

개 정액 냉각용 및 동결용 조성물, 이를 이용한 개 정액 냉각 및 동결방법 그리고 냉각 및 동결된 정자를 이용한 개 인공수정 방법

이지훈, 신현민, 모창기, 이근상, 김승길, 김종환, 김태석 | (주)베타즌 동물의료 사업본부

개 요

본 연구는 개 정액의 냉각용, 동결용 조성물 및 이를 이용한 개 정자의 냉각 및 동결 방법 그리고 냉각 및 동결된 정자를 이용한 개 인공수정 방법에 관한 것을 다루고 있다.

개 정액 동결보존에 있어서 동결 속도를 최적으로 조절하고 최적의 동결보호제를 사용함으로써 동결 과정에서 발생할 수 있는 정자의 손상을 최소화하고 동결 후 정자의 생존율을 향상시킬 수 있다.

연구기 속이는 기술 분야 및 그 분야의 중례 기술

본 연구는 개 정액의 냉각용, 동결용 조성물 및 이를 이용한 개 정자의 냉각 및 동결 방법 그리고 냉각 및 동결된 정자를 이용한 개 인공수정 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 개 정액 동결보존에 있어서 최적의 냉각용 조성물 및 동결용 조성물을 사용하여 개 정액을 냉각 및 동결 보존하는 방법, 그리고 동결된 정액을 용해하여 발정주기 암수에 주입하여 인공 수정하는 방법에 관한 것이다.

근래 의학의 눈부신 발달에 힘입어 인간의 평균 수명이 점차로 증가하고 있어, 자식과 독립하여 사는 노인들이 점차 증가하고 있다. 또한 독신남성뿐만 아니라, 여성의 경제적 능력이 향상됨에 따라 점차로 혼자서 생활하는 독신 여성도 점차로 증가하고 있다. 이로 인해 고령화 노인, 혼자서 생활하는 독신들에 있어서 반려 동물(companion animal)로서 개(dog)에 대한 수요가 점차로 증가하고 있다. 뿐만 아니라, 유아기 및 청소년기에 있어서 정서적 측면에서 애완 동물(pet animal)로 개를 많이 키우고 있는 실정이다. 더 나아가서 특수 목적으로 사용되는 개, 예를 들면, 맹인 안내견, 군견, 사냥견 등에 대한 수요도 점차로 늘어나고 있다.

이와 같이 개에 대한 수요가 늘어나는 실정에서 종래의 전통적인 자연교배에 의한 개의 공급은 많은 문제점을 가지고 있다.

첫째, 자연교배를 시키고자 하는 암개 및 수개가 물리적으로 멀리 떨어져 있을 경우 이들 암수를 수송해야 하며, 이에 따른 수송 스트레스가 발생한다.

둘째, 자연교배를 시키고자 하는 암수 양측 또는

일측에 신체적 또는 기질적인 요인에 의해 자연 교배를 할 수 없는 경우, 즉, 수캐가 생리적으로 승가할 능력이 없거나, 음경이 암캐의 생식도관을 통과하지 못하는, 즉 암캐의 질이 수캐의 음경을 받아들일 수 없는 구조적 결함이 있을 경우가 발생한다.

셋째, 자연교배에 의해 암, 수캐가 창상을 입을 수 있으며, 이로 인해 생식기 질병이 암, 수캐 상호간에 발생할 수 있다.

넷째, 우수한 혈통 보존을 위한 중부견의 경우 과도한 자연교배 회수가 증가함에 따라 여러 가지 문제점이 발생할 수 있다.

상기와 같은 자연교배에 따른 문제점을 해결하기 위해 개 인공수정 방법이 제안되었다.

개 인공수정은 1780년부터 시작되었다는 보고가 있었으나, 금세기에 와서야 동결 용해된 정자를 이용해서 인공수정시킨 후 산자를 생산하게 되었다. 하지만 정자의 동결, 동결 용해 후 정자의 생존성 및 운동성이 낮아 산자수나 수태율이 저조하기 때문에 실용화되기까지는 많은 어려움이 있다.

본 연구가 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 연구는 정자의 생존성 및 운동성을 향상시킬 수 있는 개 정액의 냉각용, 동결용 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

본 연구의 다른 목적은 상기의 새로운 냉각용, 동결용 조성물을 이용한 개 정액의 냉각 방법 및 동결 방법을 제공하는 것이다.

본 연구의 또 다른 목적은 상기의 동결된 정액의 용해 방법을 제공하는 것이다.

본 연구의 또 다른 목적은 용해된 정액을

사용하여 발정기의 암캐에게 인공수정하는 방법을 제공하는 것이다.

실험의 구성

상기 본 연구의 목적을 달성하기 위한 냉각용 조성물은, 트리스 기저 버퍼(Tris Based-Buffer)와 난황(egg-yolk)으로 이루어진 트리스-난황 버퍼(TE:티.이.버퍼)인 것을 특징으로 한다.

여기서 트리스 기저 버퍼는 본 연구의 특이적인 버퍼로서 트리스[히드록시메틸]아미노메탄, 엔-트리스[히드록시메틸]메탈-2-아미노에탄술포산, 구연산, 포도당, 페니실린/스트렙토마이신 혼합제제, 밀리-큐 워터(Milli-Q water:초순수물) 일정량을 적정비율로 배합하여 구성된 버퍼(Buffer)이다.

더 구체적으로 본 연구의 바람직한 실시 예에 따른 개 정액 냉각용 조성물은, 상기 트리스 기저 버퍼 80부피% 및 난황 20부피%로 이루어진다.

상기 본 연구의 목적을 달성하기 위한 동결용 조성물은 상기 냉각용 조성물을 구성하는 트리스 기저 버퍼, 난황 및 글리세롤(Glycerol)로 이루어진 트리스-난황-글리세롤 버퍼(TEG-Buffer:티.이.지. 버퍼)인 것을 특징으로 한다. 즉, 냉각용 조성물에 동결보호제인 글리세롤이 더 첨가되어 있다. 글리세롤 대신 에틸렌글라이콜 또는 디메틸설폭사이드가 사용될 수 있다. 구체적으로, 바람직한 실시 예에 따른 본 연구에 따른 개 정액 동결용 조성물은, 상기 트리스 기저 버퍼 72부피%, 난황 20부피% 그리고 글리세롤 8부피%로 이루어진다.

