

제주흑우 동결정액 제조시 Ethylene Glycol의 농도와 예비 동결 조건이 정자의 생존을 및 첨체양상에 미치는 영향

최선호 · 고민희 · 강태영 · 조상래 · 박용상 · 오신애[†]

농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장

Effect of Ethylene Glycol Concentration and Freezing Speed on Post-thawed Semen Viability and Acrosome Integrity in Korean Jeju Black Bull

Sun-Ho Choi, Min-Hee Ko, Tae-Young Kang, Sang-Rae Cho, Yong-Sang Park and Shin-Ae Oh[†]

Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, JeJu 690-150, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to examine effect of ethylene glycol for semen cryopreservation in Korean Jeju Black Bull. The semen was cryopreserved with extenders containing cryoprotectants (7% glycerol and 3%, 5%, 7% ethylene glycol) and packed to 0.5 ml straws. The semen straws were located above 3 cm of liquid nitrogen for 5 min, 5 cm for 10 min and 8 cm for 10 min. And then frozen straw was plunged into LN₂. Post-thawed sperm motility, viability and membrane integrity were significantly higher in 5% ethylene glycol (72.5±5.00%, 54.88±0.66% and 46.00±2.40%; $p<0.05$). Motility and viability were similar between 7% glycerol and 5% ethylene glycol. However, the membrane integrity was significantly higher in 5% ethylene glycol (34.69±4.64% vs 46.00±2.40%; $p<0.05$). The viability and membrane integrity were significantly higher in 5 cm for 10 min and 8 cm for 10 min than 3 cm for 5 min (viability: 55.81±2.94, 55.19±3.34 vs 47.94±3.48%; $p<0.05$ and membrane integrity: 44.94±3.51, 46.06±2.25 vs 40.38±1.03%; $p<0.05$). The percentage of capacitated sperm assessed by CTC staining, percentage of F pattern was higher in 7% glycerol, 5% and 7% ethylene glycol, and AR pattern was significantly higher in 3% ethylene glycol. F pattern was significantly increased in 5 cm for 10 min and 8 cm for 10 min ($p<0.05$), but AR pattern was significantly increased in 3 cm for 5 min ($p<0.05$).

(Key words : Korean Black Bull, Semen freezing, Cryoprotectants, Ethylene glycol)

서 론

최근 국내의 한우 산업은 한미 FTA 체결과 같은 개방화의 진전으로 경쟁력이 심화되고 있으며, 이에 국내산 쇠고기의 가격은 주 수입국인 미국에 비해 4.1배 이상 비싸 가격 경쟁력이 미약한 실정이다. 또한, 국민 소득의 증가로 육류의 소비가 증가하고 있으며, 고급육에 대한 수요도 증가하고 있는 추세로 우리 국민의 기호를 충족시킬 뿐만 아니라 외국산 쇠고기와 경쟁력을 갖출 수 있는 고유 한우의 품종 개발과 특성화 및 브랜드화가 필요하다.

한우의 품종 중 현재 제주흑우와 최소는 멸실 위험에 직면한 희소 한우로 분류되어 있으며, 과거 일제시기의 잦은 공출과 멸종정책으로 현재에는 그 명맥만 유지되고 있다. 제주흑우는 희소 품종으로 분류되어 있기에 산업적

인 이용에 있어 활발한 유통은 불가능하지만, 국내 가축 유전자원의 다양성 확보 차원에 있어 매우 중요한 국가적 자원이다. 이러한 희소 한우를 보존하기 위하여 정액을 이용한 번식뿐만 아니라 첨단 생명공학 기술과 수정란 이식 기술 등에 의해 대량 번식시킴으로 그 품종을 유지시키고, 나아가 고품질 브랜드육 생산 체계를 갖춰 국제 경쟁력이 있는 상품으로 개발하고자 하는 노력이 수행 중이다. 그러나 현재 제주흑우 정액의 채취와 동결 보존에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이며, 최적 조건을 확립하는 것은 매우 까다로운 일이다. 특히, 정액의 동결 시 가장 중요한 동결보호제의 역할은 동결의 성공 여부를 좌우한다고 해도 과언이 아닐 만큼 중요한 물질이다. 동결보호제는 독성이 적으며, 수용성이어야 하며, 분자량이 작고 침윤성이 높아야 한다(Ashwood-Smith, 1987; Amann and Pickett, 1987). 특히, 동결 과정에서 생기는 삼투압 stress는 동결보호제의 첨가와 제거에 의해 나타나며,

* 본 연구는 2011년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연수과정지원사업에 의해 이루어진 것임.

