

## 소형 개 RSP-S와 RSP-T 정액의 동결 용해후의 생존성에 관한 연구

김 상 근<sup>†</sup>

충남대학교 수의과대학

### Studies on the Viability of Frozen Removed Seminal Plasma by Saline(RSP-S) and Tris-buffer(RSP-T) Semen of Small Species Dogs

Kim, S. K. <sup>†</sup>

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

#### ABSTRACT

This study was carried out to investigate the general characteristics such as volume, sperm concentration, sperm motility, sperm abnormality on whole semen, RSP-S and RSP-T semen and fractional semen of small size dogs, and the effect of temperature and preservation time and cryopreservation on motility of whole and RSP-S and RSP-T semen. Multiple ejaculates were collected from small dogs by the digital manipulation of penis.

1. The volume per ejaculate semen, sperm of concentration and motility and abnormal sperm rate of 1st fractional semen were  $0.65 \pm 0.09$  ml,  $4.52 \pm 0.35 \times 10^6$  cells/ml,  $15.64 \pm 3.85\%$  and  $5.50 \pm 0.62\%$ . Also, 2nd fractional semen were  $1.25 \pm 0.20$ ml,  $3.35 \pm 0.48 \times 10^6$ cells/ml,  $96.25 \pm 4.65\%$  and  $4.24 \pm 0.46\%$ . And 3rd fractional semen were  $1.45 \pm 0.21$ ml,  $3.85 \pm 0.52 \times 10^6$ cells/ml,  $92.82 \pm 4.24\%$  and  $4.66 \pm 0.58\%$ , respectively.
2. The sperm of concentration and motility and abnormal sperm rates of whole, RSP-S and RSP-T semen were  $5.45 \pm 0.82 \times 10^6$  cells/ml,  $95.55 \pm 4.65\%$ ,  $4.58 \pm 0.45\%$  and  $4.82 \pm 0.36 \times 10^6$ cells/ml,  $90.10 \pm 3.42\%$ ,  $6.48 \pm 0.68\%$  and  $4.55 \pm 0.45 \times 10^6$ cells/ml,  $93.25 \pm 3.85\%$ ,  $4.82 \pm 0.58\%$ , respectively.
3. The motility of whole, RSP-S and RSP-T semen were higher at  $4^\circ\text{C}$  than at  $38^\circ\text{C}$ . When preservation temperature was at  $4^\circ\text{C}$ , survival rates of RSP-S and RSP-T sperm were  $97.54 \sim 6.25\%$  at  $1 \sim 72$  hrs,  $97.40 \sim 5.62\%$  at  $1 \sim 100$  hrs, respectively.
4. The survival rates of slow and rapid frozen 2nd fraction, RSP-S and RSP-T semen were  $67.3 \pm 4.45\%$ ,  $88.8 \pm 4.46\%$  and  $46.4 \pm 3.84\%$ ,  $74.4 \pm 4.20\%$ , respectively. Survival rates was significantly higher in frozen RSP-S and RSP-T semen than that in control group( $8.5 \pm 2.12\%$ ).

(Key words : Dog, RSP-S, RPS-T, Freezing, Survival rate)

#### I. 서 론

최근 들어 애완동물의 사육수가 급격히 증가되고 있으나 번식은 자연교미에 의해 이루어지고 있어 동결정액에 의한 인공수정의 실용화가 절실히

<sup>†</sup> Corresponding author : Coll. of Vet. Med., Chungnam National University, Taejon, 305-764, Korea. E-mail : kskkim@hanbat.cnu.ac.kr

요청되고 있다. 그러나, 개 정액은 가축의 정액과는 생리적인 큰 차이로 동결에 어려움이 있어 정액의 동결시 낮은 생존성과 수태율때문에 주로 단기보존에 의존해 왔으나 원하는 시기에 편리하게 이용할 수 없는 단점이 있어 생존성이 높은 동결법의 개발이 절실히 요청되고 있다(Calson, 1954; Mann, 1964; Gunzel, 1986; Foote 등, 1960).