상기 본 연구의 다른 목적을 달성하기 위한

본 연구의 정자 냉각 방법은 마사지법, 인공질법 또는 전기충격법에 의해 수캐에서 정액을 채취하는 정액채취단계; 상기 채취된 정액을 상술한 트리스-난황 버퍼로 희석하는 정액희석단계; 희석된 정액을 4℃에서 약 2시간 동안 중탕으로 보관하는 저온보관단계를 포함한다.

상기 정자 연구 방법은, 상기 정액채취 후, 채취된 정액의 냉각 및 동결 가치 여부를 알아보기 위한 정액활성검사단계를 더 포함할 수 있다. 예를 들어 정액활성검사는, 정액의 색 검사, 정자의 운동성 검사, 정자의 형태학적 검사, 정자의 침체 검사, 정자수 검사, 정자의 생사 여부 검사 등이 있다.

일 실시 예에 있어서, 상기 저온보관단계는, 희석된 정액을 제1튜브에 담은 단계; 희석된 정액이 담긴 상기 제1튜브를 37℃(중탕)의 온도를 유지한 물을 채운 제2튜브에 담그는 단계; 상기 제1튜브가 담겨져 있는 상기 제2튜브를 4℃ 아이스박스(Icebox)에 꽂아 약 2시간 동안 보관하는 단계로 이루어진다.

일 실시 예에 있어서, 정액을 약 1.6×108/ml가 되게 희석하며, 상기 제1튜브는 5ml 튜브이며, 상기 제2튜브는 50ml 튜브이다.

상기 본 연구의 목적을 달성하기 위한 정액 동결 방법은, 상술한 트리스-난황-글리세롤 버퍼 용액 및 상술한 냉각 방법의 정액 희석단계에서 희석된 정액을 각각 4℃에서 약 2시간 동안 중탕으로 보관하는 1차 저온 보관단계, 1차 저온 보관된 트리스-난황-글리세롤 버퍼 용액 및 희석된 정액 동량을 단계-단계(step-wise) 방식으로 천천히 섞는 정액-버퍼 혼합단계, 상기 혼합된 정액을 4℃의 냉장고에서 약 30분 동안

방치하는 2차 저온보관단계, 상기 2차 저온 보관된 정액을 액체 질소 표면 상부 소정 높이에서 방치하는 1차 동결단계, 상기 1차 동결된 정액을 상기 액체 질소내부에 보관하는 2차 동결단계를 포함한다.

바람직한 실시 예에 있어서, 상기 2차 저온보관단계는, 상기 혼합된 정액을 0.25ml 까지 스트로에 채우는 단계; 상기 혼합된 정액으로 채워진 스트로를 얼음이든 아이스박스 위에 올려놓는 단계; 상기 혼합된 정액으로 채워진 스트로가 놓여진 아이스박스를 4℃의 냉장고에 약 30분 동안 방치하는 단계로 이루어진다.

바람직한 실시 예에 있어서, 상기 1차 동결단계는, 상기 저온 방치된 정액을 상기 액체 질소 표면 상부 약 10 내지 17cm에서 약 10분 동안 방치한다.

상기 본 연구의 또 다른 목적을 달성하기 위한 동결 보존된 정액의 용해 방법은, 상술한 동결 방법으로 상기 스트로 내에서 동결 보존된 정액을 공기 중에서 약 15-20초 동안 흔든 후 30 내지 37℃의 항온수조에서 약 60초 가량 흔들어 용해하는 것을 특징으로 한다.

상기 본 연구의 또 다른 목적을 달성하기 위한 개 인공수정 방법은, 상술한 용해 방법에 의해 용해된 정액을 상술한 냉각 방법에서 사용된 상기 트리스-난황 버퍼와 혼합하여 총량이 1ml 가 되게 섞는 버퍼-용해된 정액 혼합단계; 수정기로 판단된 암캐의 자궁 정관 내에 상기 버퍼-용해된 정액 혼합액을 주입하는 단계; 주입된 정액의 역류를 방지하기 위해 암캐의 둔부를 수정 후 약 3-5분간 들어올리는 정액 역류 방지 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

경우에 따라서는 수정 중에 할 수도 있다. 상기 인공수정 방법에 있어서, 암개의 수정적기는 질도말법, 호르몬 검사법, 질경을 이용한 링클검사법 등으로 판단한다. 이하 본 연구에 대하여 상세히 설명한다.

동결보존의 원리

먼저 동결보존의 원리를 살펴본다. 정자의 동결과 융해 시에 정자의 원형막질의 안정성이 정자의 활력과 생존에 있어서 가장 중요한 요인이 된다. 널리 알려진 바와 같이, 원형막질은 세포 외부와 세포내부의 경계를 이루며, 세포 내외의 물질이동의 조절자로서 작용한다. 만약, 정자를 0℃로 보관을 하면 세포내의 수분이 빠져 나와서 삼투압의 영향을 받게된다. 한편, 얼리는 속도를 빨리 하게 되면 세포내의 수분이 쉽게 빠져 나오지 못해서 세포 내의 수분이 얼음을 형성하게 된다. 따라서, 얼리는 속도가 세포의 생존에 중요한 작용을 하게 된다. 즉, 얼음의 형성 자체가 아니라, 얼음 형성의 양과 크기가 세포 사멸에 중요한 요인이 된다. 따라서 동결에 있어서 적당한 크기의 양으로 얼음을 형성시키는 것이 중요하며, 이를 위해서는 적당한 동결보호제를 선택함과 동시에 선택된 동결보호제의 농도를 알맞게 하는 것이 중요하다. 또한 정액 동결을 어떠한 방법으로 하느냐도 중요하다. 이에 본 연구는 새로운 냉각 및 동결보호제를 제공함과 동시에, 새로운 냉각 및 동결 방법 그리고, 개 인공수정 방법을 제공한다.

