 54). However, the progressive motility after CASA analysis in Fru+Tre group was higher than those in fructose, trehalose, xylose, Fru + Xyl, Tre + Xyl, Fru + Tre + Xyl (59% vs. 47, 55, 42, 13, 49, 44%). The survival rate of post-thaw spermatozoa in 0.25 ml straw for 10 min pre-freezing was significantly higher than those in 0.25 ml straw for 10 min, 0.25 and 0.5 ml for 5 min (80 + 0.0 vs. 65 + 7, 68 + 16, 58 + 8%; P<0.05).

The results indicated that the progressive motility of post-thaw spermatozoa in 70 mM Fru + Tre (two combination) following CASA analysis and 0.25 ml straw for 10 min pre-freezing time could be better for freezing of semen in canine.

(Key words: canine, sperm, frozen, sugar, progressive motility)

\* 본 연구는 2000년 농특 현장애로기술개발과제의 지원에 의하여 수행되었음.

<sup>1</sup> 유우개량사업소 (Livestock Improvement Main Center, NACF).

<sup>2</sup> 진도개보육관리소 (Jindo-dog Breeding Management Center).

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail: ikong@sunchon.ac.kr

## 서론

회귀성 개과 동물의 정자보존과 유전자원의 보존차원 및 애완동물의 번식효율증진을 위한 동결정액 제조와 자궁내 인공수정의 필요성이 크게 대두되고 있다. 그 동안 개의 동결정액 제조를 위한 많은 연구가 있었으나, 연구분야는 다양하게 접근하고 있다. 즉, 희석제의 종류(Iguer-orada와 Versteegen, 2001; Nizanski 등, 2001; Rota 등, 2001), orvus ES paste 영향(Tsutsui 등, 2000a,b), glycerol 농도(Pena 등, 1998), 전립선액의 영향(Sirivaidyapong 등, 2001), 동결·용해속도(Fiser 등, 1993; Pena와 Linde-Forsberg, 2000a), 정자농도와 용해속도(Pena와 Linde-Forsberg, 2000b), 당의 첨가종류(Lapwood와 Martin, 1966; Garcia와 Graham, 1989; Aslam 등, 1992; Yildiz 등, 2000) 등에 관하여 보고되었다.

완충액에 첨가되는 당은 다양한 기능을 나타내고 있다. 당은 정자에 대사에너지 제공하고, 희석액의 삼투압을 유지할 뿐만 아니라 동결보호제로서의 역할을 한다(Watson, 1979). 희석제에 사용되는 완충액의 종류(Abdelhakeam 등, 1991), 당의 분자량(Molinia 등, 1994) 및 저장온도(Lapwood와 Martin, 1966)는 당의 동결보존능력에 영향을 미친다. Tris-buffer에 glucose나 fructose를 첨가한 연구 보고는 많았으며, 최근에 단당류, 이당류 및 삼당류 등의 다양한 당의 종류에 따른 연구보고도 있었다(Yildiz 등, 2000). 그러나 당의 종류를 이중, 삼중첨가에 대한 연구보고는 이루어진 바 없었다.

본 연구에서는 당의 종류뿐만 아니라 이들을 2종류 또는 3종류의 당을 조합하여 Tris-buffer에 첨가하여 정액의 동결·용해 후 운동성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

정액채취와 동결정액 제조를 위해 공시되는 진도개는 전남 진도군 진도개보육관리소의 사육장에서 선발된 종견을 순천대학교의 사육장에서 물과

사료를 자유급식시키면서 사육하였다. 공사견은 총 4두로 생후 12~24개월령의 혈통관리된 종견이었으며 사육장의 견방당 1마리씩 단독사육을 원칙으로 사육 관리하였다. 본 연구 결과를 토대로 진도개의 선발은 진도군에서 사육되고 있는 진도개 순종중에서 외모심사규정에 의해 우수한 진도개를 선발하여 장차 인공수정 및 유전자원보존 등에 이용할 수 있는 종견으로 활용하기로 하였다.

