

말 정액 동결시 Glycerol 농도와 동결 속도가 생존율에 미치는 영향

최선호¹ · 김성재¹ · 조상래¹ · 최창용¹ · 손준규¹ · 유용희¹ · 조영재² · 최귀철² · 문윤영²

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²한국마사회

Factors Affecting the Survival Rates of Frozen-Thawed Spermatozoa in Equine by Glycerol Concentration and Freezing Speed

Sun-Ho Choi¹, Sung-Jae Kim¹, Sang-Rae Cho¹, Chang-Yong Choe¹, Jun-Kyu Son¹,
Yong-Hee Yoo¹, Young-Jae Cho², Gui-Cheol Choi² and Yun-Young Moon²

¹National Institute of Animal Science in RDA, Namwon 590-832, Korea, ²Korea Racing Authority, Jangsu 597-843, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the survival rate of frozen-thawed spermatozoa in equine by glycerol concentration and freezing speed. Two stallions (1 Thoroughbred-13 year old and 1 Arab-7 year old) bred in Korea Racing authority was examined for 1 times in a couple of weeks. Semen was collected by condom method standing heated mare and were centrifuged 650 g for 15 min. and isolated the seminal plasma. Thick fraction of semen was diluted EDTA-Lactose-egg yolk diluents to 1:1 and contained in 0.5 ml straw as $6\sim 14\times 10^7$ cells/ml. Final concentrations of glycerol were 3, 5 and 7% in cryopreserved diluents and added 4 times for 2 hours equilibration. For the freezing, equilibrated straws were located 3 or 5 cm above LN₂ gas for 5 or 10 min. Survival rates of pre-frozen sperm were 65.0±13.2%, 68.3±10.4%, 66.7±11.5% and post-frozen were 53.3±23.1%, 45.0±15.0%, 50.0±18.0% in 3, 5, 7% glycerol concentration, respectively. There was no difference between glycerol concentrations. Survival rates of frozen-thawed sperm on freezing speed were 36.7±10.4%, 40.0±7.1%, 30.0±13.2% at 3 cm-5 min and 33.3±11.5%, 31.7±2.9%, 21.7±10.4% at 3 cm-10 min in 3, 5, 7% glycerol concentration, respectively. Survival rates of frozen-thawed sperm on freezing speed were 43.3±15.3%, 32.0±17.9%, 22.3±15.7% at 5cm-5 min and were 47.5±15.0%, 43.3±12.6%, 48.3±15.3% at 5cm-10 min in 3, 5, 7% glycerol concentration, respectively. There were significantly different between groups ($p<0.05$). These results suggest that glycerol concentration did not affect cryopreservation of stallion semen within 3~7% but freezing speed affects. In our experiment, the best cryopreservation condition was at 5 cm above LN₂ gas for 10 min for pre-freezing and 7% of glycerol concentration. These results lead to commercial AI with frozen-thawed stallion semen.

(Key words : Survival rate, Frozen-thawed, Stallion, Sperm)

서론

국내 경제성장과 함께 레저 문화의 발달은 승마가 본격적으로 부각되게 되었으며, 이를 위해 수입산 더러브렛이 주종을 이루었으나, 한국인의 체형에 다소 큰 편이므로 낙마 등의 사고에 대한 우려가 있었다. 이에 따라 한국형 승용마의 개량 및 육성이 시급하게 대두되고 있다. 국내에서 말 정액을 이용한 인공수정은 경주마 위주의 말 산업에서는 금기시되어 연구의 대상이 되지 못하였으나, 한국형 승용마 육성의 시급성에 따라 늘어나고 있는 추세이다. 그러나 말 정액의 저온 보존은 정액의 정장액의 분리(Batallier 등, 1998; Macias Garcia 등, 2009)에 따른 정자의 운동성 및 동결성에 많은 차이를 보이고 있으며, 정

