

## Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류가 동결·융해정자의 침체 손상에 미치는 영향

유 대 중·공 일 근<sup>†</sup>  
순천대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

### Effect of Sugar Kind Added in Tris-buffer on Acrosome Damage of Post-thaw Spermatozoa in Canine

D. J. Yu and I. K. Kong<sup>†</sup>

Department of Animal Science and Technology, College of Agriculture and Life Science,  
Sunchon National University

#### SUMMARY

The aim of this study was conducted to evaluate the effect of sugar kinds and combination of various sugars on acrosome damage of post-thaw spermatozoa in canine. The extender used in this study was Tris-citric acid extender (Tris-buffer) supplemented with 20% Egg-yolk, 8% glycerol, 1% Equex STM paste, and 70 mM sugars such as monosaccharide (fructose and xylose) and disaccharide(trehalose). To evaluate of sugar combination, the sugars supplemented in Tris-buffer were combined such as control (fructose, xylose, trehalose), two combinations (Fru+Tre, Fru+Xyl, Tre+Xyl) and three combinations (Fru+Tre+Xyl).

The acrosome damage rate of post-thaw spermatozoa in Eosin B & Fast Green stain in Fruc+Tre was higher than those in fructose, trehalose, xylose, Fruc+Xyl, Tre+Xyl, Fruc+Tre+Xyl ( $83.0 \pm 5.6$  vs.  $82.3 \pm 3.1\%$ ,  $81.7 \pm 2.1\%$ ,  $72.0 \pm 2.0\%$ ;  $80.3 \pm 4.5\%$ ,  $76.7 \pm 3.8\%$ ,  $81.0 \pm 5.6$ ). The motility after CASA analysis in Fru+Tre was higher than those in Fru+Tre+Xyl, Tre+Xyl, Fru+Xyl, Xylose, Trehalose, Fructose( $79 \pm 6$  vs  $75 \pm 3$ ,  $74 \pm 8$ ,  $71 \pm 11$ ,  $70 \pm 4$ ,  $66 \pm 15$ ,  $63 \pm 12\%$ ). However, the progressive motility after CASA analysis in Fru+Tre group was higher than those in Fru+Tre+Xyl, Tre+Xyl, Fru+Xyl, Xylose, Trehalose, Fructose ( $67 \pm 7$ ,  $64 \pm 3$ ,  $62 \pm 6$ ,  $61 \pm 8$ ,  $60 \pm 2$ ,  $57 \pm 13$ ,  $53 \pm 10\%$ ).

The results indicated that the acrosome damage & progressive motility of post-thaw spermatozoa in 70 mM Fruc+Tre (two combination) following Eosin B & Fast Green stain and CASA analysis.

(Key words : canine, sperm, frozen, sugar, acrosome damage, motility)

#### 서 론

개에 있어서 동결정액의 사용은 신선정액과 저온보존정액에 비해 동결융해 후 낮은 수정능 획득

및 생존을 등으로 인해 사용이 기피되었으며, 자연 교미를 통한 높은 후대생산성 때문에 성공적인 번식을 할 수 있었으므로 동결정액을 통한 개의 인공수정은 타축종에 비해 연구가 빈약했던 것이 사

본 연구는 농림기술개발과제(현장애로기술개발과제, 2000-2003)의 지원에 의하여 수행되었음.

<sup>†</sup>Correspondence : E-mail: ikong@sunchon.ac.kr

실이었으나, 현대에 와서는 경제적 생활수준의 향상과 개에 대한 애완동물 및 반려동물로서의 관심도의 증가로 인공수정에 대한 필요성이 증가되어 이에 대한 본격적인 연구는 초저온 생물학의 발달과 더불어 1960년대에 이후로 개의 정액에 관한 기초연구와 동결정액의 생산과 동결정액을 이용한 인공수정이 시작되었다(Seager, 1969; Foote, 1964). 동결정액을 통한 인공수정 시 수태율과 산자수에 영향을 미칠 수 있는 주요 요인들은 동결정액 제조시 요구되는 정액의 채취, 희석, 희석액, 평형, 동결보존, 저장, 용해와 수정시 요구되는 수정적기 판단 및 수정기술 등이 있다.