개 정액의 정장성분은 정자에 유해한 효소를 가지고 있으며, 정장내에 유리되어 있는 원형질 소적(cytoplasmic droplets)은 많은 lysosomal enzyme를 포함하고 있어 이를 제거하지 않은 상태에서 정액을 보존할 경우 정자의 생존성에 유해한 것으로 알려져 있다(Dott와 Dingle, 1968; Allison과 Hartree, 1970; Allen과 England, 1992). 개 정액은 제 1분획과 제 3분획에 존재하는 정장에 의해 희석된 신선정액의 인공수정시 수태율은 감소하지 않았으나 체외에서 정자를 보존할 때 정자에 의한 생존성 감소가 나타났다고 보고하였다(Maule, 1960; Arthur, 1975). Province 등(1984), Davis 등(1963)과 Foote(1964)은 각각 개 정액을 20% egg yolk extender를 사용해서 2~4일, 4~8일간 냉장보존했을 때 50%의 운동성이 유지되었다고 하였으며, Seager와 Fletcher(1973)는 1~4일간 보존한 정액으로 수정시켰을 때 53%의 수태율을 보고하였다. 또한, Harrop(1962)은 동결 용해후에 45~50%의 정자 생존성을 보고하여 개 정액의 동결처리에 의한 장기보존의 가능성을 시사하였으며, Seager 등(1975)은 개 동결정액을 이용하여 임신 및 분만에 처음으로 성공하였다.

Rota 등(1996)은 tris-buffer액에 0.5%의 Equex STM paste를 첨가하여 급속동결시 유의한 정자생존율과 활력을 나타냈다고 하였다. 이러한 보고들을 종합해 볼 때 보고자간에 다소 차이가 있으나 주로 단기보존에 대한 연구들이 대부분을 이루고 있으며 동결보존한 경우는 생존율과 임신율이 낮아서 생존성이 높은 동결법의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

본 연구는 소형견 정액의 원정액과 정장제거 정액의 일반성상, 채취분획 정액의 정자지수 및 정장제거 정액의 단기보존 및 동결보존후의 정자의 생

존성에 대해 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

시험에 이용한 개는 건강하고 번식력이 있는 성숙한 수컷 소형종(요크셔테리어, 2~4세) 6두를 대상으로 구충과 예방접종을 실시하고 3주간 예비사육후 시험에 이용하였다.

### 2. 정액의 채취

정액은 수지 마사지법(Boucher 등, 1958)에 의해 정액을 분획별로 채취하거나 정자농도가 가장 높은 제 2 분획부분을 채취하여 시험에 이용하였다. 채취한 원정액중 일부는 정액의 일반적 검사 즉 정액량, 정자수, 활력 및 기형정자수 검사에 이용하고 나머지는 원정액을 전처리후 단기보존 및 동결시험에 이용하였다.

### 3. 정액의 동결

#### 1) 정액의 희석

채취한 원정액의 정장성분을 제거하기 위하여 원정액에 생리적 식염수(RSP-S)와 1:3의 tris-buffer(RSP-T)액으로 희석하여 700g으로 6분간 원심분리하여 상층액을 버리고 정자 pellets을 동결희석액으로 2단계 희석하였다(Table 1). 첫째로 1.5 ml의 extender-1액을 실온에서 첨가하고, 희석된 액은 4°C에서 45분간 냉장한다. 둘째로 냉장후 1.5 ml의 extender-2와 extender-2'액을 4°C에서 첨가하고 25분간 냉장후 몇번 부드럽게 거꾸로 흔들어 혼합한다. 최종 정자농도는  $40 \times 10^6$  cells/ml 이상이 되도록 하고 내동제 평형후 정자수, 활력, 기형정자수 등의 정자지수를 측정한다.