### 2. 정액채취 및 관리

정액채취는 1~2년생 진도개를 주당 1~2회씩 마사지법과 인공질법을 병행 실시하였다. 정액채취 수캐는 정액채취대로 읍기고 10 ml tube를 semen collection cone (AG-TEK, KANE Enterprises, S. Dakota, USA)에 연결시키고 음경을 마사지하여 발기와 돌출을 유도하여 돌출된 음경의 구선부위(bulbus glandis)를 잡고 압력을 가하면서 음경을 인공질에 삽입하여 채취하였다. 이때 음경에 상처를 주지 않고 적당한 압력을 주면서 2차 fraction (sperm-rich fraction)만을 인공질을 이용하여 채취하였고, 정상적인 정액만을 택하여 400×g로 약 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 37°C의 2 ml Ext I으로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

### 3. 동결정액 제조를 위한 희석액 제조 및 동결처리

동결정액 제조를 위한 Tris-buffer는 Rota 등(1997)의 방법에 준하여 제조하였는데 이의 조성표는 Table 1과 같다. Ext II에만 8% glycerol(최종 4%)과 1% Equex STM paste(최종농도 0.5%)를 첨가하였다. 이렇게 제조된 Ext I, II의 최종 pH(6.53, 6.48), Osmolality(280, 1,370 mOsm/kg)로 조정되었다. 원정액의 정자수(농도), 활력과 생존율 등을 조사하여 동결정액 제조의 가능 여부를 판단하여 동결이 가능한 정액을 Ext I으로 희석하여 5°C cold room에서 2시간 정도 방치하여 5°C까지 냉각시켜 같은 온도의 동량 Ext II를 약 1시간에 걸쳐 희석, 평형을 유도하였다. 평형후 최종농도가  $50 \times 10^6$  cells/ml 되게 조정후 0.5 ml straw에 충전 봉합하여 액체질소 표면 10 cm 위에서 예비동결을 유도하였다. 예비동결된 straw는 액체질소에 침지하

Table 1. Composition of Tris-buffer extender for semen freezing in canine

Compounds	Extender I	Extender II
Tris	3.028 g	3.028 g
Citric acid	1.678 g	1.678 g
Fructose	1.0 g	1.0 g
Penicillin-G/Streptomycin	1 ml	1 ml
Egg yolk	20 ml	20 ml
Glycerol	-	8 ml
Equex STM paste	-	1 ml
D.W.	To 100 ml	To 100 ml
pH	6.53	6.48
Osmonality	280 mOsm/kg	1,370 mOsm/kg

여 동결정액 제조를 완료하였고, goblet에 담아 LN<sub>2</sub> tank에 넣어 보존하였다. 동결정액의 용해는 37°C에서 20초간 실시하고 가온판이 부착된 현미경하에서 정액의 활력과 생존율을 검사하고 CASA 검사로 정액의 운동성을 평가하여 인공수정 이용 여부를 판단하였다

#### 4. 동결정액의 CASA 검사

동결된 정액의 현미경검사는 주관적인 판단 및 평가가 수반되므로 보다 정확하고 객관적인 평가가 가능한 CASAs(Computer-assisted semen analysis : Hamilton)를 이용한 정액의 운동성을 조사하였다. 검사정액 10 μl를 취하여 microcell slide에 넣고 현미경검사를 하였으며, 조사항목은 MOT(운동정자 비율, %), PROG(전진운동정자비율, %), VAP(정자의 초당 평균이동속도, μm/sec), VCL(정자의 초당 평균곡선이동속도, μm/sec), VSL(정자의 초당 평균직선이동속도, μm/sec), ALH(추두거리, μm) 등으로 정액의 운동성을 종합적으로 조사 평가하였다.

#### 5. 통계처리

이상의 연구에서 얻어진 결과는  $\chi^2$  test에 의하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 당의 조합방법 및 동결·용해 정자의 운동성

Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류와 조성비율은 Table 2에서와 같다. 단당류인 fructose와 Xylose 및 2당류인 Trehalose의 첨가농도는 최종적으로 70 mM이 되도록 조정하였다. Fru + Tre, Fru + Xyl, Tre + Xyl의 이중조합군은 각각 35 mM씩 70 mM로, Fru + Tre + Xyl의 3중 조합군은 25 + 25 + 20 mM씩 최종 70 mM로 조정하였다.