포유류의 경우, 부생식선의 정낭선에서 분비되는 정장 내에는 정자의 체외사출 후 정자의 영양물질인 fructose가 분비되는데, 동결정액 제조시 희석액내에 첨가되는 당 성분은 fructose 및 glucose를 일반적으로 사용하고 있다(Ivanova-Kicheva 등, 1997; Rota 등 1996). 개의 동결정액 제조를 위한 희석액은 Tris-citric acid extender의 기본용액에 20% Egg-yolk, 4% glycerol, 0.5% Equex STM paste 등을 첨가하였으며, 당성분으로는 monosaccharide (fructose 및 xylose) 및 disaccharide (trehalose)로 구분하여 최종 70mM의 농도로 첨가 이용하였다. 희석액에 당의 첨가는 정자의 용해 후 활력도에 유의적인 영향을 미친다고 보고하였다(Aslan 등, 1992; Garcia와 Graham, 1989). 당은 희석액에서 다양한 기능들을 가진다. 당은 정자의 에너지원으로, 삼투압유지 및 동결보호제의 기능을 한다 (Watson, 1979). 희석액에 사용되는 buffer 종류(Abdelhakeam 등, 1991), 당의 분자량(Molinia 등, 1994) 및 저장온도가 당의 동결능력에 영향을 미친다. Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류별(일당류, 이당류, 삼당류) 동결용해 정자 운동의 활력도 및 침체정상을 등을 보고하였다(Yildiz 등, 2000). 그러나 당의 종류별로 70 mM 농도로 조합하여 Tris-buffer에 첨가한 synergistic 효과에 대하여 조사한 결과는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 control (fructose, xylose, trehalose), two combination (Fruc+Tre, Fruc+Xyl, Tre+Xyl) 및 three combination (Fruc+Tre+Xyl)으로 구분하여 Tris-buffer에 첨가하여 개의 동결정액

의 용해 후 정자의 침체 손상을 및 운동성에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

정액채취와 동결정액 제조를 위해 공시되는 개의 경우 경기도 평택시 소재 애견 농장에서 선발된 종견을 순천대학교의 농장에서 물과 사료를 자유급식시키면서 사육하였다. 공시견은 중·대형견 위주의 (알래스카 말라문트 3두, 골든레트리버 3두, 라브라도 레트리버 4두) 총 10두로 생후 18~24개월령의 혈통 관리된 종견이었으며 사육장의 건 방당 1마리씩 단독사육을 원칙으로 사육관리하였다.

### 2. 정액채취 및 관리

정액채취는 18~24개월령의 종견을 월 1~2회씩 수압법을 통하여 실시하였다. 정액 채취시 외부로부터 채취된 정액이 직사광선 손상을 피할 수 있고 채취된 정액이 온도충격을 피할 수 있으며, 종견이 외부로부터 심리적인 자극을 최소화할 수 있는 정액채취실내의 정액 채취대에서 실시하였다. 수압법을 통한 정액 채취 전 선처리 과정의 경우 음경 포피 부위의 털을 가위 등을 이용하여 제거하여 정액 채취시 이 물질의 혼입을 막았으며, 음경포피 부위에 잔존되어 있는 이물질을 70% 에틸알콜에 소독되어진 티슈를 이용하여 제거하였다.

정액채취는 음경을 마사지하여 발기와 돌출을 유도하여 돌출된 음경의 구선부위(Bulbus glandis)를 잡고 압력을 가하면서 무리한 수압으로 인한 혈관의 파열을 피하면서 음경을 발기시켜 종견의 성적 자극을 유도하여 채취하였으며 2차 fraction (sperm-rich fraction)만을 SPECIMEN CUP (녹십자)을 이용하여 사정되는 정액을 채정하였고 정상적인 정액만을 택하여 채취된 정액을 38℃로 보정된 보온병에 옮겨 정자의 온도충격을 피하면서 원심분리기를 이용 400 ×g로 약 5분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 상층액이 제거된 Semen pellet의 10 μl를 1~2 ml의 Sperm washing media에 희석하여 정자의 농도를 검사하였고 나머지 semen

pellet의 경우 미리 준비된 Ext I으로 옮긴 다음 본 연구에 사용하였다.