#### 2) 정액의 straw내 충전

희석정액을 straw 주입기로 0.25 ml의 straw(Fujihara, Japan)내에 희석액층, 공기층, 정액, 공기층, 희석액층 순으로 주입기에 의해 충전하였다.

#### 3) 동 결

**Table 1. Component of semen extender**

Compositopn	Extender-1	Extender-2	Extender-2'	Tris-buffer
Tris-buffer(g)	2.4	2.4	2.4	2.4
Citric acid monohydrate(g)	1.4	1.4	1.4	1.4
Fructose(g)	0.8	0.8	0.8	0.8
Na-benzylpenicillin(g)	0.06	0.06	0.06	0.06
Streptomycin sulphate(g)	0.1	0.1	0.1	0.1
Egg-yolk(ml)	20	20	20	
Glycerol(ml)	3	7	7	
Equex STM paste(ml)	0	0	1	
D.W.	100	100	100	100
pH	6.53	6.56	6.48	6.6
Osmotic pressure	760	1400	1380	260

**(1) 초급속 동결**

예냉 1시간후 LN<sub>2</sub>가 들어있는 용기에 액체질소 부표 5 cm 위에 straw rack을 놓고 이에 straw를 걸쳐 식빙하여 LN<sub>2</sub>에 침지하는 방법에 의해 동결하였다.

**(2) 완만동결**

희석정액을 autorecorder로 확인하면서 실온에서 -4°C까지는 1°C/min., 4°C에서 -30°C까지는 0.2°C/min., -30°C에서 -38°C까지는 0.2°C/min.으로 동결후 곧바로 LN<sub>2</sub>에 침지하는 자동세포동결법 (Cell Freezer Forma Co., USA)으로 동결하였다.

**4. 용해**

용해는 동결 후 1개월간 보존된 straw를 실온에 30초간 방치후 37°C의 항온수조내 온수에서 용해 후 내용제를 제거하기 위하여 거꾸로 흔들어 10분간 방치한 후 tris-buffer액에 옮겨 용해하였다.

**5. 생존성 검사**

생존성검사는 용해한 정액 sample을 slide glass에 옮겨 현미경하에서 관찰하거나, 정자분석계 (SQA-IIB, Israel)로 활력, 생존정자수, 형태적 검사 등을 실시하였다

**6. 통계학적 분석**

시험결과는 분산분석에 의해 표준편차와 처리간의 유의차를 평가하기 위하여 Duncan의 다중검증을 실시하였다.

**Ⅲ. 결과 및 고찰**

**1. 개 정액의 일반성상**

정액을 마사지법에 의해 각 분획별로 채취하여 정자분석기로 정자수, 활력 및 기형정자수 등의 일반성상검사 결과는 Table 2와 같다.

분획별로 채취한 정액의 일반성상을 정자분석기

**Table 2. General characteristics of whole semen by fractional collection**

Collection methods	Vol. (ml)	Sperm con. ( $\times 10^6$ cells/ml)	Motility (%)	Abnormal sperm(%)
The 1st fraction <sup>a</sup>	0.65±0.09	4.52±0.35	15.64±3.85	84.36±0.62
The 2nd fraction <sup>b</sup>	1.25±0.20	3.35±0.48	96.25±4.65	3.75±0.46
The 3rd fraction	1.45±0.21	3.85±0.52	92.82±4.24	7.18±0.58

\* Values with different superscripts within column were significantly difference (p<0.05).

로 측정했을 때 제 1분획의 정액량은  $0.65 \pm 0.09$  ml, 정자농도는  $4.52 \pm 0.35 \times 10^6$  cells/ml, 정자의 활력은  $15.64 \pm 3.85\%$ , 기형정자수는  $84.36 \pm 0.62\%$ 로 나타났으며, 제 2분획의 정액량은  $1.25 \pm 0.20$  ml, 정자농도는  $3.35 \pm 0.48 \times 10^6$  cells/ml, 정자의 활력은  $96.25 \pm 4.65\%$ , 기형정자수는  $3.75 \pm 0.46\%$ 로 나타났으며, 제 3분획의 정액량은  $1.45 \pm 0.21$  ml, 정자농도는  $3.85 \pm 0.52 \times 10^6$  cells/ml, 정자의 활력은  $92.82 \pm 4.24\%$ , 기형정자수는  $7.18 \pm 0.58\%$ 로 나타났다. 이러한 결과는 개 정액의 제 2분획 정액의 활력이 가장 높고 기형 정자수가 가장 적게 나타났다는 Allen과 England(1992)의 결과와 일치하였다.