[†] Corresponding author : Phone: +82-64-754-5726, E-mail: spokis@naver.com

세포의 삼투 반응은 동결보호제가 세포막을 침윤하는 것과 같은 세포막의 친수성 침윤에 의존하게 된다. 그러나 정자는 작은 범위의 삼투압 변화만을 견딜 수 있기 때문에(Gilmore *et al.*, 1995, 1996, 1998; Willoughby *et al.*, 1996; Sieme *et al.*, 2008), 성공적인 동결정액의 제조를 위해 분자량이 작으며, 세포막 침윤성이 높고 삼투압 손상을 최소한으로 줄일 수 있는 동결보호제가 필요하다.

Glycerol은 수년 동안 소의 동결정액 제조 시 동결보호제로 사용되어 왔으며, 다른 다양한 세포막 침윤성 동결보호제들의 검사 또한 수행되어 왔다. Glycerol을 동결보호제로서 사용한 이후(Polge 등, 1949), glycerol은 포유류를 포함한 다양한 type의 세포의 동해방지제로 사용되어 왔다(McGonagle 등, 2002). 그러나 glycerol은 동결된 세포의 세포막과 대사작용에 삼투압 stress와 toxic한 영향을 준다(Hammerstedt 등, 1990), 이러한 작용은 정자 세포막의 탈락(Hammerstedt 등, 1992; Buhr 등 2001), 정자의 활력과 수정능력을 감소시키게 된다(Jeyendran 등, 1984). 그러나 보다 독성이 적으며 glycerol과 비교하였을 때 비슷한 수준의 동결보존 효과를 나타내는 ethylene glycol(Chenier *et al.*, 1998; Vidament *et al.*, 2002; Squires *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2005)과 amide 계열은 동결정액 제조 시 동결보호제로 사용하였을 때 융해 후 정자의 운동성이나 membrane integrity를 개선하는 결과를 보고한 바 있다(Alvarenga *et al.*, 2005). 또한, ethylene glycol은 사람(Gilmore 등, 2000)과 소(Guthrie 등, 2002)의 정자에서 세포막의 침투 속도가 glycerol보다 빠르고 효과적인 동결보호제로 보고된 바 있다. 또한, ethylene glycol은 낮은 수리전도도를 가지기 때문에 정자 세포가 냉각, 동결되는 동안 삼투압 stress를 감소시킬 수 있다고 하였다(Gilmore 등, 1995). Ethylene glycol은 정자의 생존율과 활력에 있어 그 해로움이 glycerol에 비하여 적기 때문에(Ball 등, 2001), 정자의 침체 보존에 있어 보다 효과적인 보호 능력을 제공할 수 있다. 현재 ethylene glycol은 glycerol을 대체하는 동결보호제로 개(Pereira 등, 2002)와 말(Mantovani 등, 2002)의 동결정액 제조에 사용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 제주흑우의 유전자원 보존과 번식 증대를 위한 안정적인 동결정액 제조법을 수립하기 위하여 제주흑우의 정액 동결 제조에 있어 동결 융해 후 ethylene glycol이 정자의 운동성, 생존율 그리고 침체에 미치는 영향에 대하여 알아보하고자 수행하였다.

재료 및 방법

제주흑우 정액 채취

정액 채취로 사용된 제주흑우는 3세 이상의 수컷 4두를 선별하여 별도 공간에서 자유 급식하여 사육하였으며, 월 4회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 인공질(Model 66000-D, Nasco, FHK, 일본)을 사용하여 채취하였다. 정액 채취를 위해서 암컷을 시험장내 안전 정액 채취실 보정틀에 고정시킨 후, 제주흑우 수컷을 2~3회 암컷의 주위를 맴돌게 하여 흥분을 유도하였다. 승가가 이루어지면 수컷의 penis를 인공질에 삽입하여 정액 채취를 하였다. 인공질의 유지온도는 38°C를 유지하였으며, 인공질에는

penis의 삽입을 원활하게 하기 위하여 젤을 발랐다. 사출된 정액은 인공질 끝부분에 15 ml tube를 채취 전에 위치시켜 정액을 회수하였다. 회수된 정액은 37°C 온장고에 넣어 신속하게 실험실로 이동하였다.