냉각용 조성물

이제, 개 정액의 냉각(cooling)용 조성물 및 냉각

방법에 대해서 살펴본다. 본 연구에 따른 개 정액의 냉각용 조성물은, 트리스 기저 버퍼(Tris Based-Buffer)와 난황(egg-yolk)으로 이루어진 트리스-난황 버퍼(TE-Buffer: 티.이. 버퍼)인 것을 특징으로 한다. 본 연구의 명세서에서, 트리스 기저 버퍼는, 본 연구의 특이적인 버퍼로서, 트리스[히드록시메틸]아미노메탄, 엔-트리스[히드록시메틸]메틸-2-아미노 에탄술폰산, 구연산, 포도당, 페니실린/스트렙토마이신 혼합제제, 밀리-큐 워터(Milli-Q water: 초순수물) 일정량을 적정비율로 배합하여 구성된 버퍼이다.

더 구체적으로, 본 연구의 바람직한 실시 예에 따른 개 정액 냉각용 조성물은 상기 트리스 기저 버퍼 80퍼센트 및 난황 20퍼센트로 이루어진다. 즉 냉각용 조성물 총량(1리터)중 80퍼센트(800밀리리터)가 트리스 기저 버퍼이고, 20퍼센트(200밀리리터)가 난황이다.

본 연구에 따른 냉각용 조성물은 개 정액의 냉각 과정 중에 발생할 수 있는 정자의 손상을 최소화하여 냉각 정액의 정충의 생존성, 활력성 등을 냉각 전과 거의 동일한 상태로 유지시킨다.

개 정액의 냉각 방법

이제, 상술한 냉각용 조성물을 사용한 개 정액의 냉각 방법을 상세히 설명한다. 본 연구에 따른 개 정액의 냉각 방법에 의한 저온 저장의 경우 약 10일 동안 정자의 동결 없이 보존이 가능하며 인공수정에 이용할 수 있다.

1. 정액의 채취

정액을 냉각하기 위해서는 먼저 정액을 채취하여야 한다. 정액은 마사지법, 인공질법 또는

전기충격법에 의해 수관에서 채취한다. 일 예로, 마사지법에 의한 정액 채취 방법을 설명한다. 마사지법은 수관의 음경을 마사지함으로써 비교적 손쉽게 정액을 채취할 수 있는 방법으로 눈금이 새겨진 15ml 코니칼 튜브와 멸균된 깔때기를 사용한다. 정액을 채취할 때 발정기의 암개를 보게 하거나, 발정기 암개의 질도말 면봉 또는 발정기 암개의 질 분비물을 흡습시킨 면이나 스폰지를 수관의 코밑에 가져다가 냄새를 맡게 하면, 더욱더 효과적이다. 또한 미끄러움을 방지하기 위해 수관의 발 밑에 카페트나 가마니를 깔아준다. 정액 채취시, 미리 생식기 외부의 이물을 깨끗이 닦아주어 정액 채취시 발생할 수 있는 오염을 최소화한다. 수관의 정액은 세 분획으로 사정되는데, 첫번째 분획은 약 0.1ml-0.4ml 정도로서, 투명하며, 요도 점막을 발라준다. 두 번째 분획은 정자함유 분획이다. 두번째 분획은, 유백색을 나타내고 정자수가 많을수록 그 색깔은 진하게 보인다. 사출량은 약 0.1-4.0ml 정도이다. 세번째 분획은 청등투명하며 점성이 없다. 이 분획은 전립선에서 분비되며 정자는 포함되어 있지 않으며, 사출량은 약 1-25ml 정도이다.

바람직하게는 정자 함유 분획인 두 번째 분획을 채취하여야 하나, 첫 번째 분획 및 두 번째 분획 사이의 간격은 짧아서 구별이 용이하지 않을 수도 있으므로, 첫 번째 분획 후반기부터 채취하여 두번째 분획까지 채취할 수 있다.

2. 정액활성검사

정액을 채취한 후에는, 정액의 냉각 및 동결 가치 여부를 알아보기 위해, 채취된 정액을 검사한다.

첫째, 정액활성검사로서 먼저 정액의 색 검사가 있다. 정액 채취 코니칼(Cornical) 튜브의 육안적인 모습이 정액의 색이다. 정상적인 정액의 색은 유백색 또는 반투명하다. 비정상적인 정액의 색은 대개 요와 혈액의 혼입에 의한다.

둘째, 정자의 운동성 검사가 있는데, 위상차 현미경을 사용하며, 검사 시 저온에 대한 정자의 민감성을 줄이기 위해서 37℃의 온도를 유지하는 가온 슬라이드를 이용한다. 채취된 정액 1방울을 37℃로 가온된 슬라이드 위에 놓고 동량의 가온된 희석액(2.9% sodium citrate 또는 생리식염수 또는 전립선 분획액)을 첨가한다. 이어서 데워진 커버 슬립(cover slip)을 덮고 정자를 고배율(×400)에서 관찰한다.

정자의 운동성은 아래와 같이 0등급부터 5등급까지 분류된다.

0등급	전혀 운동성이 없음
1등급	아주 약한 운동성
2등급	약한 운동성은 있으나, 주로 휴식을 많이 함
3등급	계속적인 운동은 있으나 미약함
4등급	빠른 운동성을 가짐
5등급	격렬한 전진 운동성을 가짐

※ 정자의 운동성을 검사하여 4등급 이상인 정액만을 냉각 및 냉동 보존한다.

셋째, 정자의 형태학적 검사가 있는데, 위상차 현미경을 이용하며, 글루탈알데히드로 고정하거나 또는 고정 없이 직접 관찰을 한다. 세밀한 조사를 위해서 염색을 할 수 있으며, 로즈-벵갈(Rose-Bengal), 디프-퀵(Diff-Quick), 스퍼맥(Spermac), 에오신-니그로신(eosine-nigro-sine) 등의 염색 방법이 있으며, 정자의 두부 및 꼬리의 이상 여부를 관찰한다. 기형 정자의 백분율을 계산하여

20% 이하이면 정상이다.

