

Flow Cytometry에 의한 개 신선정액과 동결정액의 생존성 분석

홍유미 · 김용준[†] · 유일정 · 지동범¹ · 김명순²

전북대학교 수의과대학 산과학실

초 록

Flow cytometry를 이용하여 개 정자의 생존율 평가를 수행하고자 2-4세의 수캐 5두가 이용되었고, 분석을 위해 PI염색을 실시하였다. Flow cytometry를 이용한 개 신선 정액의 생존율 평가는 생존 정자와 죽은 정자의 비율을 1:0, 1:1, 1:3으로 조성하여 이를 flow cytometry로 평가하고 광학현미경검사, CFDA/PI염색검사, HOS test에 의한 생존율과 비교하여 flow cytometry와의 상관관계를 알아보았다. 또한 개 정액을 동결하여 용해 후의 개 정자의 생존율 평가에도 동일한 방법으로 상관관계를 조사하였다. 신선 정액에서 생존 정자와 죽은 정자의 비율이 1:0, 1:1, 1:3 모든 경우에서 flow cytometry를 이용한 생존율은 HOS test에 의한 생존율과 높은 상관관계를 나타내었다 ($p<0.01$). 신선 정액에서 생존 정자와 죽은 정자의 비율이 1:0과 1:3일 때 광학현미경적 검사에 의한 생존율은 flow cytometry 분석에 의한 생존율과 유의적인 상관관계를 나타내었으나 ($p<0.05$), 1:1 비율의 경우 상관관계를 보이지 않았다. 신선 정액에서 생존 정자와 죽은 정자의 비율이 1:0과 1:1일 때 CFDA/PI 염색 검사에 의한 생존율은 flow cytometry 분석에 의한 생존율과 높은 상관관계를 보였으며($p<0.01$), 1:3 비율에서는 유의적인 상관관계를 보였다 ($p<0.05$). 동결 및 용해 후의 개 정자의 생존율 평가에서 HOS test 결과는 flow cytometry 분석에 의한 생존율과 높은 상관관계를 보였으며 ($p<0.01$), 광학현미경적 검사를 통한 생존율은 유의적인 상관관계를 보였으나 ($p<0.05$), CFDA/PI 염색 검사결과는 상관관계를 보이지 않았다. 이상의 결과 flow cytometry는 신선정액 및 동결·용해 후 개 정자에 대한 생존율 검사에 정확한 평가 방법인 것으로 판단되었다.

(주제어 : Dog sperm viability, Flow cytometry, Microscopic evaluation, Carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide, Hypoosmotic swelling test)

서 론

Flow cytometry는 짧은 시간 내에 정자의 형태적, 기능적 특징의 여러 항목을 동시에 측정할 수 있어 기존의 실험실적 검사나 형광현미경적 검사에 비하여 시간경과에 따른 정액 성상의 변화를 최소화할 수 있다. 또한 수천에서 수만 개의 정자를 동시에 분석하기 때문에 상대적으로 적은 수를 검사하는 기존 실험실적 검사에 비하여 객관성 있는 분석이 가능하다.

형광염색을 이용한 현미경적 검사의 경우, 정자의 미세량의 형광물질도 검출이 가능하기 때문에 정자 이외의 기타 희석액, 부유물들을 제거하지 않고도 분석이 가능하다.

Flow cytometry를 이용한 정자에 대한 연구는 Pinkel 등(1979)에 의하여 정자의 형태분석을 시작으로 그 후 Evenson 등(1982)은 첨체 손상 여부 및 미토콘드리아의 기능, Johnson 등(1989)은 정자의 DNA 분석과 성 분리에 관한 연구에 까지 미치고 있다.

최근에는 여러 가지 형광물질을 이용한 정자의 분석에 있어서 flow cytometry 분석이 여러 종의 동물 정자에서 이루어지고 있으며 기존의 형광현미경 검사법과도 밀접한 상관관계를 보이고 있다. Garner 등(1986)은 CFDA-PI로 염색된 정자를 flow cytometry로 분석하였으며, Harrison과 Vicker(1990)는 마우스, 기니아 피그, 양, 돼지, 사람의 정자를 carboxyfluorescein diacetate(CFDA)와 propidium iodide(PI)로 이중 염색하여 형광현미경하에서 정자의 생존성을 관찰하였다. Pena 등(1999)은 개 정자를 Carboxy-SNARE-1, PI, fluorescein isothiocyanate-conjugated pisum sativum agglutinin(FITC-PSA)로 염색하여 형광현미경과 flowcytometry를 이용하여 정자의 생존성과 첨체의 손상 여부를 검사하였다.