정액 처리 및 제조

본 실험에 이용된 보존액의 조성은 Table 1과 같으며, 동결보호제로 7%의 glycerol과 3, 5, 7%의 ethylene glycol을 사용하였다. 채취된 정액은 즉시 실험실로 운반하였으며, 실험실의 클린 벤치 내에서 원정액을 Tris-egg yolk extender를 이용하여 5 단계를 거쳐 점차적으로 희석하며, 총 2시간 동안 냉각시켰다. 마지막 희석 후, 4°C에 보관된 ethylene glycol이 첨가된 희석액을 첨가하여 2시간 동안 평형을 유도하였다. 평형이 된 정자는 ml당 5×10^6 cell/ml로 숫자를 조정된 후에 0.5 ml의 straw에 충전 봉합하여 예비동결 후 액체 질소에 침지하여 동결 보존하였다. 또한, 예비 동결 조건이 정자에 미치는 영향을 관찰하고자 5%의 ethylene glycol을 첨가한 희석액을 사용하여 액체 질소의 표면에서 각각 3 cm 높이에서 5분, 5 cm 높이에서 10분, 8 cm 높이에서 10분간 노출시켜 예비 동결을 실시한 후에 액체 질소에 침지하여 동결을 완료하였다. 동결된 정액은 LN₂ tank에서 보관한 후에 동결-융해 정자의 활력, 생존율 및 침체 양상을 조사하기 위해 융해하여 사용하였다. 동결정액의 융해는 공기 중에서 약 10초간 융해한 후 37°C 온수에서 20초간 침지시켜 융해한 후 정액검사를 실시하였다.

정자의 활력 평가

정액의 활력과 평가는 MicroLux 현미경(X70, Olympus, Japan)하에서 정자의 활력을 평가하였으며, 혈구계산판(Haemocytometer)에 5 µl의 정액을 넣고 커버글라스를 덮은 후 100배율에서 정자의 운동성을 평가하였다. 혈구계산판의 격자 2군데를 반복적으로 관찰하여, 관찰되는 거의 모든 정자들이 소용돌이 치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 전자들이 격자 별로 100개 가량을 관찰하여 활발하게 움직이는 정자들이 80% 이상일 때 80%로, 70% 이상일 때 70%로 판단하고 움직이는 정도가 전진 운동 또는 느리게 전진 운동하는 수준일 때 50%, 느리게 전진 운동하거나 진자 운동 혹은 미동하는 수준일 때 20%로 평가하였다.

Table 1. Composition of Tris-egg yolk extender

Component	Concentration
Tris	121.1 mM
Fructose	180.2 mM
Citric acid	294.1 mM
Egg yolk	10%
Ethylene glycol	3, 5, 7%
Glycerol	7%
Streptomycin sulfate	10 mg/ml
Gentamycin	0.3 g/l

정자의 생존을 평가

정자의 생존성은 Eosin Y 염색법을 이용하여 생존율을 평가하였다. 0.9% NaCl 용액에 0.5% Eosin Y를 용해한 후 10 μ l의 정액을 슬라이드 글라스 위에 올린 다음 동량의 염색액을 섞어 도말한 다음 커버 글라스를 덮고 MicroLux 현미경(X 70, Olympus, Japan) 하에서 관찰하였다. 100배율에서 염색 상태를 관찰하여 표본 1개당 200개의 정자를 카운트하여 붉게 염색된 죽은 정자의 비율을 계산하였으며, 개체 당 2개의 표본을 만들어 총 400개의 정자를 카운트하여 생존율을 평가하였다.

정자막 온전성 평가

정자막 온전성을 측정하기 위하여 Jeyendran 등(1984)의 방법을 변형하여 저삼투압 용액을 이용한 정자 미부의 팽창 형태를 분석하였다(Hypo-Osmotic Swelling Test). 37°C의 저장액 (150 mOsm/kg, 0.45% NaCl 용액) 1ml에 정자 샘플 100 μ l를 혼합하여 37°C에서 5분간 정치시킨 후 슬라이드 글라스에 도말하여 개체당 2개의 표본을 만들어 표본당 200개의 정자를 카운트하여 정자막의 온전성을 평가하였다.