넷째, 정자의 침체 검사가 있다. 검사(Giemsa), 웰-아와(Wells-Awa), 스퍼맥, 피.에스.에이/에프.아이.티.씨(PSA/FITC:fluorescein, conjugated lectin Pisum sativum agglutinin) 등의 염색 방법이 있다. 다섯째, 정자수 검사 방법이 있으며, 플로 사이토미터(Flow cytometer), 스펙트로포토미터(Spectrophotometer), 쿨터 카운터(Coulter counter) 및 혈구 계산판을 이용하여 정자의 농도를 계산할 수 있다. 일 예로 혈구판을 이용한 정자수 계산법을 설명한다. 정자수를 계산하기 전에 적당한 농도로 정액을 희석한다. 희석된 정액 10 μ l를 슬라이드 글라스가 놓여진 혈구판에 넣는다. 혈구판은 현미경하에서 관찰하면 25개의 구획으로 되어있다. 각 구획은 가로, 세로가 각각 1mm이고 깊이는 0.1mm이다. 따라서 사정된 정액 1ml당 정자수는 다음과 같이 계산한다.

$$\text{정자수/1ml} = \text{현미경하에서 관찰된 정자수} \times \text{희석배율} \times 10 \times 1000$$

여기서, 곱수 10은 혈구판의 깊이가 0.1mm이기 때문이며, 곱수 1000은 정자의 계산은 ml(cm³)으로 하기 때문이다.

정상 개에서는 정액의 농도는 대략 300 × 10⁶ 내지 2,000 × 10⁶/ml 이다.

여섯째, 정자의 생사검사가 있으며, 세포막의 투과성을 이용하여 정자의 생사를 검사한다. 죽은 정자의 경우 염색액이 쉽게 정자내로 침투하며, 살아있는 정자의 경우 염색액이 침투되지 않아서 염색이 되지 않는다. 에오신(Eosine) 염색, 퍼틸라이트(FertiLight) (Sigmam)를 이용한 다. 일 예로 에오신 염색법을 설명한다. 검사

준비물로서, 도립현미경, 염색액, 완충액, 슬라이드 글라스가 필요하다. 먼저, 슬라이드 글라스 위에서 정액과 염색액을 잘 혼합한다. 이어서 커버 글라스를 덮고 잔여 염색액을 여과지로 제거한다. 커버 글라스를 종으로 당겨 분리하여 슬라이드 글라스 위에 얇게 정액과 염색액 혼합액을 도말한다. 알코올 램프를 이용하여 신속하게 도말된 혼합액을 말린다. 현미경으로 관찰한다.

3. 채취된 정액의 냉각

이상에서 살펴본 바와 같이 수캐로부터 정액을 채취한 후 활성검사를 하여 냉각 및 동결 가치가 있는 것을 판단되면 후술하는 바와 같이 상술한 냉각 조성물을 이용하여 채취된 정액을 냉각한다.

이하에서는 개 정액의 냉각 방법을 자세히 설명한다. 정액 냉각 방법으로 스트로(straw) 방법과 펠릿(pellet) 방법 등이 있으나 이하에서는 스트로 방법을 예로 들어 설명한다.

냉각 및 동결 가치가 있는 정액과 상술한 냉각용 조성물인 트리스-난황 버퍼를 혼합하여 정액의 농도가 1.6 × 10⁸/ml가 되게 정액을 희석한다. 이어서 상기와 같이 희석한 정액을 튜브에 담고 정액이 담긴 튜브를 다시 37℃ 온도를 유지하는 물이 담긴 튜브에 담근 후, 얼음이 채워진 아이스 박스에 꽂아 이를 4℃의 저온 냉장고에 2시간 동안 저온보관한다. 즉 4℃에서 약 2시간 동안 중탕(37℃) 보관한다. 이로써, 본 연구에 따른 개 정액의 냉각이 완료된다. 상술한 본 연구에 따른 냉각용 조성물을 사용하여 상기와 같은 냉각 방법으로 개 정액을 냉각 보존하면, 후술한 동결보존 없이, 보존 10일까지

정자의 생존율이나 운동성, 침체반응 등이 우수하여, 인공수정에 이용할 수 있다.

이때, 상기 희석한 정액을 동결할 때에, 후술할 동결용 조성물도 상기 희석한 정액과 동일한 양으로 동일한 조건에서 저온 보관한다.

4. 저온보존에 따른 개 정자의 침체 및 생존성의 변화

가. 신선정액 검사

채취한 정액을 실험에 사용할 지의 여부를 판단하고자 실험 공시 견 개체별로 정자의 농도와 정상적인 정자의 형태비율을 조사한 결과 신선정액 (fresh semen)의 평균 정액량은 0.9 ml이었으며 정자농도는 ml당 3억 4천 6백만 마리로 정상범주였다. 이는 TE buffer를 희석하여 사용할 수 있는 ml당 8천만 마리 이상이 되는 정상적인 정액만을 선별하여 사용하였다.

나. 정액 저온보존 온도

정액을 저온보존하기 전에 저온보존 방법과 동일하게 온도의 변화와 평형을 이루는 온도를 3번 반복 조사한 결과는 Fig 3과 같다. 저온보존 직후부터 10분까지는 급격한 온도의 감소를 보였으나, 이후에는 완만한 온도의 감소를 보였으며, 4°C로 평형을 이루게 되는 시간까지의 평균 cooling rate는 분당 0.6°C였다.

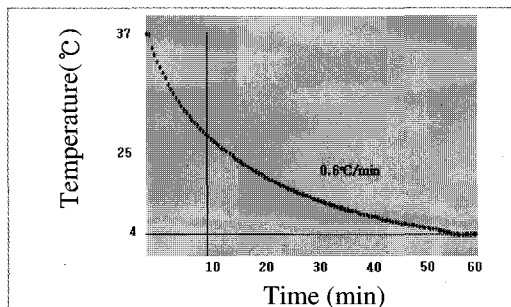


Fig. 3. Curve of cooling ramp rate in a refrigerator adjusted at 4°C.