### 3. 정액 검사

정자의 생존율 및 운동성은 채취된 원심분리 이전 원정액에서 10  $\mu$ 를 분리하여 warm plate를 이용 38 $^{\circ}$ C 상에서 Inverted Microscope를 이용하여 검정한 후 생존율이  $\geq 80\%$  이상인 개체의 정액을 본 실험에 사용하였다. 정자농도의 측정은 원심분리 이후 분리된 Semen pellet중 10  $\mu$ 를 Sperm Washing Media에 100 $\times$  희석하여 Micro Pipette를 이용 충분히 Mix한 이후 Haemocytometer (Marienfeld GERMANY)에 10  $\mu$ 를 적하하여 Inverted Microscope 100x 상에서 정자의 농도를 검정하였다.

### 4. 동결정액 제조를 위한 희석액 제조 및 동결처리

동결정액 제조를 위한 Tris-buffer는 Rota 등 (1997)의 방법에 준하여 제조하였다. 이렇게 제조된 Ext I, II의 최종 pH (6.53, 6.48), 삼투압y(280, 1,370 mOsm/kg)로 조정되었다. 원정액의 정자수(농도), 활력과 생존율 등을 조사하여 동결정액 제조의 가능 여부를 판단하여 동결이 가능한 정액을 Ext I으로 희석하여 5 $^{\circ}$ C cold room에서 2시간 정도 방치하여 5 $^{\circ}$ C까지 냉각시켜 같은 온도의 동량 Ext II를 약 1시간에 걸쳐 희석, 평형을 유도하였다. 평형 후 최종농도가  $50 \times 10^6$  cells/ml 되게 조정후 0.5 ml straw에 충전 봉합하여 액체질소 표면 5 cm 위에서 예비동결을 유도하였다. 예비동결된 straw는 액체질소에 침지하여 동결정액 제조를 완료하였고, goblet에 담아 LN<sub>2</sub> tank에 넣어 보존하였다. 동결정액의 용해는 38 $^{\circ}$ C에서 1분간 실시하고 가온판이 부착된 현미경 하에서 정액의 활력과 생존율을 검사하고 CASA 검사 및 정자의 침체로 정액의 운동성 및 정자두부의 침체손상 정도를 평가하여 인공수정 이용 여부를 판단하였다

### 5. 정자의 침체검사

정자의 침체검사는 Eosin B & Fast green을 기본염색액으로 이용하여 실시하였다. 침체검사는 검사전 가온판에 Slide glass와 기본염색액을 38 $^{\circ}$ C

로 가온시킨 다음 38 $^{\circ}$ C, 1분간 용해한 정액을 Sperm washing media를 이용하여 400  $\times$ g/5분간 2회 실시한 이후 원심분리 이후 얻어진 Semen pellet 10  $\mu$ 와 가온된 기본염색액을 1:2의 비율로 Mix한 이후 38 $^{\circ}$ C 조건에서 5분간 정치시킨 이후 미리 가온된 슬라이드에 Mix sol.을 10  $\mu$ 를 도말하여 가온판에서 건조시킨 후 Inverted microscope를 이용 1,000 $\times$ 에서 염색된 정자의 100개를 3반 복하여 검정하였으며 정상 침체의 정자를 백분율로 표기하였다.

### 6. 동결정액의 CASA 검사

동결용해 후 현미경을 통한 육안검사보다는 정확하고 객관적인 평가가 가능한 CASA (Computer-assisted semen analysis : Hamilton)를 이용한 정액의 운동성을 조사하였다(농협 유우개량사업소). 검사정액의 경우 10  $\mu$ 를 microcell slide에 넣고 검사를 시행하였으며, 조사항목은 MOT(운동정자 비율, %), PROG(전진운동정자비율, %), VAP(정자의 초당 평균이동속도,  $\mu$ m/sec), VCL(정자의 초당 평균곡선이동속도,  $\mu$ m/sec), VSL(정자의 초당 평균직선이동속도,  $\mu$ m/sec), ALH(측두거리,  $\mu$ m) 등으로 정액의 운동성을 종합적으로 조사 평가하였다.

### 7. 통계처리

이상의 연구에서 얻어진 결과는 SAS Duncan package(1999)에 의하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류에 따른 침체의 손상 정도

당의 종류에 따른 정자의 침체손상 정도는 Table 1에서와 같다. 정상 정자비율은 Fru+Tre, Fructose, Trehalose, Fru+Tre+Xyl, 구가 Fru+Xyl, Tre+Xyl, Xylose보다 유의적으로 높았다( $83.0 \pm 5.6$ ,  $82.3 \pm 3.1$ ,  $81.7 \pm 2.1$ ,  $81.0 \pm 5.6$ , vs  $80.3 \pm 4.5$ ,  $76.7 \pm 3.8$ ,  $72.0 \pm 2.0$ ). Yildiz 등(2000)은 정자의 운동성, 활력도 및 정상침체율은 32 $^{\circ}$ C에서 20~30분간 평형 후 모든 처리구에서 유의적으로 감소하였다.