이렇게 조성된 희석액으로 동결보존액을 제조하여 동결·용해 정자의 운동성을 조사하기 위하여 CASA system으로 평가한 자료는 Table 3에서와 같다. 운동성은 Fru + Tre + Xyl, Fru + Tre, trehalose, fructose구가 xylose, Fru + Xyl, Tre + Xyl 구보다 유의적으로 높았다(69, 65, 61, 58 vs. 50, 20, 54%; P<0.05). 또한 수정율과 유의성이 높은 전진운동율은 Fru + Tre, trehalose구가 fructose, xylose, Tre + Xyl, Fru + Tre + Xyl보다 높았으며,

Table 2. Sugar combinations, kinds and mol concentration

Type	Kinds of sugar	Mol conc. (mM)
Alone	Fructose	70
	Trehalose	70
	Xylose	70
Two comb.	Fru + Tre	35 + 35
	Fru + Xyl	35 + 35
	Tre + Xyl	35 + 35
Three comb.	Fru + Tre + Xyl	25 + 25 + 20

Fru + Xyl구는 여타 다른 처리구보다 유의적으로 낮은 성적을 얻었다.

Yildiz 등(2000)은 fructose, galactose, glucose, xylose, lactose, trehalose, maltose, sucrose, raffinose 및 대조구에서 각각 60.0, 50.0, 47.9, 65.7, 50.7, 59.3, 43.6, 38.6, 58.6, 50.7%의 운동성을 보고하였다. 본 연구에서는 단독처리구인 fructose와 trehalose에서 각각 58.0, 61.0%의 운동성을 보여 유사한 결과를 얻었다. 그러나 Fru + Tre, Fru + Tre + Xyl 처리구에서는 65.0, 69.0%의 높은 운동성을 얻어 보다 효과적인 조합인 것으로 판단되었다. 또한 전진 운동율은 Fru + Tre와 Trehalose구에서 59.0, 55.0 %의 높은 성적을 얻어 효과적인 조합인 것으로 판단되었다. 특히 전진운동율은 수정율과 유의성이 매우 높은 관계로서 전진운동율이 가장 높은 Fru + Tre처리구가 가장 효과적인 것으로 판단되었다.

다양한 희석액이 개 정액의 안전한 동결보존을 위하여 보고되었다(Foote, 1964; Hay 등, 1997; Ivanova-Kicheva, 등, 1997; Olar 등, 1989). Lactose-based 희석액은 pellets으로 동결보존으로 이용하고자 하였고(Seager 등, 1975), Tris-citric acid 희석액은 straws에 동결정액을 제조하고자 하였다(Battista 등, 1988). 따라서 본 연구에서는 Tris-citric acid 희석액을 이용해 straws에서 개의 동결보존을 실시하고자 하였다.

정자에 대한 당의 동결보존능력은 저장온도(Lapwood와 Martin, 1966), 당의 분자량(Molinia 등, 1994) 및 사용되는 완충액의 종류(Abdelhakeam 등, 1991)에 따라 다를 것이다. Molinia 등(1994)은

단당류는 Tris-citrate 희석액에서 면양의 정자를 동결보존할 때 2당류보다는 단당류가 더 적합하다고 보고하였다. Garcia와 Graham(1989)은 3당류는 소 동결정액의 용해 후 운동성에 단당류나 2당류보다 효과적이지 못하다고 지적하였다. Yildiz 등(2000)은 용해 후 운동성이 xylose나 fructose에서는 증가되었다고 보고하였는데 본 연구와 유사한 결과이나 2중 조합 및 3중 조합 중에서 Fru + Tre, Fru + Tre + Xyl의 구에서 더욱더 운동성이 높은 결과를 보여 당의 조합에 의한 새로운 희석제의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

## 2. 예비동결시간과 straw size가 정자의 운동성에 미치는 영향

개의 동결정액 제조를 위해서 예비동결시간과 straw size에 대한 비교실험결과는 Table 4에서와 같다. 예비동결 10분과 0.25 ml straw를 이용했을 때 80±0.0로서 5분 예비동결과 0.25, 0.5 ml straw 및 10분 예비동결과 0.5 ml straw보다 유의적으로 높은 용해 후 운동성을 얻었다 (68±16; 58±8.0; 65±7.0; P<0.05).