## 2. RSP-S와 RSP-T처리 정액의 일반성상

제 2차 분획 정액을 생리적 식염수(RSP-S)와 tris-buffer(TSP-T)액으로 희석하고 원심분리에 의해 정장을 제거한 후 37°C에서 보존했을 때 정자의 농도, 활력, 기형정자수 등의 일반성상은 Table 3과 같다.

제 2차분획 RSP-S군의 정자농도는  $4.82 \pm 0.36$

$\times 10^6$  cells/ml, 정자활력은  $90.10 \pm 3.42\%$ , 기형정자수는  $9.90 \pm 0.68\%$ 였으며, RSP-T군의 정자농도는  $4.55 \pm 0.45 \times 10^6$  cells/ml, 정자활력은  $93.25 \pm 3.85\%$ , 기형정자수는  $6.75 \pm 0.58\%$ 로서 대조군인 원정액의 정자농도  $5.45 \pm 0.82 \times 10^6$  cells/ml, 정자활력  $95.55 \pm 4.65\%$ , 기형정자수  $4.45 \pm 0.45\%$ 에 비해 현저하게 높게 나타났다. 이러한 결과는 시험방법에 다소 차이가 있지만, 냉각정액을 배양했을 때 배양 1일째 정장제거군은 85.5%, glycerol-정장제거 복합처리군은 75.5%로서 대조군의 72.7%에 비해 유의한 운동성을 나타냈다는 Boucher 등(1958)의 결과보다는 높은 결과이었다.

## 3. 정장 제거 정액의 보존성

### 1) RSP-S 및 RSP-T 정액의 단기보존

분획정액을 식염수(RSP-S)와 tris-buffer(RSP-T)액으로 희석후 원심분리에 의해 정장을 제거후 4°C 및 38°C에서 보존했을 때 정자의 생존성은 Table 4와 같다.

RSP-S 및 RSP-T 정액을 4°C에서 보존했을 때

**Table 3. General characteristics of 2nd fractional whole semen, RSP-S and RSP-T semen**

Dilution of semen	Sperm con. ( $\times 10^6$ cells/ml)	Motility (%)	Abnormal sperm (%)
Whole semen	$5.45 \pm 0.82$	$95.55 \pm 4.65$	$4.45 \pm 0.45$
RSP-S	$4.82 \pm 0.36$	$90.10 \pm 3.42$	$9.90 \pm 0.68$
RSP-T	$4.55 \pm 0.45$	$93.25 \pm 3.85$	$6.75 \pm 0.58$

\* RSP-S : Removed seminal plasma by saline, RSP-T : Removed seminal plasma by tris-buffer.

**Table 4. Survival rates according to preservation time and temperature on RSP and TDS semen**

Treatment (°C)	Survival rates(%) of preservation time(hrs)									
	1	10	20	30	40	50	72	80	100	
Conrola	4	97.24	88.42	75.35	57.27	21.36	4.82	0	0	0
	38	95.52	45.36	17.57	5.55	0	0	0	0	0
RSP-S	4	97.54	91.65	87.55	67.25	54.50	27.28	6.25	0	0
	38	96.45	61.74	42.33	22.55	7.45	0	0	0	0
RSP-T <sup>b</sup>	4	97.40	93.35	87.62	74.45	61.85	52.25	43.50	27.35	5.62
	38	95.60	72.50	54.35	37.24	24.55	8.65	0	0	0

\* Values with different superscripts within column were significantly difference ( $p < 0.05$ ).