장 분리 후 그에 대체에 필요한 희석액의 성분은 따라 EDTA(Martin 등, 1979), 우유(Mchajilov, 1950; Kenny 등, 1975, Palmer, 1984; Varner 등, 1989), skim-milk(Backman 등, 2004; Pagl 등, 2006; Bustamante Filho 등, 2009), 유단백(Pierre 등, 1992), casein(Masuda 등, 2004) 등의 첨가에 의해 개발되어 왔으며, 난황을 기본으로 단당류, HEPES 등을 첨가한 희석제(Jasko 등, 1992) 등도 개발되어 동결보존이 정액의 이용성을 확대하였으나, 각각의 첨가물에 따라 저온 보존의 방법이 상이하며, 동결 방법도 많은 차이를 보이고 있다.

말 정액의 채취는 가장 간단한 방법이 콘돔법으로 승가 전에 콘돔을 씌우고 발정 암말에 승가시켜 채취하였으나, 이 물질이 많이 함유되어 정액의 질을 떨어뜨리는 경향이 커서 인공질의 이용이 성행하고 있다. 인공질은 개발

† Corresponding author : Phone: +82-63-620-3520, E-mail: sunho8722@korea.kr

지역 따라 Colorado 식, Missouri 식 그리고 Cambridge 식으로 나뉘며, Missouri 식이 무게가 가볍고 간단하게 채취가 가능하여 보편적으로 사용되나, 온수가 빨리 식어 버리는 문제가 있어 주의를 요한다(Allen, 2005). 동해방지제로는 glycerol이 가장 많이 사용되고 있으며, 첨가농도는 3~5% 정도로 연구자에 따라 많은 차이를 보이고 있고, dimethyl formamide(Perez-Osorio 등, 2008) 등도 이용되고 있다. 정액의 동결 속도는 액체질소 증기 몇 cm 위에서 예비동결을 하느냐에 크게 좌우하며, 프로그램 동결기를 이용한 것이 다소 좋은 성적을 내고 있다(Clulow 등, 2008).

따라서 본 연구는 말 정액 동결을 간편하게 실시할 수 있도록 정액 채취는 콘돔법, 다양한 glycerol 농도 그리고 동결 속도를 고려하여 적절한 동결법을 개발하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시동물

본 연구에 사용된 공시동물은 한국마사회 장수경주마 목장에서 사육 중인 수컷 2두(더러브렛 1두 13세, 아랍종 1두 7세)를 사용하였고, 자연교미를 한 적은 있으나, 인공적으로 정액 채취의 경험이 전혀 없는 것을 이용하였다. 이들의 체중은 500 kg이었고, 각각 단독의 사육장에서 충분한 운동, 1회의 사료 급여와 무제한 물을 급여하여 사육하였다.

정액 채취

정액 채취는 2주 1회의 간격으로 콘돔법으로 실시하였고, 발정 암컷을 승가토록 하여 사정을 유도하였다. 발정 암컷은 뒷다리에 고정 신발을 이용하여 묶어서 보정하였다. 청결한 채취를 위해 생식기 주위를 청결히 하고, 음경에 콘돔을 씌워 사정을 유도하였다. 사정된 정액은 총량의 조사를 위해 모든 정액을 채취하였고, 총 정액량과 총 정자 수 등의 일반적인 성상을 검사하였다.

정액검사

채취된 정액은 원심관으로 총 정액량을 환산하고, 정액을 650 g에서 15분간 원심분리하여 정장액과 농후부 정액을 분리하여 농후부 정액을 채취하였고, Makler chamber를 이용하여 총 정자수를 확인하였다. 정자의 활력은 정자 활동 자동 분석 장치(SIAS, Medical Supply, 한국)를 이용하여 활력을 조사하였다. 동결보호제를 이용한 glycerol 평형과 예비동결 시간에 따라 동결된 정액은 액체 질소통에 보관하기 전에 생존율을 검사하였다.

희석액의 제조 및 정액의 동결-융해

희석액은 Martin 등(1979)의 방법으로 제조하였으며, 최종 pH는 7.2로 조정하였고, 삼투압은 315 mOsm/kg으로 조정하여 정액 희석 및 동결에 공시하였다(Table 1).