실제 개 동결정액 제조는 straw 당 5천만으로 제작하고 정액채취 시 2~5억 정도의 정자농도이기 때문에 0.25 ml straw를 이용해서 제작하기에 어려움이 있다. 그리하여 일반적으로 0.5 ml straw를 이용하고 제작하고 있는데, 만약 0.25 ml straw로 제작하면 straw당 농도를 계산하여 제작함으로써 straw 숫자가 줄면서도 Ext I, II의 volume이 줄어들기 때문에 희석제의 영향과 동결보호제의 실제

Table 3. Effect of sugar kind in Tris-buffer on post-thaw motility analyzed in canine

Kind of sugar	MOT (%)	PROG(%)	VAP(mic/s)	VCL(mic/s)	VSL(mic/s)	LIN(%)	STR(%)	ALH(mic.)
Fructose	58 <sup>a</sup>	47 <sup>b</sup>	59	81	51	63	83	4.1
Trehalose	61 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>	45	64	40	63	88	4.4
Xylose	50 <sup>b</sup>	42 <sup>b</sup>	48	70	43	82	82	4.5
Fru+Tre	65 <sup>a</sup>	59 <sup>a</sup>	67	87	64	94	94	4.7
Fru+Xyl	20 <sup>c</sup>	13 <sup>c</sup>	52	80	44	83	83	5.2
Tre+Xyl	54 <sup>ab</sup>	49 <sup>b</sup>	66	40	60	86	86	4.8
Fru+Tre+Xyl	69 <sup>a</sup>	44 <sup>b</sup>	45	65	41	60	87	4.2

\* Values with different superscripts in the same column were significant difference (P<0.05).

Table 4. Effect of pre-freezing time and straw size on post-thaw spermatozoa motility in canine

Pre-freezing time (Min.)	Straw size (ml)	Post-thaw motility (Mean±S.E.)
5	0.25	68±16 <sup>b</sup>
	0.5	58±8.0 <sup>b</sup>
10	0.25	80±0.0 <sup>a</sup>
	0.5	65±7.0 <sup>b</sup>

\* Values with different superscripts were significant difference (P<0.05).

적인 영향이 정확하게 미치기 하기 어려운 점이 있다. 그러나 본 연구결과에서는 10분 예비동결과 0.25 ml straw를 이용할 때 가장 효과적인 점을 고려한다면 실용화 시키기 위해서는 인공수정 시 동결정액의 농도를 낮출 수 있는 방법 또는 동결용해 후 생존성의 향상 등을 개선해야 할 필요성이 있다.

동결정액 제조 시 예비동결의 시간은 약 10분 정도가 적당한 것으로 판단되었다. 예비동결을 10분 정도 함으로서 충분한 예비동결시간을 부여함으로써 안정적인 예비동결을 유도할 수 있을 것으로 판단되었다.

## 적 요

본 연구는 개의 동결정액 제조 시 동결보호 회석액 내에 첨가되는 당의 종류와 조합이 동결용해 후 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향과 정자동결 시 straw size가 생존율에 미치는 영향에 대하여 조사하고자 실시하였다.

회석액은 Tris-citric acid extender(Tris-buffer)의 기본용액에 20% Egg-yolk, 8% glycerol, 1% Equex STM paste 등을 첨가하였으며, 당 성분으로는 monosaccharide(fructose 및 xylose) 및 disaccharide (trehalose)로 구분하여 최종 70 mM의 농도로 첨가 이용하였다. 본 연구에서는 control (fructose, xylose, trehalose), two combination (Fru + Tre, Fru + Xyl, Tre + Xyl) 및 three combination (Fru + Tre

+ Xyl)으로 구분하여 Tris-buffer에 첨가하였다.