**Table 5. Survival rates of frozen-thawed RSP-S and RSP-T semen by slow and rapid freezing**

Treatment	Sperm motility of frozen-thawed semen	
	Survival sperm(%)	Dead sperms(%)
Control <sup>a</sup>	8.5 ± 2.12	91.5 ± 6.4
RSP-S	Slow-freezing	67.3 ± 4.45
	Rapid-freezing	46.4 ± 3.84
RSP-T <sup>b</sup>	Slow-freezing	88.8 ± 4.46
	Rapid-freezing	74.4 ± 4.20

\* Values with different superscripts within column were significantly difference (p<0.05).

생존율은 각각 1~72시간(97.54~6.25%)과 1~100시간(97.40~5.62%)에서 생존성이 유지되었고, 38℃에서 보존했을 때 1~40시간(96.45~7.45%)과 1~50시간(95.60~8.65%)에서 생존성이 유지되었다. 이는 대조군인 원정액의 1~50시간(97.24~4.82%)과 1~30시간(95.52~5.55%)의 생존성에 비해 높게 나타났다. 이러한 결과는 개 정액을 35~37℃에 보존했을 때 약 20시간에서 생존성이 유지되었다고 한 Arthur(1975)의 결과에 비해 높은 생존성을 나타냈다. 한편, Province 등(1984)은 개 정액을 5℃에 보존시 희석액내에 6% glycerol을 첨가하였을 때 정자의 운동성을 억제하고, 3% glycerol을 첨가시에는 정자의 운동성에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.

#### 2) 정장 제거 정액의 동결

제 2분획정액을 RSP-S와 RSP-T로 희석후 원심분리에 의해 정장을 제거한 후 내동제인 extender-1, -2 및 -2'액으로 4℃에서 평형 냉각시킨 다음 완만 및 초급속으로 동결후 융해했을 때 정자의 생존율은 Table 5와 같다.

분획정액을 RSP군, TDS군으로 나누어 완만 및 초급속 동결 융해했을 때 생존율은 각각 67.3±4.45%, 88.8±4.46% 및 46.4±3.84%, 74.4±4.20%로서 대조군의 8.5±2.12%에 비해 높게 나타났다. 이러한 결과는 개 정액의 동결 후 생존율이 40~65%이었다는 武石 등(1975), Harrop(1962) 및 Foote (1964) 등의 결과에 비해 높게 나타났다. TSP군의 동결정액은 인공수정에 활용할 수 있을 것으로 판

단되었으며, 이를 인공수정에 이용시 임신율에 대해 추후 계속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

#### IV. 적 요

본 연구는 소형 개의 동결정액을 개발하여 인공수정에 이용하고자 제 2차 분획정액을 생리적 식염수와 tris-buffer액으로 희석하고 원심분리에 의해 정장성분을 제거한 RSP-S 및 RSP-T 정액의 일반성상과 단기보존 및 동결보존시의 생존성에 대해 조사하였다.

1. 제 1분획의 정액량은 0.65±0.09 ml, 정자농도는 4.52±0.35×10<sup>6</sup>cells/ml, 활력은 15,64±3.85%, 기형정자수는 84.36±0.62%였으며, 제 2분획의 정액량은 1.25±0.20 ml, 정자농도는 3.35±0.48×10<sup>6</sup>cells/ml, 활력은 96.25±4.65%, 기형정자수는 3.75±0.46%였으며, 제 3분획의 정액량은 1.45±0.21 ml, 정자농도는 3.85±0.52×10<sup>6</sup>cells/ml, 활력은 92.82±4.24%, 기형정자수는 4.66±0.58%였다.
2. 제 2분획 정액의 RSP-S군의 정자농도는 4.82±0.36×10<sup>6</sup>cells/ml, 활력은 90.10±3.42%, 기형정자수는 9.90±0.68%였으며, RSP-T군의 정자농도는 4.55±0.45×10<sup>6</sup>cells/ml, 활력은 93.25±3.85%, 기형정자수는 6.75±0.58%였다. 이는 대조군의 정자농도 5.45±0.82×10<sup>6</sup>cells/ml, 활력 95.55±4.65%, 기형정자수 4.45±0.45%에 비해 높게 나타났다.