정액의 동결은 정장액과 농후부를 분리하고, 농후부를 37°C 희석액과 1:1로 희석하여, 정자가 안정화 되도록 하였다. 희석된 정액은 동결보호제 및 예비 동결 시간을 고

Table 1. Composition of the glucose-EDTA solution and of the lactose-EDTA extender

Item	Amount
Glucose-EDTA solution	
Glucose monohydrate (g)	59.985
Sodium citrate dihydrate (g)	3.700
Disodium ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) (g)	3.699
NaHCO ₃ (g)	1.200
Polymyxin B sulfate (units)	1×10 ⁴
Glass distilled water to make (ml)	1,000
Lactose-EDTA extender (ml)	
11%(w/v)lactose solution	50
Glucose-EDTA solution (see above)	25
Egg yolk	20
Equex STM	0.5
Glycerol	5.0

* From Martin *et al.*(1979).

려하여 6개구로 나누어 4°C까지 냉각하였다. 동결보호제인 glycerol을 3, 5, 7%로 구분하였다. 1:1로 희석된 정액이 4°C로 냉각된 후 glycerol 최종 농도의 1/16, 1/8, 1/4, 1/2 그리고 최종 농도가 되도록 glycerol을 첨가하였고, 첨가는 각 15분 간격으로 하였으며, 최종 농도로 1시간 동안 평형을 실시하였다. 예비 동결은 액체질소 위 3 cm 5분, 3 cm 10분, 5 cm 5분, 5 cm 10분 등 4가지 방법으로 예비동결을 실시한 후 액체질소에 침지하여 동결을 하였다. Glycerol 평형은 4°C에서 2시간 동안 실시하여 최종 농도에 도달하도록 하였고, 평형이 된 정자는 6~14×10⁷ cells/ml로 조정하여 스트로에 봉입하였고, 스트로 선단부는 sealing gel을 이용하여 봉합하였다. 동결된 정액은 동결 후 생존율 검사를 위해 액체질소에서 꺼내 공기 중에서 10초간 예비융해를 하였고, 37°C 온수에서 20초간 융해한 후 생존율 검사를 하였다.

통계처리

본 연구에서 glycerol 농도와 액체질소 위에서 한 예비 동결시간에 의한 생존율 실험을 7회 실시하였으며, 실험 결과는 통계 프로그램인 STATVIEW를 이용한 ANOVA test로 분석하여 유의성을 검정하였다.

결 과

Glycerol 농도에 따른 동결-융해 정액의 생존율

Glycerol 농도에 따른 동결전 및 후 말 정액의 생존율은 Table 2와 같다. Glycerol 3%에서 동결전 생존율 65.0%이었던 것이 53.3%로 낮아졌으며, 5%에서는 68.3%였으나

Table 2. Survival rate of pre- and post-frozen sperm of stallion on glycerol concentration in EDTA-Lactose-egg yolk diluent

Diluent	Glycerol con. (%)	Survival rate (%)	
		Pre-frozen	Post-frozen
EDTA-Lactose-egg yolk	3	65.0±13.2	53.3±23.1
	5	68.3±10.4	45.0±15.0
	7	66.7±11.5	50.0±18.0

45.0%로 생존율이 떨어졌고, glycerol 7%에서는 66.7%이었던 것이 50.0%로 떨어졌다. 동결전에는 glycerol 농도와 관계없이 비슷한 경향을 보였으며, 동결-융해 후에도 비슷한 경향을 나타내었다. 3% glycerol 첨가가 가장 높은 생존율을 나타냈으나, 통계적으로 glycerol 농도에 따른 유의성은 인정되지 않았다.