CFDA는 세포막 투과성이 있는 비형광물질로서 세포내의 estrase에 의하여 carboxyfluorecein이라는 세포막 비투과성인 형광물질로 변화되어 세포막에 침착되어 세포막이 녹색 형광을 띄게 된다. PI는 죽은 정자 또는 손상된 세포질막을 지닌 정자두부의 DNA와 결합하는 형광물질로서 붉은색 형광을 띄게 된다. 그러므로 정자를 PI로 염색한 후 flow cytometry에 의한 분석을 수행할 경우 사멸 정자율과

¹ 지동범 동물병원(Ji Dong-Beom Animal Clinic, Busan, Korea).

² 우석대학교 생물학과(Dept. of Biology, College of Natural Science, Woosuk University, Jeonju, Korea).

[†] Corresponding author : Y. J. Kim, Dept. of Theriogenology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756, Korea. E-mail: yjk@chonbuk.ac.kr

동시에 생존 정자율을 구할 수 있다고 판단된다. 이와 같이 PI만으로 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 개 정자에 대한 생존율을 조사한 보고는 별로 접할 수가 없다.

따라서 본 연구에서는 flow cytometry를 이용하여 PI로 염색된 신선정액에서 개 정자의 생존율을 평가하고 이를 기존의 여러 정자생존율 평가 방법과 비교하여 flow cytometry와의 상관관계를 검토하였으며, 또한 동결·융해 후 PI로 염색된 개 정자의 생존율 평가에도 적용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험동물

과거 번식력이 있고, 임상 검사상 건강하다고 확인된 2~4세의 beagle 2두, maltese 2두, shitzu 1두의 수개 총 5두 (3~10 kg)를 이용하였다.

정액의 처리

정액은 수지법을 이용하여 개체당 주 1회로 오후 1~2시 사이에 채취하였고, 정자농도가 높은 2분획을 중심으로 채취하였다. 채취한 정액의 일부를 취하여 각 개체당 정자의 활력, 형태 및 정자수를 검사한 후 700×g, 5분 동안 원심분리하여 정장을 제거하였다.

정자 pellet을 Tris buffer(pH 7.2)로 희석하고 정자 수를 40×10^6 cells/ml로 조정하였다. 희석된 정액 900 μ l에 10 μ l의 PI (1mg/ml)를 첨가한 후 37°C에서 15분간 배양하였다.

Flow Cytometry 분석

개 정자의 생존율 판정을 위한 flow cytometry 분석은 FACS Vantage(Becton Dickinson, USA)를 이용하였다. 488nm에서 작동하는 air-cooled, 15-mW argon laser를 사용하였고 forward scatter(FS)와 side scatter(SS)를 이용하였다. PI는 붉은 형광을 띄게 되며 645nm dichroic long-pass filter와 620nm band-pass filter를 통해 FL3에서 분석되었으며 각 sample당 10,000개의 정자가 분석되었다.

형광현미경 검사

정자의 생존율 판정을 위한 형광현미경 검사를 위하여 carboxyfluorescein diacetate (CFDA)와 propidium iodide (PI)로 혼합염색을 실시하였다. 정자수가 40×10^6 cell/ml로 미리 조정된 정액을 1시간 전에 미리 준비된 CFDA/PI 용액으로 1:3의 비율로 희석 후 37°C에서 20분간 배양하였다. CFDA/PI 용액은 Harrison과 Vicker(1990)의 방법에 따라 제조하였다. 배양 후 정자가 포함된 용액을 슬라이드그라스 위에 떨어뜨린 후 형광현미경(400×)으로 관찰하였으며, 각 슬라이드그라스당 200마리의 정자를 조사하였다. 생존 정자와 죽은 정자의 구분은 Fig. 1과 같이 CFDA에 염색된 정자를 생존정자로, PI로 염색된 정자를 죽은 정자로 구분하였다.