다. 저온보존의 시간 경과에 따른 정자의 성상 4°C의 상태로 정자를 보존시키면서 시간경과에 따른 정자의 생존율, 정자의 운동성 및 침체의 상태를 조사한 결과를 Table 2에서 보는 바와 같다. 채정 된 직후의 정자의 생존율, 운동성 및 침체의 intact 여부를 100%로 간주하였고, 그에 따른 시간별 상태변화를 백분율로 표기하였다. 생존율은 12시간까지 유의적 감소를 보이지 않았으나, 12시간 이후부터 2일 이내에 약 25%의 감소를 나타내었다. 60%이상의 생존성은 보존 9일까지 지속되었다. 운동성에 있어서도 생존성과 유사한 결과를 보였으나, 상대적인 비율에 있어서는 많은 감소를 보였다. 보존 12시간에 있어서는 69%, 6일째는 59% 그리고 7일에는 급격한 감소를 보여 26%의 수준을 보였다. 저온보존에 대한 가장 많은 변화를 보이는 침체의 경우 보존 2시간 만에 50%의 침체가 이미 reacted 및 reacting 상태로 되었으며, 보존 12시간부터 7일까지 30% 전후의 intact한 상태를 보였다.

본 실험에서 정자를 일정기간 보존하는 동안 정자의 가장 두드러진 변화는 정자의 수명과 운동성, 침체의 형태학적 강도의 단계적인 감소와 수정능력의 급격한 감소로써 이러한 결과는 Rathore와 Mukherjee (1966)와 Farstad (1996)의 보고와 일치되는 경향을 보였다.

정자를 저온 보존함에 있어서 cooling ramp rate는 정자의 생존성 및 운동성에 영향을 미치는 중요한 요인으로 알려져 있다. Fastard (1996)의 보고에 따르면 정자를 4°C까지 저온 보존함에

있어, cooling ramp rate를 분당 2°C로 하였을 때 정자의 생존성 및 운동성에 많은 변화가 없다고 하였으나, 본 실험의 예비실험에서는 분당 0.6°C로 하였을 때 정자의 생존성 및 운동성에 가장 적은 변화를 보였다. 정자의 저온 보존 후 정자의 생존율에 있어서는 저온 보존 후 12시간째에 72%로 2시간째의 90%에 비해 유의적($p<0.05$)으로 감소를 보인 이후 각각 6일째와 10일째에 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다. 이것은 Rota 등(1999)의 결과와 비슷하게 나타났고, 운동성에 있어서는 12시간째에 69%로 2시간째의 88%에 비해 유의적으로 감소한 이후 각각 7일째와 10일째에 감소하였는데, 이것은 Rota 등(1995)의 egg-yolk-tris를 이용한 저온보존에서의 결과와 비교해 볼 때 하루째의 74%인 것 보다 좋지않았으나, 4일째의 54%인 것과 비교해 볼 때 유의성은 나타낼 수 없지만, 좋은 결과를 보였다. 첨제 상태를 비교해 볼 때는 본 실험에서는 12시간째와 9일째에 각각 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다. 이것은 Rota 등(1995)의 4일째의 약 30%의 결과와 비교해 볼 때 유사한 결과를 보였다. 이것으로 본 실험에서 사용한 동결보호제를 이용한 저온보존의 방법으로 정액을 보존하였을 때 최대 6일까지도 보존하여 인공수정에 사용할 수 있을 것으로 사료되어진다.

Table 2. Survivability, motility and acrosome integrity of sperm following different preserve time in a 4°C refrigerator*

Preserve time	Survivability (%)	Motility (%)	Acrosome integrity as an intact (%)
Control	100	100	100
2 h	89.7±0.3 a	88.0±0.8 a	51.3±0.4 a
12 h	71.8±0.5 b	69.1±0.4 b	33.9±0.5 b
1 d	79.4±0.2 b	67.0±0.6 b	32.6±0.5 b
2 d	78.3±0.5 b	65.0±0.5 b	32.0±0.8 b
6 d	64.7±0.8 c	59.4±0.3 b	32.8±0.9 b
7 d	63.3±0.5 c	25.7±0.4 c	33.0±0.7 b
9 d	62.3±0.5 c	18.7±0.2 c	21.5±0.5 c
10 d	48.9±0.8 d	8.0±0.4 d	16.8±0.1 c

a, b, c, Different superscripts in a column differ significant ($P<0.05$). control, ejaculated sperm

*Relative percentages as consider to ejaculate

5. 개 정액 동결용 조성물

이하에서는, 개 정액의 동결용 조성물에 대하여 설명한다. 상술한 개 정액 냉각 방법은 동결 보존없이 단기간 보존(약 10일정도)에 적합한 방법이며, 수십년에서 수백년간 보관이 가능하고 언제라도 인공수정에 이용하기 위해서는 정액의 동결이 필요하다. 이를 위해서 본 연구에서는 새로운 동결용 조성물을 제공한다.

본 연구에 따른 새로운 개 정액 동결용 조성물은, 상술한 냉각용 조성물을 구성하는 트리스 기저 버퍼, 난황 및 글리세롤(Glycerol)로 이루어진 트리스-난황-글리세롤 버퍼(TEG-Buffer: 티.이.지. 버퍼)인 것을 특징으로 한다. 더 구체적으로 본 연구에 따른 냉각용 조성물, 조성물 총량(1리터)당 상기한 트리스 기저 버퍼 72퍼센트(720밀리리터), 난황 20퍼센트(200밀리리터) 및 글리세롤 8퍼센트(80밀리리터)를 함유한다. 여기서, 글리세롤 대신 에틸렌 글라이콜 또는 디메틸설폭사이드가 사용될 수 있다.