침체막 변화 양상 측정

침체막의 변화 양상을 측정하기 위하여 Chlortetracycline (CTC) 염색법을 사용하였으며, 이 방법으로 정자의 수정능 획득과 침체막 변화 양상을 조사하였다. 정액을 400 g \times 에서 2분간 원심분리하여 세척한 다음 500 μ l의 PBS를 첨가하여 재부유시킨 다음 500 μ l의 CTC 용액 (750 μ M CTC, 130 mM NaCl, 5 mM cysteine in 20 mM Tris buffer; pH 7.8)을 혼합하여 20초간 암실에서 상온배양하였다. CTC의 반응을 고정시키기 위하여 10 μ l의 12.5% glutaraldehyde solution (in 0.5 M tris-buffer; pH 7.4)를 첨가하였다. 염색된 정액은 빛이 차단된 4°C에서 보관하였으며, 염색 후 24시간 이내에 관독하였다. 정

자의 침체막 변화 양상의 관독은 Fraser 등(1995)의 분류를 따랐다(Table 2).

통계

통계 분석은 통계분석 프로그램 (SPSS Version 18.0)을 이용하였으며, 제주흑우 동결정액 제조시 항동해제 종류 및 항동해제 농도와 예비동결 속도에 따른 활력, 생존율 및 정자막 온전성에 대한 결과를 ANOVA를 실시하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

제주흑우의 정자를 각기 다른 농도의 ethylene glycol을 이용하여 동결 보전 후 융해하였을 때 정자의 운동성 및 생존율에 관한 결과는 Table 3과 같다. 정자의 활력에 있어서 3% ethylene glycol의 농도가 유의적인 감소를 나타내었으며($p < 0.05$), 5%와 7%의 ethylene glycol 처리구간에서는 유의적 차이를 나타내지 않았다. 그러나 생존율과 정자막 온전성에 있어서 5% ethylene glycol 농도가 47.94 \pm 4.45%와 41.63 \pm 3.20%로 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), 7% glycerol 처리구에 대하여도 유의적으로 높은 생존율을 보였다($p < 0.05$).

동결보호제는 세포내로 침투하여 세포막을 통하여 평형이 이루어지면 극대화된 효과를 나타낸다(Gilmore 등, 1995). 최적의 동결보호제는 낮은 온도에서 세포 안으로 빠르게 침투하며 독성이 적어야 한다(Harrison 등, 1996). 다양한 동결보호제의 세포내 침투 기능은 보호제에 따라 그 능력이 다르며, ethylene glycol은 사람(Gilmore 등, 1995), 쥐(Phelps 등, 1999), 그리고 돼지(Gilmore 등, 1998) 정자에서 높은 침투성을 보고한 바 있다.

본 연구는 제주흑우의 동결 정액을 제조하는데 있어

Table 2. Definition of sperm membrane pattern by CTC staining

Pattern	Description
F	Full fluorescence characteristic of ejaculated spermatozoa : Characteristic of uncapacitated sperm
B	Banded-indicative on capacitated spermatozoa and fluorescence only in the post acrosomal region : Characteristic of capacitated sperm
AR	Sperm showing a mottled green fluorescence over head or no fluorescence on the head : Characteristic of typical acrosome related spermatozoa

Table 3. Comparing various ethylene glycol concentration with glycerol for cryopreservation

Concentration	Motility (%)	Survival (%)	Membrane integrity (%)
7% Glycerol	72.5 \pm 5.00 ^a	43.94 \pm 3.33 ^a	34.31 \pm 5.52 ^a
3% Ethylene glycol	55.0 \pm 10.00 ^b	28.63 \pm 4.07 ^b	21.38 \pm 4.03 ^b
5% Ethylene glycol	72.5 \pm 5.00 ^a	54.88 \pm 0.66 ^c	46.00 \pm 2.40 ^c
7% Ethylene glycol	55.0 \pm 10.00 ^a	44.75 \pm 3.33 ^a	34.69 \pm 4.64 ^a

^{a-c} Values with different superscripts within column are significantly different by ANOVA ($p < 0.05$). Data are presented as mean \pm SD.