현미경적 검사(Microscopic Evaluation)

30 μ l의 정액을 슬라이드그라스 위에 떨어뜨리고 커버글

라스로 덮은 후 광학현미경 (400×)으로 sperm progression system (Mortimer, 1994)에 기준하여 poor 이상의 정자의 퍼센트를 주관적으로 관찰하였다.

Hypoosmotic Swelling(HOS) Test

HOS test는 김 등(2000)의 방법에 준하여 행하였다. 정자를 fructose solution(60mOsm)에 첨가하여 37°C에서 45분 동안 배양시킨 후 위상차 현미경(400×)으로 200마리의 정자를 검사하였다. curled되거나 swollen된 정자를 백분율로 계산하여 평균율을 구하였다. Fig. 2와 같이 curled된 정자(화살표)는 생존정자로 분류하였다.

실험처리

생존 정자와 죽은 정자의 비율이 1:0, 1:1, 1:3의 비율일 때 Flow Cytometry를 이용한 생존율 평가 : 생존 정자와 죽은 정자군의 인위적 처리는 정액을 37°C에서 배양시켰으며(생존 정자군), 한편으로는 액체질소 (LN₂)에 3회 침적시킨 후

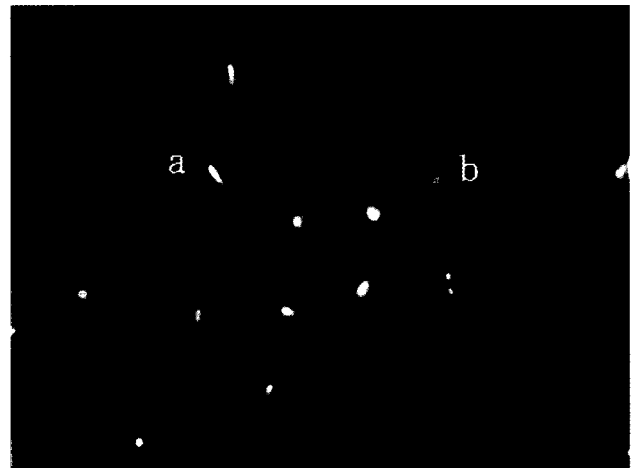


Fig. 1. Dog spermatozoa stained with CFDA/PI. a: FDA-positive cell (Live cell), b: PI-positive cell (Dead cell).



Fig. 2. HOS test for dog spermatozoa.

후 37°C에서 용해하였다(죽은 정자군). 생존 정자와 죽은 정자의 비율을 각각 1:0, 1:1, 1:3의 비율로 혼합하여 flow cytometry로써 생존율을 평가하는 동시에 현미경적 검사, CFDA/PI 염색, HOS test를 행하였다.

Flow Cytometry를 이용한 동결 및 용해 후의 개 정자에 대한 생존율 평가 : 정액을 700×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 정자 pellet을 3% glycerin이 함유된 Equex 첨가 Sweden 희석액(Rota 등, 1997)으로 1:2의 비율로 희석하였다. 희석이 끝난 정액을 4°C에서 1.5시간 동안 평형(equilibration)하였다. 평형이 끝난 후 7% glycerin이 함유된 Sweden 희석액으로 1:2의 비율로 2차 희석하였으며, 0.5ml straw에 충전하였다. 정자가 담긴 straw를 액체질소가 담긴 polystyrene box에 옮겨 액체질소 표면 4cm 위에서 15분 동안 동결하여 LN2 tank에 침전하였다. 동결정자의 용해는 70°C의 물에 8초간 침전하여 행하였다. 용해된 정자는 Tris-Fructose- Citrate(TFC)를 첨가하여 15분 동안 배양하였다. TFC는 증류수 100ml에 Tris 3.025g, Fructose 1.25g, Citrate 1.75g를 첨가하였다. 용해 후 flow cytometry를 이용하여 정자의 생존율 평가하고 이를 다른 정자 생존율 평가방법인 현미경적 검사(ME: microscopic evaluation), CFDA/PI 염색 및 HOS test의 결과와 비교하였다.