6. 개 정액의 동결 방법

이하에서는, 상술한 동결용 조성물을 이용한

개 정액의 동결 방법에 대해서 설명한다. 동결을 위해서는 먼저, 냉각된 정액 및 냉각된 동결용 조성물이 필요하다. 냉각된 정액은, 상술한 개 정액 냉각 방법을 이용하여 준비한다. 또한, 냉각된 동결용 조성물 역시 같은 방법을 이용하여 준비한다. 바람직하게는, 이미 설명한 개 정액의 냉각 방법에서, 희석된 정액을 저온 보관할 때 상기 동결용 조성물도 같이 보관한다. 구체적으로, 상기 동결용 조성물을 튜브에 넣고 이를 37°C의 온도를 유지한 물을 채운 튜브에 담근 후, 얼음이 채워진 아이스박스에 꽂아 이를 4°C의 저온 냉장고에 2시간 동안 1차 저온 보관한다. 즉 4°C에서 약 2시간 동안 중탕(37°C) 보관한다.

1차 저온 보관된 희석된 정액 및 냉각 보존된 동결용 조성물을 동일한 용량 비로 혼합한다. 즉, 동량을 단계-단계(step-wise) 방법으로 아주 천천히 섞는다. 그 결과, 정액은 8 × 107/ml로 재 희석된다. 이렇게 재 희석된 정액을 0.25ml 스트로(straw)에 채운다. 이때, 동결과정에서 정액의 부피가 팽창하기 때문에 스트로 양쪽 끝에 공기 층을 두고 밀봉(sealing)한다. 재 희석된 정액이 담긴 밀봉된 스트로를 얼음이 든 아이스박스 위에 올려놓은 다음 4°C의 냉장고에서 30분 동안 저온 보관한다(2차 저온보관). 2차 저온 보관한 재 희석된 정액이 담긴 스트로를 액체 질소 표면 상부에서 소정 시간 방치한다(즉, 1차 동결한다). 상세하게는 절연 박스, 예를 들어, 아이스박스에 액체 질소를 약 5cm 높이로 채운 후 상기 저온 방치한 스트로를 액체 질소 표면으로부터 약 10 내지 17cm 높이에 약 10분 동안 방치한다. 1차 동결 후, 상기

스트로를 액체 질소에 떨어뜨려 동결하여(2차 동결) 보관한다.

상술한 동결용 조성물을 이용하여 상술한 방법으로 동결 보존된 정액은 동결 중에서 정자의 손상이 최소화되며, 해동(융해)후 정자의 생존율, 운동성 등이 매우 우수하다.

7. 동결보존에 따른 개 정자의 침체 및 생존성의 변화

가. 정액 동결속도

적절한 동결온도와 속도를 결정하기 위해서 액체질소의 표면으로부터 각각 6 cm, 10 cm, 17 cm 및 20 cm의 높이에서 동결속도를 결정한다. 그림 1에서 보는 바와 같이 분당 19°C, 8.9°C, 3°C 그리고 1.6°C씩 감소함을 나타내었다.

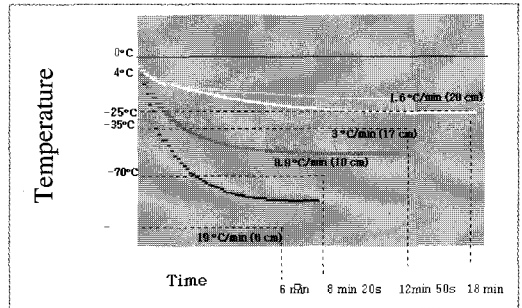


Fig. 1. Curves of freezing ramp rate following different height from the surface of LN2

나. 동결의 속도에 따른 용해 온도별 정자의 성장

개 정액을 액체질소 표면 위의 6 cm, 10 cm, 17 cm 및, 20 cm의 각기 다른 높이에서 동결한 후 37°C, 55°C에서 융해하여 정액의 생존율, 운동성, 침체의 Intact정도를 관찰한 것을 백분율로 환산한 결과를 표2에 나타내었다. 생존율은 37°C에서 융해 시 각각 54.0 ± 4.7, 60.1 ± 2.2,

69.8±3.2 및 43.7±5.8로 나타났는데, 10 cm, 17 cm 상호간의 생존 율에서는 유의적인 차이 (P<0.05)가 없었고, 10 cm와 17 cm에서 6 cm와 20 cm에 비해 유의적으로 생존율이 높았으며 (P<0.05), 10 cm와 17 cm에서는 유의적인 차이를 볼 수 없었다.

55°C 융해후의 생존을 관찰한 결과는 각각 48.1±3.5, 51.1±1.8, 59.4±1.1 및 39.9±1.4 이었는데, 17 cm에서 다른 그룹에 비해 유의적 (P<0.05)으로 높은 생존성을 보였고, 6 cm와 10 cm는 20 cm에 비해 동결한 정자의 생존 율에 유의적으로 높게 나타났다. 다른 온도에서 융해한 후 운동성을 6등급으로 분류된 비율 중

수정이 가능한 3등급이상의 운동성을 가진 정자의 비율을 나타낸 것이다. 37°C에서 융해한 정자의 운동성 중 10 cm 와 17 cm에서 동결한 정자의 운동성이 6 cm 와 20 cm 처리 군에 비해 유의적으로 좋은 결과를 보였다.

동결속도에 따라 정자를 동결한 후 융해온도를 달리하여 정자의 침체의 intact : reacting : reacted로 분류하여, 그 비율을 환산한 것 중 intact한 비율만을 살펴본 결과, 37°C와 55°C의 두개의 융해 온도에서 침체의 intact한 정도는 편차의 폭이 커서 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 온도간에도 수치상의 차이를 볼 수 없었다.