동결 속도에 따른 동결-융해 정액의 생존율

동결 전 액체질소 위에 높기와 예비동결 시간에 따른 동결-융해 후 말 정액의 생존율은 Table 3과 같다. 액체질소 위 3 cm에서 5분간 예비동결 시 glycerol 3%, 5%, 7%에서 각각 36.7±10.4%, 40.0±7.1%, 30.0±13.2%를 나타냈으며, 3 cm에서 10분간 예비동결 시 glycerol 3%, 5%, 7%에서 각각 33.3±11.5%, 31.7±2.9%, 21.7±10.4%를 나타내었다. 또한 액체질소 위 5 cm에서 5분간 예비동결 시 glycerol 3%, 5%, 7%에서 각각 43.3±15.3%, 32.0±17.9%, 22.3±15.7%를 나타냈으며, 5 cm에서 10분간 예비동결 시 glycerol 3%, 5%, 7%에서 각각 47.5±15.0%, 43.3±12.6%, 48.3±15.3%를 나타내었다. 가장 높은 생존율은 5 cm 위에서 10분간 예비동결 시 48.3±15.3%로 나타났고, 가장 낮은 생존율은

Table 3. Survival rates of frozen-thawed sperm with EDTA-Lactose-egg yolk extender on freezing speed in stallion

Freezing speed	Glycerol conc.(%)	Survival rates(%) of frozen-thawed sperm
3 cm-5 min	3	36.7±10.4 ^a
	5	40.0± 7.1 ^a
	7	30.0±13.2 ^b
3 cm-10 min	3	33.3±11.5 ^b
	5	31.7± 2.9 ^b
	7	21.7±10.4 ^c
5 cm-5 min	3	43.3±15.3 ^a
	5	32.0±17.9 ^b
	7	22.3±15.7 ^c
5 cm-10 min	3	47.5±15.0 ^a
	5	43.3±12.6 ^a
	7	48.3±15.3 ^a

* The different superscripts mean significantly different ($p<0.05$).

3 cm 위에서 10분간 예비동결 시 21.7±10.4%로 나타나 액체질소 증기 위의 높이가 예비동결에서 중요한 요인이 확인되었고, 각 처리 간에는 유의차가 인정되었다($p<0.05$).

고 찰

말 정액 채취는 콘돔법을 선택한 것은 의빈대(phantom 부착)를 증가하도록 훈련된 수말이 없어 이용하게 되었으며, 채취된 정액은 돼지정액 필터 용지를 2겹으로 겹쳐서 불순물을 제거한 후 시험에 공시하였다. 채취 정액으로 총 정액량 및 총 정자수 등을 측정하려 하였으나, 콘돔을 이용하여 측정하기에는 채취 시기에 따라 다르게 채취되어 불가능하였고, CASA를 이용한 측정 또한 parameter가 일정하지 않아 정상적인 수치를 확인할 수 없었다. 희석액에 glycerol 첨가로 동결 전후의 생존성 검사에서 glycerol 농도에 관계없이 동결전에는 65.0~68.3%의 생존성을 보였고, 동결-융해 후에도 45.0~53.3%로 유의차가 없이 비슷한 생존성을 보였다. 또한, 액체질소 위 3 cm로 처리한 것이 5 cm에서 예비동결한 것에 비하여 약간 낮은 생존율을 나타냈다. 이러한 결과는 Clulow 등(2008)이 프로그램 동결기와 스티로폼 동결 방법에 유의차가 없는 것과 동일한 결과였으며, 액체질소 위 3 cm로 이용할 경우 0.5 ml 스트로가 0.25 ml에 비해 더 빨리 얼어버린다는 결과를 볼 때, 적절한 희석방법과 동결 속도를 선택할 경우 더 좋은 생존성을 나타내는 것으로 나타났다. Glycerol 농도에 따른 생존성은 유의차는 인정되지 않았으며, 3~5%의 농도로 많은 연구자들이 수행한 것과 같이 저농도의 glycerol에 의해 말 정자의 손상을 많이 받지 않는 것으로 사료된다. 그러나 Schober 등(2007)에 의하면 동결-융해 후 정자 중편부의 미토콘드리아의 손상에 의해 정자의 활력이 떨어지고, 수정률이 저하하는 것으로 보고한 것을 고려한다면 생화학적 접근을 통한 연구가 더 요구된다고 사료된다. 가장 중요한 점은 정장의 분리 방법 및 정장 대체 물질의 탐색이 정액 보존의 핵심으로 생각되어 향후 연구 방향을 고려하여야 할 것이다.