통계처리

Flow cytometry를 이용한 생존율 평가와 기타 생존율 평가의 결과들의 상관관계를 검토하기 위하여 SAS (statistical analysis system)를 이용하여 Pearson상관계수를 구하였다.

결 과

신선정액을 이용하여 생존 정자와 죽은 정자의 혼합비율을 각각 1:0, 1:1, 1:3으로 조정하였을 때 PI 염색후 flow cytometry를 이용한 생존율 평가의 결과는 Fig. 3~5와 같다.

Dot-plot과 histogram 상에서 PI로 염색된 신선정액은 전반적으로 두 그룹으로 표시되었으며, dot-plot 상에서 4등분의 하단 왼쪽그룹과 histogram 상에서 왼쪽 그룹은 PI-negative 그룹으로 생존 정자를 나타내고 dot-plot 상에서, 오른쪽 그룹과 histogram 상에서 4등분의 하단 오른쪽 그룹은 PI-positive 그룹으로 죽은 정자를 나타낸다. Fig. 3~5를 연계성을 두고 관찰하였을 때 죽은 정자의 비율이 증가함에 따라 dot-plot의 4등분의 하단 오른쪽 그룹과 histogram상의 우측그룹이 점차 증가한 것으로 나타났다.

신선정액을 이용하여 생존 정자와 죽은 정자의 비율을 각각 1:0, 1:1, 1:3 으로 하였을 때 flow cytometry와 현미경적 관찰, CFDA/PI 염색, HOS test를 한 결과 정자의 생존율은 Fig. 6과 같다.

Fig. 6에서와 같이 모든 평가방법에서 정자를 사멸되게 처리한 비율이 높을수록 정자의 생존율은 감소하는 경향을 나타내었다. 정자의 생존성을 확인하는 평가방법에 따른

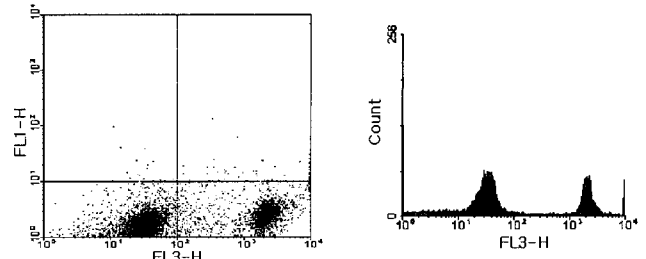


Fig. 3. Dot-plots and histograms of PI-stained spermatozoa by flow cytometry at ratio of 1:0 of live and dead spermatozoa.

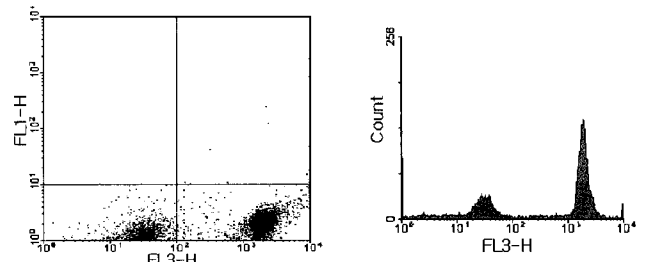


Fig. 4. Dot-plots and histograms of PI-stained spermatozoa by flow cytometry at ratio of 1:1 of live and dead spermatozoa.

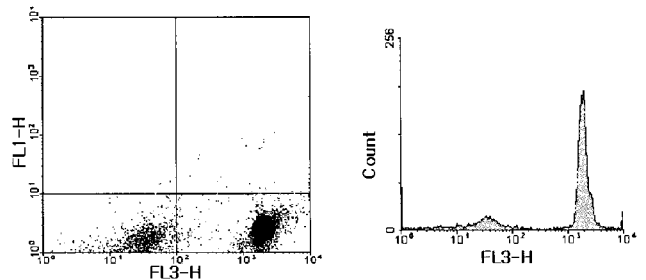


Fig. 5. Dot-plots and histograms of PI-stained spermatozoa by flow cytometry at ratio of 1:3 of live and dead spermatozoa.