Table 4. Effect of straw-located height and duration above LN₂ at freezing on viability and motility of frozen-thawed Korean Jeju Black Bull semen

Height-Min	Motility (%)	Survival (%)	Membrane integrity (%)
3 cm-5 min	72.50 ± 0.05	47.94 ± 3.48 ^a	40.38 ± 1.03 ^a
5 cm-10 min	76.25 ± 0.05	55.81 ± 2.94 ^b	44.94 ± 3.51 ^b
8 cm-10 min	76.25 ± 0.05	55.19 ± 3.34 ^b	46.06 ± 2.25 ^b

^{ab} Values with different superscripts within column are significantly different by ANOVA ($p < 0.05$). Data are presented as mean ± SD.

동결보호제로서 ethylene glycol의 사용이 glycerol의 사용보다 정액의 동결 용해 후 높은 생존력, 정상적인 acrosomal integrity, membrane integrity 그리고 낮은 비정상 정자의 비율 등 정자의 질을 개선시킬 수 있음을 시사한다. Rohilla 등(2005)은 6.8%의 glycerol이 Buffalo 정액의 동결 용해후 정자의 활력, 살아있는 정자 수, acrosome intact 등이 5%의 ethylene glycol보다 높은 결과를 나타냈음을 보고한 바 있다. 이러한 보고는 본 연구와 상반되는 결과이나, 이는 사용된 희석액의 종류 및 동결정액의 제조 방법의 차이에서 기인하는 것으로 사료된다. 그러나 Swelum 등(2011)의 보고에 의하면 비정상적인 정자의 비율은 5%의 ethylene glycol에서 낮게 나타났다. 또한, Abdel-Khalek 등(2008)의 보고에서 5%와 7%의 ethylene glycol의 농도는 10%의 ethylene glycol보다 효과적인 결과를 나타냈다고 하였다.

본 연구에서 동결보호제의 종류와 농도뿐만 아니라 예비 동결 조건 또한 정자의 생존성과 정자막 온전성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. LN₂의 표면에서 가깝게 정치하여 5분간 급속 동결한 결과(3 cm, 5 min) 생존성과 정자막 온전성이 모두 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었다($p < 0.05$)(Table 4). AndroMed (Minitube, Germany)를 이용하여 흑우 정액을 동결하였을 때 LN₂에 노출되어 정치되는 높이와 시간이 정자의 활력과 생존성에 영향을 준다고 보고된 바 있다(조 등, 2009). 개의 경우 동결정액 제조시 LN₂에 노출되는 높이가 정자의 활력과 생존성에 영향을 준다고 보고되었으며(이 등, 2003), 말 정액의 동결시 LN₂에 노출되는 예비 동결 조건이 정자의 활력과 생존성에 영향을 준다고 보고되었다(최 등, 2010). 그러나 이러한 예비 동결의 조건은 아직 최적화 조건이 확립되어 있지 않기 때문에 적합한 조건을 찾기 위해 보다 연구가 필요하다.

양에 있어서 0.5 M 농도의 ethylene glycol은 양 정자의 동결에 매우 효과적이며, 동결 용해 후 정자의 활력이 0.72 M의 glycerol을 이용한 결과와 유사하지만, intact acrosome의 비율이 높음이 보고된 바 있다(Moraes 등, 1998). 그러나 본 연구의 결과, CTC 염색을 이용하여 동결 용해 후 침체 양상을 관찰하였을 때 3% 농도의 ethylene glycol 처리구에서 유의적으로 낮은 수준의 F pattern의 비율을 관찰하였으며($p < 0.05$), 5%와 7%의 ethylene glycol은 7% glycerol 처리구와 유의적 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1). 이러한 결과는 침체 양상과 정자 활력에 있어 ethylene glycol과 glycerol 사이의 차이점이 없음을 보고한 Swelum 등(2011)의 결과와 일치한다. 그러나 ethylene glycol은 핵과 미토콘드리아 막의 보존을 도우며 정자 세포의 세포막 보존에 있어 glycerol보다 큰 보호성을