Table 2. Survivability, motility and acrosome integrity of frozen-thawed sperm following different ramp rates and thawing rates*

Height**	Freezing rate	Survivability		Motility		Intact Acrosome	
		37 °C	55 °C	37 °C	55 °C	37 °C	55 °C
6cm	19° C/min	54.0±4.7	48.1±3.5	47.4±4.	36.9±5.0	12.5±7.5	13.1±4.5
		b	b	b	a	a	a
10cm	8.9° C/min	60.1±2.2	51.1±1.8	66.8±5.0	41.9±4.9	17.8±9.1	23.4±0.7
		b	b	a	a	a	a
17cm	3° C/min	69.8±3.2	59.4±1.1	68.3±4.3	50.6±5.8	23.2±8.3	17.1±1.5
		a	a	a	a	a	a
20cm	1.6° C/min	43.7±5.8	39.9±1.4	34.3±3.7	32.9±4.7	9.6±7.7	13.6±4.9
		c	c	c	a	a	a

a, b, c, Different superscripts in a column differ significant (P<0.05).

*Relative percentages as consider to control (79.2±3.2, survivability; 77.6±5.0, Motility; 76.2±9.1, Intact acrosome)

**Height from the surface of the top of LN2

8. 동결 보존된 정액을 이용한 개 인공수정방법

이하에서는 상술한 방법으로 동결 보존된 정액을 이용한 개 인공수정 방법에 대해서 설명한다.

가. 개 정액의 용해 방법

인공 수정을 위해서는 먼저 동결 보존된 정액을 해동(용해)하여야 한다. 본 연구에 따르면, 정액에 특이적인 냉각 및 동결용 조성물을 사용하고 새로운 냉각 및 동결 방법을 사용하기 때문에, 정액의 용해에 특별한 시약을 필요로 하지 않으며, 항온수조에서 용해한다.

먼저, 30 내지 37 °C의 항온수조를 준비하고, 동결한 스트로를 공기 중에서 약 15-20초 동안 흔든 다음 미리 준비된 30 내지 37 °C의 항온수조에서 약 10 내지 30초 동안 상기 스트로를 흔들어 동결된 정액을 용해한다.

이어서 용해한 정액을 에펜달프 튜브(ependolp tube)에 담고 여기에 이미 상술한 개 정액 냉각용 조성물인 트리스-난황 버퍼를 채워 총량이 1ml가 되게 균질하게 섞는다.

나. 발정기 암캐 준비

인공수정을 위해서 발정기 암캐를 미리 준비하여야 한다. 암캐의 발정적기 판단은, 질도말법(Vaginal smear), 호르몬 검사방법, 질경을 이용한 링클 검사법 등이 있다.

질 상피세포는 에스트로젠(estrogen)의 영향으로 각화된 편평상피세포로 성숙하게 되므로, 질도말법에 의해 탈락된 질 상피세포를 검사함으로써, 에스트로젠 분비 양상을 간접적으로 측정할 수 있다. 혈청 에스트로젠은 발정전기부터 계속 상승하여 승가발정 개시 직전에 최고치에

도달하기 때문에, 질도말검사는 의해 암캐의 에스트로젠 영향을 간접적으로 알게 해 주고 교배적기의 단서로서 예측될 수 있다.

호르몬 검사법은 혈청 프로그스테론(progesteron)의 농도를 측정하여 발정적기 여부를 판단하는 방법으로서, 상술한 질도말법과 병행함으로써 정확한 인공수정 적기를 판단할 수 있다.

질경을 이용한 링클 검사법은, 질 내시경을 통해서 질 점막 혹은 질 내강의 주름(링클) 여부를 검사하여 인공수정 적기를 판단하는 방법이다.

다. 인공수정

먼저, 수정용 피펫(또는 튜브)을 유리 주사기에 연결하여 용해된 정액을 흡입한다. 인공수정 대상 수정적기의 암캐를 적당한 테이블 위에 놓고 조수가 잘 보정한다. 외음부를 세척하고 건조시킨다. 이어서 정액이 든 수정용 피펫을 자궁 경관의 외구 또는 경관 내에 삽입하여 정액을 주입하여 인공수정을 한다. 인공 수정 후, 암캐의 둔부를 약 3-5분간 들어올려 정액의 역류를 방지하고 인공수정의 효율을 높이는 것이 바람직하다. 구체적으로, 수정용 피펫을 음순 사이에서 삽입하여 질 내까지 들어갈 때까지는 상방향으로 유도하고, 질 내에 들어간 이후에는 수평방향으로 유도하면서 자궁 경관 또는 경관 내까지 진행한다.

이하에서는 구체적인 실시 예를 통해서 본 연구를 보다 상세히 설명하기로 한다.

정액의 채취

실험 견으로부터 두 번째 분획인 정액을 채취하였으며, 그 결과, 평균 정액량은 1.5밀리리터였고, 정자 농도는 약 $3.46 \times 10^8/\text{ml}$ 였다.

개 정액 냉각용 조성물 (트리스-난황 버퍼)의 제조

먼저 아래 표 1과 같은 트리스 기저 버퍼(Tris-based Buffer)를 제조하였다.

* 표 1: 트리스 기저 버퍼의 조성

조성

Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane)

TES (N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-aminoethane-sulfonic acid;)

구연산(Citric acid)

포도당(Glucose)

Penicillin/streptomycin

Milli-Q water (초순수물)

이어서, 상기와 같은 조성 및 함량을 갖는 본 연구의 특이적인 트리스 기저 버퍼가 80부피%가 되고 난황(egg-yolk)이 20부피%가 되도록 혼합하여 본 연구의 개 냉각용 조성물을 제조하였다. 즉, 냉각용 조성물 1리터를 기준으로 트리스 기저 버퍼가 800밀리리터가 되고 난황이 200밀리리터가 되도록 혼합하였다.

개 정액의 냉각 보존

채취한 정액과 냉각용 조성물을 동일한 용량비(volume ratio)로 혼합하여, 정액의 농도가 $1.6 \times 10^8/\text{ml}$ 가 되도록 희석하였다. 희석한 정액을 5ml 튜브에 넣고 이를 37°C의 온도를 유지한 물을 채운 50ml 튜브에 담근 후, 얼음이 채워진 아이스박스에 꽂아 이를 4°C의 저온 냉장고에 2시간 동안 저온 보관하였다. 이는 온도의 변화에 약한 정자의 손상을 최소화하기 위함이다. 저온보존 직후부터 10분까지는 급격한 온도의 감소를 보였으나, 이후에는 완만한 온도의 감소를 보였으며, 4°C로 평형을 이루게 되는 시간까지의 평균 냉각 온도는 분당 0.6°C(0.6°C/분)

이었다.