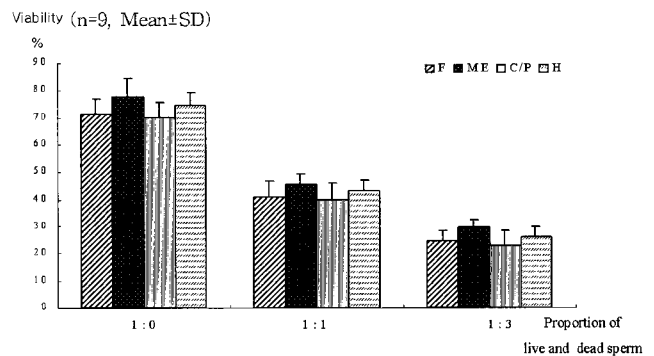


Fig. 6. Fresh sperm viabilities evaluated by four different assays according to proportions of live and dead spermatozoa.

F: flow cytometry, ME: microscopic evaluation, C/P: CFDA/PI staining, H: HOS test.

유의적인 차이는 없었다.

개 신선정액을 이용하여 생존 정자와 죽은 정자의 비율을 1:0으로 처리하였을 때 flow cytometry를 이용한 생존율 평가의 결과와 기타 기존의 실험실적 평가방법에 의한

결과와의 상관관계는 Table 1과 같다.

Table 1에서와 같이 flow cytometry를 이용한 생존율 평가는 C/P 검사 및 HOS test 결과와 고도의 상관관계를 나타내었으며($p < 0.01$), ME 검사 결과와의 비교에서도 유의성 있는 상관관계를 나타내었다($p < 0.05$).

개 신선정액을 이용하여 생존 정자와 죽은 정자의 비율을 1:1로 처리하였을 때 flow cytometry를 이용한 생존율 평가의 결과와 기타 기존의 실험실적 평가방법에 의한 결과와의 상관관계는 Table 2와 같다.

Table 2에서와 같이 flow cytometry를 이용한 생존율 평가 결과는 C/P 검사 및 HOS test 결과와 고도의 상관관계를 나타내었으나 ($p < 0.01$), ME 검사 결과와의 비교에서는 상관관계를 나타내지 않았다.

개 신선정액을 이용하여 생존 정자와 죽은 정자의 비율을 1:3으로 처리하였을 때 flow cytometry를 이용한 생존율 평가의 결과와 기타 기존의 실험실적 평가방법에 의한 결과와의 상관관계는 Table 3과 같다.

Table 1. Correlations among sperm viabilities evaluated by flow cytometry, by microscopic evaluation, by CFDA/PI staining and by HOS test at ratio of 1:0 of live and dead spermatozoa (n=9)

Comparison	r	Significance
F vs. ME	0.7736	0.0145
F vs. C/P	0.9201	0.0004
F vs. HOS	0.8678	0.0024

F: flow cytometry, ME: microscopic evaluation, C/P: CFDA/PI staining, H: HOS test.

Table 2. Correlations among sperm viabilities evaluated by flow cytometry, by microscopic evaluation, by CFDA/PI staining and by HOS test at ratio of 1:1 of live and dead spermatozoa (n=9)

Comparison	r	Significance
F vs. ME	0.4611	0.2115
F vs. C/P	0.9087	0.0007
F vs. HOS	0.9302	0.0003

F: flow cytometry, ME: microscopic evaluation, C/P: CFDA/PI staining, H: HOS test.

Table 3. Correlations among sperm viabilities evaluated by flow cytometry, by microscopic evaluation, by CFDA/PI staining and by HOS test at ratio of 1:0 of live and dead spermatozoa (n=9)

Comparison	r	Significance
F vs. ME	0.7710	0.015
F vs. C/P	0.7549	0.0187
F vs. HOS	0.8630	0.0027

F: flow cytometry, ME: microscopic evaluation, C/P: CFDA/PI staining, H: HOS test.

Table 3에서와 같이 flow cytometry를 이용한 생존율 평가 결과는 HOS test 결과와 고도의 상관관계를 나타내었고 ($p < 0.01$), C/P 검사 및 ME 검사의 결과와의 비교에서는 유의성 있는 상관관계를 나타내었다 ($p < 0.05$).