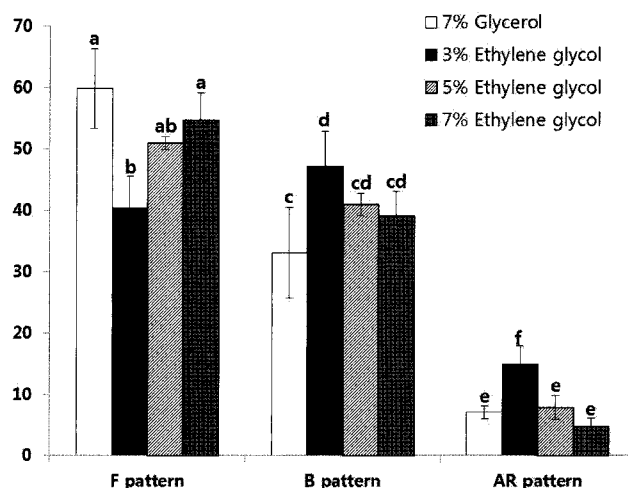


Fig. 1. Change of sperm capacitation status according to different glycerol concentration. ^{ab} F pattern values for 7% glycerol and 3, 5, 7% ethylene glycol concentration with different superscripts were significantly different by ANOVA ($p < 0.05$). ^{cd} B pattern values for 7% glycerol and 3, 5, 7% ethylene glycol with different superscripts were significantly different by ANOVA ($p < 0.05$). ^{ef} AR pattern values for 7% glycerol and 3, 5, 7% ethylene glycol with different superscripts were significantly different by ANOVA ($p < 0.05$).

나타낸다고 하였다(Brisola 등, 1999). 수정능 획득이 된 정자는 hyper-activated motility를 가지며 직선운동보다 활기 찬 운동 양상을 보이고 침체 반응이 일어나게 되는데, 사실상 이러한 현상은 정자세포가 죽음에 이르는 과정이다(Harrison 등, 1996). 냉각기간 동안 세포막은 변형을 겪게 되며, 막 단백질의 파괴가 일어나 세포막의 인지질로부터 탈락하게 되어, 인지질은 fluid에서 gel phase로 변화하게 된다. 이러한 막의 변화는 calcium ion channel의 기능적 손상을 초래하며, 결과적으로 세포 내 Ca²⁺ 농도의 상승을 야기하여 수정능 획득이나 침체 반응과 같은 기작을 보이게 된다(Szasz 등, 2000; Pena 등, 2003). 따라서 동결 용해 후 capacitation-like state의 정자 비율이 사출 시보다 약 25% 정도 높게 나타난다(Pena 등, 2003). 또한, 본 연구의 결과에서와 같이 낮은 농도의 ethylene glycol을 이용하였을 때 B pattern과 AR pattern의 높은 이유는 낮은 농도의 동결보호제가 충분히 세포막내의 수분을 배출시키지 못해 정자 세포막의 손상을 초래하여 capacitation-like state를 야기시켰다고 사료된다. Fig. 2는 예비 동결 조건이 정자의 침체 양상에 미치는 결과이다. 본 연구의 결과, LN₂에 낮은 높이에서 노출시켜 급속 동

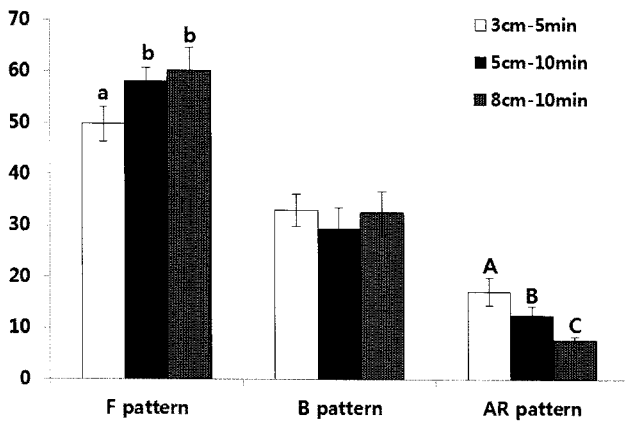


Fig. 2. Change of sperm capacitation status according to different freezing speed. ^{a,b} F pattern values for 3 cm-5 min, 5 cm-10 min and 8 cm-10 min with different superscripts were significantly different by ANOVA ($p < 0.05$). ^{A-C} AR pattern values for 3 cm-5 min, 5 cm-10 min and 8 cm-10 min with different superscripts were significantly different by ANOVA ($p < 0.05$).