Fru + Tre + Xyl처리구에서 CASA분석 후 운동성이 fructose, trehalose, xylose, Fru + Tre, Fru + Xyl, Tre + Xyl 처리구에 비해 가장 높았다 (69% vs 58, 61, 50, 65, 20, 54%). 또한 전진운동율은 Fru + Tre 처리구가 fructose, trehalose, xylose, Fru + Xyl, Tre + Xyl, Fru + Tre + Xyl 처리구에 비해 가장 높았다 (59% vs 47, 55, 42, 13, 49, 44 %). 이러한 결과를 바탕으로 Tris-buffer에 Fru + Tre를 첨가하여 실험을 수행하였다. 예비동결 10분에서 0.25 ml straw를 이용하였을 때 10분 예비동결에 0.5 ml, 5분 예비동결에 0.25 및 0.5 ml straw 처리구보다 유의적으로 높은 생존율을 얻었다 (80 + 0.0 vs. 65 + 7, 68 + 16, 58 + 8%).

본 연구결과 70 mM Fru+Tre (two combination)가 첨가구가 가장 높은 전진운동율을 얻었으며, 0.25 ml straw에 10분간 예비동결을 실시하는 것이 가장 높은 동결용해 후 생존율을 얻을 수 있었다.

## 참고문헌

- Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA and Chaloner KM. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology*, 28:43-49.
- Aslam M, Ahmad KM, Ahmad M and Gill SA. 1992. Additive effects of carbohydrates in tris as bull semen extenders equilibration for three od five hours. *Pakistan Vet. J.*, 12:174-177.
- Battista M, Parks J and Concannon P. 1988. Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, tris or TEST extenders. *Proc. XI Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem.*, 3:229 (Abstr.)
- Fiser PS, Fairfull RW, Hansen C, Panich PL, Shrestha JN and Underhill L. 1993. The effect

- of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol. Reprod. Dev.*, 34(2):190-195.
- Foote RH. 1964. Extenders for freezing dog semen. *AM. J. Vet. Res.*, 25:37-39.
- Garcia MA and Graham EF. 1989. Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effects of sugars and sugar alcohols on post thaw motility. *Theriogenology*, 31:1029-1037.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP and Goodrowe KL. 1997. Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, 48:1329-1342.
- Iguer-ouada M and Versteegen JP. 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55(2):671-684.
- Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N and Somlev B. 1997. Cryopreservation of canine semen in pellets and 5 ml aluminium tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48:1343-1349.
- Lapwood KR and Martin ICA. 1996. The use of monosaccharides, disaccharides and trisaccharides in synthetic diluents for the storage of ram spermatozoa at 37°C and 5°C. *Aust. J. Biol. Sci.*, 19:655-671.
- Molinia FC, Evans G and Maxwell WMC. 1994. *In vitro* evaluation of zwitter ions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.*, 34:491-500.
- Nizanski W, Dubiel A, Bielas W and Dejneka GJ. 2001. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57: 365-369.
- Olar TT, Bowen RA and picket BW. 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straw. *Theriogenology*, 31:451-461.
- Pena A and Linde-Forsberg C. 2000a. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54(6):859-875.
- Pena A and Linde-Forsberg CB. 2000b. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54(5):703-718.
- Pena AI, Barrio F, Quintela LA and Herradon PG. 1998. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, 50(1):163-174.
- Seager SWJ, Platz CC and Fletcher WS. 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. *J. Reprod. Fert.*, 45:189-192.
- Rota A, Frishling A, Vannozzi I, Camillo F and Romagnoli S. 2001. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57:377-381.
- Sirivaidyapong S, Ursem P, Bevers MM and Colenbrander B. 2001. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. (Suppl)*, 57:383-386.
- Tsutsui T, Hase M, Hori T, Ito T and Kawakami E. 2000a. Effects of orvus ES paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing. *J. Vet. Med. Sci.*, 62(5):533-535.
- Tsutsui T, Hase M, Hori T, Komoriya K, Shimizu N, Nagakubo K and Kawakami E. 2000b. Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J. Vet. Med. Sci.*, 62(5):537-538.
- Watson PF. 1979. The preservation of semen in mammals. In: Finn CA (ed), *Oxford Reviews of Reproduction of Biology*. Oxford: Oxford University Press, 283-351.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M and Tekeli T. 2000.

Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing.

Theriogenology, 54(4):579-585.

---

(접수일: 2002. 7. 26/ 채택일: 2002. 8. 13)