동결전과 용해후의 개 정액을 flow cytometry와 광학현미경 검사 (ME), CFDA/PI 염색 검사 (C/P), HOS test를 이용하여 생존율을 평가한 결과는 Fig. 7과 같다.

Fig. 7에서와 같이 모든 평가방법에서 정자를 동결하기 전의 생존율과 용해후 정자의 생존율은 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타내지 않았다.

개 정자의 동결 및 용해 후 flow cytometry를 이용한 정자의 생존율 평가 결과와 기타 검사 방법에 의한 결과와의 상관관계는 Table 4와 같다.

Flow cytometry를 이용한 생존율 평가 결과는 HOS test 결과와 고도의 상관관계를 나타내었고($p < 0.01$) ME 검사 결과와는 유의성 있는 상관관계를 나타내었다($p < 0.05$). 그러나 C/P 검사 결과와는 상관관계를 나타내지 않았다.

고찰

본 연구에서 신선 정액을 이용하여 생존 정자와 죽은 정자의 혼합비율을 1:0, 1:1, 1:3으로 조성하여 PI 염색 후 flow cytometry에 의한 생존율 검사를 실시한 결과 각 혼합비율에서 dot-plot 및 histogram 모두 두 개의 집단이 표시되었고 죽은 정자의 비율이 증가함에 따라 우측 PI 염색 집단이 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은

Viability (n=11, Mean±SD)

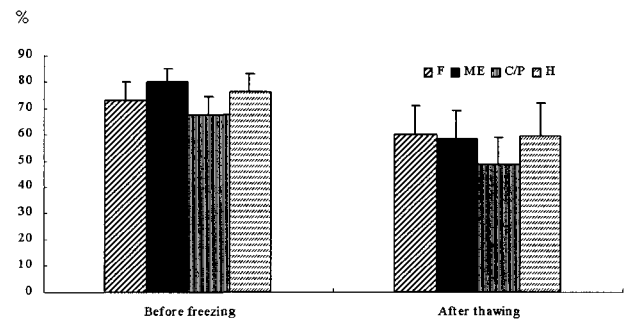


Fig. 7. Frozen-thawed sperm viabilities evaluated by four different assays. F: flow cytometry, ME: microscopic evaluation, C/P: CFDA/PI staining, H: HOS test.

Table 4. Correlations among frozen-thawed sperm viabilities evaluated by flow cytometry, by microscopic evaluation, by CFDA/PI staining and by HOS test at ratio of 1:0 of live and dead spermatozoa (n=11)

Comparison	r	Significance
F vs. ME	0.6618	0.0266
F vs. C/P	0.4477	0.1674
F vs. HOS	0.9107	<0.0001

F: flow cytometry, ME: microscopic evaluation, C/P: CFDA/PI staining, H: HOS test.

결과는 Pena 등(1999)이 개의 생존 정자와 죽은 정자를 1:1로 처리하여 flow cytometry을 이용하여 정자의 생존율을 분석한 결과와 유사한 dot-plot과 histogram 양상을 보였다. 즉, 죽은 정자의 비율이 높아질수록 flow cytometry을 이용한 dot-plot과 histogram상에서 죽은 정자의 분포가 증가하는 경향을 나타내었다.

한편, 이 연구에서 생존 정자와 죽은 정자의 비율을 1:0으로 하였을 때에도 죽은 정자의 집단을 확인할 수 있었는데 이것은 flow Cytometry 분석까지 약 1 시간이 소요되었고 정자에 대한 처리과정에서 자연적으로 사멸된 정자의 집단이 나타난 것으로 판단된다.

본 연구의 중요한 목적중 하나는 flow cytometry을 이용한 정자의 생존성에 대한 분석이 기존의 정자의 생존성 검사와 비교하여 정확한 결과를 보여주는가를 알아보기 위한 것이다. Flow cytometry을 이용한 정자의 생존성 분석은 정자의 생존율이 dot-plot과 histogram 상에 정확하게 표시되어 기존의 생존성 검사에 비해 더욱 명확한 결과를 보여준다. 또한 기존의 정자의 생존성 검사시에 사용되는 정자의 수는 극히 일부분만을 사용하기 때문에 객관적인 검사가 미흡하다. 그러나 flow cytometry을 이용한 정자의 생존성 분석에 있어 각 sample당 10,000개의 정자를 사용하였기 때문에 객관적인 평가가 이루어졌다고 생각된다.