결하는 3 cm, 5 min의 실험구에서 F pattern이 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), AR pattern이 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 예비 동결 조건이 정자의 형태적 변화에 영향을 미친다는 것을 시사한다. 또한, F pattern의 감소와 AR pattern의 증가는 예비 동결 동안 급속한 냉각이 세포막의 손상을 초래하여 capacitation-like state의 형태로 나타난 것이라 사료된다.

본 연구는 제주흑우의 유전자원을 안전하게 확보하고, 그 이용성을 증대시키기 위하여 제주흑우의 동결정액의 적정 제조 방법을 개발하고자 수행하였다. 제주흑우 동결정액의 제조 시 5% ethylene glycol의 첨가가 정자의 활력, 생존율 그리고 수정능력을 유지시켰으며, 침체의 손상 역시 가장 적게 나타났다. 예비동결 조건에 있어 LN₂로부터 3 cm 높이에 5분간 노출시켜 예비동결시 정자의 활력, 생존율 그리고 수정능력에 있어 유의적인 감소를 나타냈으며($p < 0.05$), 5 cm 높이에서 10분, 8 cm 높이에서 10분간 예비 동결한 결과에는 유의적 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 LN₂와 가까운 거리에서의 예비동결은 빠른 cooling으로 인한 침체 손상으로 조기 침체 반응을 유도하기 때문에 예비동결 조건이 정자의 활력과 생존성에 영향을 미칠 뿐만 아니라 정자의 침체 변화 양상에도 영향을 끼치는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 제주흑우의 유전자원 보존과 증식을 위한 안정적인 동결정액 제조법을 수립하기 위하여 제주흑우의 정액 동결 제조에 있어 동결 용해 후 ethylene glycol이 정자의 운동성, 생존율 그리고 침체에 미치는 영향에 대하여 알아보고자 수행하였다. 제주흑우의 동결정액 제조시 5%의 ethylene glycol의 첨가가 72.5±5.00%의 활력과 54.88±0.66%의 생존율 그리고 46.00±2.40%의 정자막 온전성을 나타내 3%와 5%의 ethylene glycol을 첨가한 실험구보다 유의적으로 높은 결과를 나타냈다($p < 0.05$). 또

한, 7% glycerol을 사용한 실험구와 비교하였을 때 5% ethylene glycol을 첨가하였을 때 유의적으로 높은 생존율과 정자막 온전성을 나타냈다($p < 0.05$). 또한, 예비 동결 조건이 정자의 성상에 미치는 영향에 있어서는 3 cm, 5 분 예비동결 실험구에서 생존율과 정자막 온전성이 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). Ethylene glycol이 정자의 침체 양상에 미치는 영향에 있어서는 5%와 7%의 ethylene glycol을 사용하였을 때 효과적으로 침체가 보호되어 F pattern의 비율이 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), 조기 침체 반응도 유의적으로 낮은 수준을 보였다($p < 0.05$). 그러나 7%의 glycerol과 비교하였을 때는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 5%와 7% ethylene glycol 사이의 유의적 차이도 나타나지 않았다. 예비 동결 조건이 정자의 침체 양상에 미치는 영향에 있어서는 역시 정자의 생존율과 정자막 온전성과 같이 3 cm, 5분 예비동결 시 유의적인 F pattern의 감소와 조기 침체 반응에 의한 AR pattern의 증가를 볼 수 있었다($p < 0.05$). 이와 같은 결과는 본 연구에서 사용된 ethylene glycol과 예비동결 조건의 조합으로 나타난 결과를 활용하여, 희소가축의 생식세포 보존 및 유전자원 확립을 위한 중요한 자료가 될 것이며, 생존율과 운동성 증대를 위한 다양한 희석제를 활용한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Abdel-Khalek EA, Shalaby NA, Eid LN, Gbr AA (2008): Effect of various types and levels of cryoprotectants on sperm motility during freezing processes of Egyptian Buffalo semen. J Agric Sci Mansoura Univ 33:7157-7171.
2. Alvarenga Ma, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros AS (2005): Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. Anim Reprod Sci 89:105-113.
3. Amann RP, Pickett BW (1987): Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. Equine Vet Sci 7:145-176.
4. Ashwood-Smith MJ (1987): Mechanisms of cryoprotectant action. Symp Soc Exp Biol 41:395-406.
5. Ball BA, Vo A (2001): Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. J Androl 22:1061-1069.
6. Brisola LBS, Neves JPM, Goncalves PBD, Oliveira JFC, Montagner MM (1999): Integridade das membranas plasmáticas, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados na vaca. Ciencia Rural 29:527-531.
7. Buhr MM, Fiser P, Bailey JL, Curtis EF (2001): Cryopreservation in different concentration of glycerol alters boar sperm and their membranes. J Androl 22:961-969.
8. Chenier T, Merckies K, Leibo S, Plante C, Johnson