본 시험에 공시된 수말들은 정상적인 개량을 위한 선발을 거친 것이 아니라 개체 간의 차이가 크게 나타났으며, 의빈대를 이용한 채취가 아니라서 더욱 많은 차이를 보였다(Loomis와 Graham, 2008). 말 동결정액의 최종 목표는 인공수정의 실현에 있어, 본 시험에서 얻어진 동결정액을 이용하여 한국마사회 경주마목장 보유 12두의 암컷에 인공수정으로 3두가 임신(임신율 25%)하였다(미발표). 이로 말미암아 더욱 다양한 희석액과 동결 속도 등을 고려하여 지속적으로 연구를 하면 소에서와 같이 동결정액을 이용한 인공수정이 상용화될 수 있음을 시사한다.

인용문헌

- Allen WR (2005): The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod Dom Anim* 40:310-329.

2. Backman T, Bruemmer JE, Graham JK, Squire EL (2004): Pregnancy rates of mare inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J Anim Sci* 82:690-694.
3. Batallier F, Duchamp G, Vidament M, Arnaud G, Palmer E, Magistrini M (1998): Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh semen at 15°C under aerobic conditions. *Theriogenology* 50:229-236.
4. Batallier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM (2001): Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 68:181-190.
5. Bustamante Filho IC, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Gregory RM, Dutra Filho CS, Jobim MIM, Mattos RC (2009): Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim Reprod* 6(2):392-399.
6. Clulow JR, Masfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC (2008): A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 108:298-308.
7. Jasko DJ, Hathaway JA, Schanltenbrand VL, Simper WD, Squire EL (1992): Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37:1241-1252.
8. Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL, Morse GW (1975): Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proceedings of 21st American Association of Equine Practitioners* pp 327-336.
9. Loomis PR, Amann RP, Squire EL, Pickett BW (1983): Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-Lactose-egg yolk and packaged in straw. *J Anim Sci* 56(3):687-693.
10. Loomis PR (2001): The equine frozen industry. *Anim Reprod Sci* 68:191-200.
11. Loomis PR, Graham JK (2008): Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci* 105:119-128.
12. Macias Garcia B, Morrell JM, Ortega-Ferrusola C, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Rodriguez-Martinez H, Pena FJ (2009): Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Anim Reprod Sci* 114:193-202.
13. Masuda H, Nanasaki S, Chiba Y (2004): A new extender for preservation of equine spermatozoa at 5°C. *J Equine Sci* 15:1-5.
14. Martin JC, Klug E, Gunzel A (1979): Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straw. *J Reprod Fertil Suppl* 27:47.
15. Michajilov NN (1950): Sperm dilution in the milk. *Czech Vet Mag January 10*, abstracted in *J Anim Vet Med Assoc* 117:337.
16. Pagl R, Aurich JE, Muller-Schlosser F, Kankofer M, Aurich C (2006): Comparison of an extender containing defined milk protein fraction with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology* 66:1115-1122.
17. Palmer E (1984): Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Proceeding of the 10th International Congress on Animal Reproduction, Urbana-Champaign II* 3:377.
18. Pierre A, Fauquant J, Le Graet Y, Piot M, Maubois JL (1992): Preparation de phosphocaseinate natif par microfiltrationsur membrane. *Lait* 72: 461-474.
19. Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L (2007): Influence of cryopreservation on mitochondria functions in equine spermatozoa. *Theriogenology* 68:745-754.
20. Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM (1988): Effects of coolingrate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 29:1043-1054.
21. 박용수, 박흠대, 장용석, 조길재 (2008): 말 동결음해 정자의 생존성 및 수정능에 영향을 미치는 인자. *한국수정란이식학회지* 23(3):161-166.
(접수일자: 2010. 9. 15 / 채택일자: 2010. 9. 20)