상술한 방법에 따라 저온 냉각 보존된 정액의 정자의 생존율, 전자의 운동성 및 침체의 상태를 냉각 시간 별로 조사하였다. 여기서 얻어진 정자의 생존율, 운동성 및 침체의 온전성(intact) 퍼센트는 정액 채취 직후를 기준으로 해서 나타낸 것이다.

먼저 정자의 생존율의 경우, 냉각 직후 12시간까지는 유의적인 감소를 보이지 않았으나, 12시간 이후부터 2일 이내에는 약 25%의 감소를 보였으며(생존율 약 75%) 냉각 보존 후 9일까지 약 60% 이상의 생존율을 나타내었다. 정자의 운동성의 경우, 생존성과 유사한 결과를 나타내었다. 침체의 상태의 경우 상대적으로 많은 변화를 나타내었다. 보존 2시간에서 약 50%의 침체 온전성을 나타내었으며, 보존 12시간부터 7일까지 약 30% 전후의 침체 온전성을 보였다.

이와 같은 실험 결과로부터 본 연구에 따라 냉각 보존을 할 경우, 적어도 6일까지는 저온 냉각 보존을 하여도 인공수정에 사용할 수 있음을 알 수 있다.

저온 냉각 보존된 정액을 이용한 인공수정

상기와 같은 방법으로 정액을 10일간 냉각 보존 후 12마리의 암캐에게 인공수정을 한 결과 9마리에서 임신이 성공적으로 되었다.

개 정액의 동결용 조성물 (트리스-난황-글리세롤 버퍼)

상술한 표1의 트리스 기저 버퍼 72부피%, 난황 20부피%, 그리고 글리세롤 8 부피%를 혼합하여 동결용 조성물을 제조하였다. 즉, 동결용 조성물 1리터를 기준으로 트리스 기저 버퍼가

720밀리리터가 되고, 난황이 200밀리리터가 되고, 글리세롤이 80밀리리터가 되도록 혼합하였다.

정액의 동결 보존

상기와 같은 동결용 조성물을 상술한 희석된 정액의 냉각 보존과 동일한 방법으로 냉각 보존하였다. 즉, 상기와 같은 조성 및 함량을 갖는 동결용 조성물을 5ml 튜브에 넣고 이를 37℃의 온도를 유지한 물을 채운 50ml 튜브에 담근 후, 얼음이 채워진 아이스박스에 꽂아 이를 4℃의 저온 냉장고에 2시간 동안 저온 보관하였다.

저온 냉각 보존한 $1.6 \times 10^8/ml$ 로 희석된 정액과 저온 냉각 보존된 동결용 조성물을 동일한 용량 비로 섞었다. 그 결과 정액의 농도는 $8 \times 10^7/ml$ 가 된다. 이렇게 재 희석된 정액을 0.25ml 스트로에 채웠다. 액체 질소를 절연박스, 예를 들어 아이스박스에 약 5cm 높이로 채운 후, 상기 재 희석된 정액이 담기 스트로를 질소 표면 상부에서 약 10분 동안 방치하였다(1차 동결 보존). 이는 정자의 손상을 완충하기 위한 것이다. 여기서, 약 -3℃/분 속도로 냉각되었다.

액체 질소 표면으로부터 높이에 따른 정자의 생존성을 측정해 보았다. 액체 질소 표면 위 높이가 6cm, 10cm, 17cm 및 20cm에서 약 10분 동안 방치한 후 37℃에서 융해하여 정자의 생존성을 측정하였다. 생존성 검사 결과, 각각 약 54%, 60%, 70%, 44%로 나타났다.

또한 융해 온도를 약 50℃로 했을 경우에는 각각의 높이에 대해서 생존율이 약 48%, 51%, 60%, 40로 나타났으며, 융해 온도가 너무 높을 경우 생존성이 감소함을 알 수 있었다.

액체 질소 표면 상부에서 약 10분 동안 방치한 이후 액체 질소에 떨어뜨려 동결보존 하였다

(2차 동결 보존).

동결 정액의 용해

상기와 같이 스트로에 담긴 채로 동결 보존된 정액을 먼저, 공기 중에서 약 15-20초 동안 흔든 후 미리 준비된 30 내지 37℃의 항온수조에서 약 10 내지 30초 동안 상기 스트로를 흔들어 동결된 정액을 용해하였다.

이렇게 하여 용해된 정자의 생존율, 운동성 및 침체 온전성을 측정해보았다. 동결 전을 기준으로, 생존율은 약 70%, 운동성은 약 85% 그리고 침체 온전성은 약 70%까지 유지되었다.

❖ 동결 정액을 이용한 인공수정

상기와 같이 용해한 정액을 에펜달프 튜브(ependalp tube)에 담고 여기에 이미 상술한 개 정액 냉각용 조성물인 트리스-난황 버퍼를 채워 총량이 1ml가 되게 균질하게 섞었다. 이를 수정봉에 장착하여 발정적기 암캐 25마리에게 인공수정을 실시한 결과 25마리가 성공적으로 임신이 되었다. 이러한 결과는 자연 종부(種父)에서 얻은 결과와 차이가 없었다.

❖ 연구의 효과

상술한 바와 같이 본 연구는 새로운 개 정자 냉각 및 동결 보존액을 사용하여 개 정자를 냉각 및 동결 보존함으로써, 냉각 및 동결 보존 후에도 정자의 운동성, 생존성 및 침체 온전성 등에 있어서 매우 우수한 결과를 얻을 수 있으며, 따라서 개 인공수정을 현실화할 수 있다.

또한 개 인공수정의 현실화로 인해 우수한 품종의 개를 보존할 수 있다.

본 논문 교정과 일부 결과를 주신 경상대학교 수의과대학 노규진 교수님께 감사드립니다,