- W (1998): Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. Proc. 44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Baltimore, Maryland, USA, pp 5-6.
9. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995): Ca^{2+} -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40: 233-241.
 10. Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK (1995): Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 53:985-995.
 11. Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK (1996): Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J Reprod Fertil* 107: 87-95.
 12. Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Peter AT, Critser JK (1998): Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod* 58:28-36.
 13. Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK (2000): Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod* 15: 335-343.
 14. Guthrie HD, Liu J, Critser JK (2002): Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 67:1811-1816.
 15. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
 16. Hammerstedt RH, Graham JK (1992): Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38.
 17. Harrison RAP, Ashworth PJC, Miller NGA (1996): Assessment of sperm function under fertilizing conditions. *Reprod Dom Anim* 31:25-30.
 18. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Prez-Pelaez M, Carbo BG, Zaneveld LJ (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70:219-228.
 19. Mantovani R, Rota A, Falomo ME, Bailoni L, Vincenti L (2002): Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: sperm quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev* 42:217-226.
 20. McGonagle LS, Goldstein M, Feldschuh J, Foote RH (2002): The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian J Androl* 4:137-141.
 21. Moraes CN, Neves JP, Goncalves PBD, Oliveira JFC, Schweitzer CM (1998): Criopreservac, ao do semen ovino em pellets com etileno glicol (ethylene glycol for freezing ram semen in pellets). *Ciencia Rural* 28:287-292.
 22. Pelps MJ, Liu J, Benson JD, Willoughby CE, Gilmore JA, Critser JK (1999): Effects of Percoll separation, cryoprotective agents and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod* 61:1031-1041.
 23. Peña AI, López-Lugilde L, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradón PG (2003): Studies on the intracellular Ca^{2+} concentration of thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. *Reprod Dom Anim* 38:27-35.
 24. Pereira SM, Rigon RM, Mezzalana A, Cecim M (2002): Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. *Ciencia Rural* 32:649-655.
 25. Polge C, Smith AU, Parkes AS (1945): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666.
 26. Rohilla RK, Tuli Rk, Goyal RL (2005): Comparative study of the effects of cryoprotective agents in freezing Murrah Buffalo bull semen. *Indian J Vet Res* 14:37-43.
 27. Sieme H, Harrison RA, Petrunkina AM (2008): Cryobiological determinants of frozen semen quality with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 107:276-292.
 28. Squires EL, Keith SL, Graham JK (2004): Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62:1056-1065.
 29. Swelum AA, Mansour HA, Elsayed AA, Amer HA (2011): Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing extenders. *Theriogenology* 76:833-842.
 30. Szasz F, Sirivaidyapong Sm, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti And L, Gaddella BM (2000): Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev* 55:289-298.
 31. Vidament M, Daire C, Yvon JM, Doligez P, Bruneau B, Magistrini M (2002): Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58:249-251.
 32. Willoughby CE, Mazur P, Peter AT, Critser JK (1996): Osmotic tolerance limits and properties murine spermatozoa. *Biol Reprod* 55:715-727.
 33. 이재협, 박 향, 박흠대, 김재명 (2003): 개 정자의 동결 보존에 있어서 Glycerol 농도, 동결 및 융해 속도가 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향. *한국수정란*

- 이식학회지 18:195-201.
34. 조상래, 최선호, 최창용, 손준규, 김재범, 김성재, 손동수, 김현중 (2009): AndroMed를 이용한 흑우 동결 정액으로 체외수정란 생산 효과. 한국수정란이식학회지 24:207-212.
35. 최선호, 김성재, 조상래, 최창용, 손준규, 유용희, 조영재, 최귀철, 문윤영 (2010): 말 정액 동결시 Glycerol농도와 동결 속도가 생존율에 미치는 영향. 한국동물번식학회지 34:271-274.
(접수일자: 2011. 9. 9 / 채택일자: 2011. 9. 22)