이렇게 객관성을 가지고 있는 flow cytometry을 이용한 정자의 분석방법이 기존의 정자의 분석방법들, 광학현미경적 검사(ME), CFDA/PI 염색검사, HOS test에 의한 정자의 생존율과 비교하였을 때의 상호 상관관계를 조사하였다. Flow cytometry 분석 결과는 생존 정자와 죽은 정자의 혼합 비율에 관계없이 HOS test 결과와 가장 밀접한 상관관계를 나타내었다($p < 0.01$). Kumi-Diaka(1993), 지와 김(2000), 김 등(2000)은 정자의 생존성 검사를 위해 HOS test 방법을 이용함으로써 그 유용성을 시사하고 있다. Kumi-Diaka(1993)는 개 정자에 대한 HOS test 결과 curled spermatozoa의 비율이 증가하는 것은 정자의 활력과 높은 상관관계가 있으며, 이는 정자의 원형질막의 손상 여부(membrane integrity)와 연관이 있음을 보고했다. 또한, Brito 등(2003)은 소의 정자를 이용하여 HOS test와 체외수정을 한 결과 HOS test는 정자의 원형질막의 기능을 확인하는데 유용함을 보고했다.

Flow cytometry에 의한 개 정자 생존율과 CFDA/PI 염색 후 생존율 비교에서 생존 정자와 죽은 정자의 비율이 1:0, 1:1일 경우는 고도의 상관관계를 ($p < 0.01$), 1:3일 경우는 유의성 있는 상관관계를 나타내었다 ($p < 0.05$). 이 결과로 볼 때 CFDA/PI 검사에 의한 생존율 검사는 Garner 등(1986), Harrison 등(1990), Fraser 등(2001), Brito 등(2003)의 보고와 같이 신뢰성 있는 생존율 검사로 사료된다.

한편, flow cytometry에 의한 정자 생존율과 광학현미경 검사(ME)에 의한 생존율의 비교에서는 생존 정자와 죽은 정자의 비율이 1:0, 1:3일 경우는 유의성 있는 상관관계를 나타내었으나($p < 0.05$), 1:1일 경우는 유의성이 인정되지 않았다. 이 결과는 광학현미경에 의한 생존율 판정이 다른 검사에 비해 검사하는 사람에 따른 주관적인 판정이므로 다른 검사들에 비해 객관성과 정확성이 떨어짐을 시사한다고 보겠다.

개 정자를 동결 및 용해 후 정자의 생존율은 Fig. 7에서와 같이 전체적으로 동결전에 비해 10~20% 정도 감소되었다. 동결용해 후 flow cytometry 분석, 광학현미경 검사,

CFDA/PI 염색검사, HOS test를 통하여 개 정자의 생존율을 비교하였다. 그 결과 HOS test 결과는 신선정액을 이용한 검사의 결과같이 flow cytometry 분석 결과와 고도의 상관관계를($p < 0.01$), 광학현미경검사 결과는 유의성 있는 상관관계를 나타냈다($p < 0.05$). 그러나, CFDA/PI 염색검사 결과는 상관관계가 인정되지 않았다. 이와 같이 CFDA/PI 염색검사 결과와 상관관계를 나타내지 않은 것은 유사한 연구보고를 접하지 못하였으나 정액 동결시 첨가되는 동결보호제 및 난황, 용해 후 첨가되는 TFC 배지 조성의 영향으로 신선정액의 경우와 달리 정자의 원형질막의 염색이 방해되거나 형광발현에 장애가 나타난 것으로 사료된다. 이에 대하여서는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 보인다.

이러한 결과들은 종합해 볼 때 flow cytometry에 의한 정자 생존율 분석은 기존의 정자의 생존성 검사에 비해 보다 정확하고 객관적인 자료를 제시한다고 판단된다.