3. 제 2분획 정액을 RSP-S와 RSP-T로 처리한 정액을 4°C에서 보존했을 때 각각 1~72시간(97.54~6.25%)과 1~100시간(97.40~5.62%)에서 생존성이 유지되었고, 38°C에서 보존했을 때 1~40시간(96.45~7.45%)과 1~50시간(95.60~8.65%)에서 생존성이 유지되었다. 이는 무처리 대조군의 1~50시간(97.24~4.82%)과 1~30시간(95.52~5.55%)에 비해 생존성이 높게 나타났다.
4. 제 2분획 정액을 처리한 RSP-S군의 정액을 완만 및 초급속 동결후 융해했을 때 생존율은 각각  $67.3 \pm 4.45\%$ 와  $46.4 \pm 3.84\%$ 였으며, RSP-T군 정액은  $88.8 \pm 4.46\%$ 와  $74.4 \pm 4.20\%$ 로서 대조군의  $8.5 \pm 2.12\%$ 에 비해 높게 나타났다.

## V. 인용문헌

1. Allen, A. C. and England, G. C. W. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology* 37(2):373-381.
2. Allison, A. C. and Hartree, E. F. 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fert.* 21:501.
3. Arthur, G. H. 1975. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 4th ed. The English Language Book Society and Bailliere Tindall. England pp.335-337.
4. Boucher, J. H., Foote, R. H. and Kirk, R. W. 1958. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of semen reserves. *Cornell Vet.* 48:67-86.
5. Calson, W. D. 1954. The successful shipment of dog semen. *North Am. Vet.* 35:448-449.
6. Davis, I. S., Brattion, R. W. and Foote, R. H. 1963. The livability of spermatozoa at 5, 25 and 85°C in tris-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders. *J. Dairy Sci.* 46:333-336.
7. Dott, H. M. and Dingle, J. T. 1968. Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. *Exp. Cell Res.* 52:523.
8. Foote, R. H. 1964. The effects of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog sperm stored buffered-yolk mediums. *Am. J. Vet. Res.* 25:32-36.
9. Foote, R. H., Gray, L. C. and Young, D. C. 1960. Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20% egg yolk extenders. *J. Dairy. Sci.* 43:1330-1334.
10. Gunzel, A. R. 1986. Semen collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarzti Prax.* 14:275-282.
11. Harrop, A. E. 1962. Artificial insemination in the dog. In the semen of animals and artificial insemination. J. P. Maule, ed. Commonwealth Agri. Bureaux, Farnham Royal, England pp. 186-189.
12. Mann, T. 1964. *The biochemistry of semen of the male reproduction.* Tract Methuen, London, England pp.345-348.
13. Maule, J. P. 1960. *The Semen of Animals and Artificial Insemination*, Commonwealth Agri. Bur., Farnham. Royal, England pp.287-285.
14. Province, C. A., Ammann, R. P., Pickett, B. W. and Squires, E. L. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *theriogenology* 22:409-415.
15. Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. 1996. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. *Theriogenology* 3:1093-1101.
16. Seager, S. W. J. and Fletcher W. S. 1973. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet. Rec.* 92:6-10.
17. Seager, S. W. J., Platz, C. C. and Fletcher, W. S. 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. *J. Reprod. Fertil.* 45:189

-192.

18. 武石 昌敬, 見上 孝, 兒玉 幸夫. 1975. イヌの繁殖に関する研究。Ⅷ. 凍結精液 授精による受

胎率について。日本家畜繁殖誌 22:28-33.

(접수일자: 2001. 6. 15. / 채택일자: 2001. 7. 12.)