Viability Assessment of Fresh and Frozen-thawed Dog Spermatozoa by Flow Cytometry

Hong, Y. M., Y. J. Kim, I. Yu, D. B. Ji and M. S. Kim²

Dept. of Theriogenology, College of Veterinary Medicine,
Chonbuk National University

ABSTRACT

This study was performed to examine the correlations among dog sperm viabilities evaluated by flow cytometry, by microscopic evaluation (ME), by carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide (CFDA/PI) and by hypoosmotic swelling (HOS) test. Semen were collected from 5 dogs ranging in age from 2 to 4 years. Each ejaculate was divided into 3 aliquots and different proportions of freeze-killed cells were added to each aliquot (1:0, 1:1 and 1:3). In the other experiment, semen was extended with Sweden extender containing 5% glycerol and equex STM paste, and frozen using liquid nitrogen vapor. Fresh and frozen-thawed dog sperm viability were assessed by flow cytometry using PI staining method. The accuracy of flow cytometry was evaluated by comparing with other classic assessments, microscopic evaluation, epifluorescence microscopic analysis using CFDA/PI, and HOS test. High correlations of sperm viabilities were found among flow cytometry, epifluorescence evaluation, HOS test ($p < 0.01$) in fresh semen. Especially, sperm viability assessed by HOS test was highly correlated with viability by flow cytometry in all the ratios of live and dead spermatozoa, 1:0, 1:1 and 1:3 ($p < 0.01$). The viability evaluated by ME were significantly correlated with that by flow cytometry in ratios of 1:0 and 1:3 ($p < 0.05$) however, there was no significance in ratio of 1:1. The viability evaluated by C/P were highly correlated with that by flow cytometry in ratio of 1:0 and 1:1 ($p < 0.01$) and significantly correlated in ratio of 1:3 ($p < 0.05$). In frozen-thawed spermatozoa, the viability

determined by HOS test was considerably correlated with that by flow cytometry ($p < 0.01$). There was significant correlation between the viabilities by ME and by flow cytometry ($p < 0.05$). But the viability evaluated by CFDA/PI was not correlated with viability by flow cytometry. The result from this study validate the use of flow cytometry as a precise method for assessing the viability of fresh and frozen-thawed dog spermatozoa.

(Key words : Dog sperm viability, Flow cytometry, Microscopic evaluation, Carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide, Hypoosmotic swelling test)

인용문헌

1. Brito LF, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP (2003): Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationships with *in vitro* fertilization rate. *Theriogenology* 60:1539-1551.
2. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR (1982): Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem* 30:279-280.
3. Fraser L, Gorszczaruk K, Strzezaruk J (2001): Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Domest Anim* 36:325-329.
4. Garner DL, Pinkel D, Johnason LA, Pace MM (1986): Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biol Reprod* 34:127-138.
5. Harrison RAP, Vicker SE (1990): Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 88:343-352.
6. Johnson LA, Flook JP, Hawk HW (1989): Sex pre-selection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 4:199-203.
7. Kumi-Diaka J (1993): Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39:1279-1289.
8. Mortimer D (1994): Semen analysis. In; *Practical laboratory andrology*. Oxford university press, Inc., New York, U.S.A. pp:43-86.
9. Pena A, Johannisson A, Linde-Forsberg C (1999): Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52:965-980.
10. Pinkel D, Dean P, Lake S, Peters D, Mendelsohn M, Gray J, Van Dilla M, Gledhill B (1979): Flow cytometry of mammalian sperm progress in DNA and morphology. *J Histochem Cytochem* 27:353-358.
11. Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (1997): Effect of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. *Theriogenology* 47:1093-1101.
12. 김용준, 지동범, 오홍근 (2000): 개정액의 동결 및 융해 후 정자의 생존성 및 수정능 획득 판정을 위한 HOS test 및 CTC test. *한국임상수의학회지* 17(2):431-437.
13. 지동범, 김용준 (2000): 개정액의 융해후 생존율 향상을 위한 동결방법. *한국임상수의학회지* 17(2):420-430.

(접수일자: 2004. 4. 20. / 채택일자: 2004. 9. 20.)