Table 1. Effect of sugar kind in Tris-buffer on post-thaw acrosome damage rate of post-thaw spermatozoa

Kind of sugar / Type of sperm	Fructose	Trehalose	Xylose	Fru+Tre	Fru+Xyl	Tre+Xyl	Fru+Tre+Xyl
Normal sperms	82.3±3.1 <sup>ab</sup>	81.7±2.1 <sup>ab</sup>	72.0±2.0 <sup>c</sup>	83.0±5.6 <sup>a</sup>	80.3±4.5 <sup>ab</sup>	76.7±3.8 <sup>b</sup>	81.0±5.6 <sup>ab</sup>
Abnormal sperms	17.7	18.3	28.0	17.0	19.7	20.0	19.0

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

그러나 손상된 첨체정자의 비율은 galactose, lactose, trehalose, maltose 및 sucrose를 첨가한 희석액에서 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. Woelder 등(1997)은 당은 급속냉각 시 정자세포에서 일어날 수 있는 손상에 대하여 보호기능을 가지고 있고 또한 sucrose는 소 정자의 경우 trehalose보다 더욱더 보호기능이 있다고 하였다. Molinia 등(1994)은 1당류가 Tris-buffer에서 동결된 면양정자의 운동성을 보존하는데 2당류보다 더욱더 안정성이 있다고 보고하였다. Garcia와 Graham(1989)은 3당류는 소 정자의 용해 후 운동성의 보존에 1당류 또는 2당류만큼 효과적이지 못하다고 하였다. Yildiz 등(2000)은 glucose, lactose alc. raffinose를 제외한 거의 모든 당은 acrosome 손상을 감소시킨다고 보고하였다. 특히 2당류인 trehalose, sucrose 및 maltose는 용해 후 운동성을 촉진시키는 것 없이 첨체손상과 사멸정자율을 감소시키며, 반면 galctose, glucose를 제외한 1당류는 정상 첨체율 및 활력도뿐만 아니라 운동성까지 개선시켰다고 보고하였다.

Eosin B & Fast Green 염색 후 당의 종류에 따른 정자의 정상 정자비율은 Fru+Tre구가 Fructose, Trehalose, Fru+Tre+Xyl, Fru+Xyl, Tre+Xyl, Xylose보다 유의적으로 높았다(83.0±5.6, 82.3±3.1, 81.7±2.1, 81.0±5.6, 80.3±4.5, 76.7±3.8, 72.0±2.0). 특히 전진운동율과 정자의 첨체의 이상비율은 수정율과 유의성이 매우 높은 관계로서 전진운동율과 정상정자의 첨체비율이 가장 높은 Fru+Tre 처리구가 가장 효과적인 것으로 판단되었다. 1당류인 fructose와 2당류인 trehalose의 혼합처리구가 타처리구보다 정자의 정상첨체율과 전진운동율이 높은 것은 2당류인 trehalose가 첨체손상과 사멸

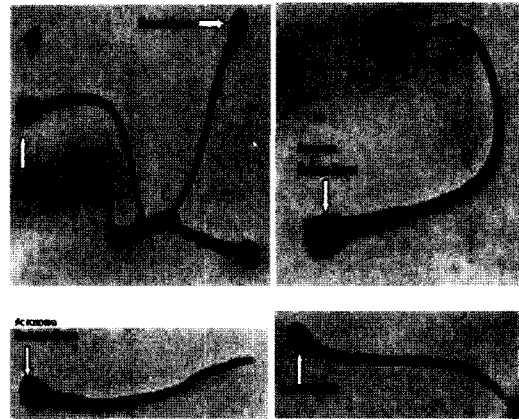


Fig. 1. Canine sperm stain for acrosome damage with Eosin B & Fast Green stain under a inverted microscope(1,000x).

정자율의 개선에, 1당류인 fructose가 정상첨체율, 활력도 및 운동성까지 synergistic effect를 거두었다고 판단된다. 본 결과에서 1당류 또는 2당류 등의 단독첨가보다는 이들의 적절한 조합에 의한 첨가가 동결용해 정자의 첨체손상을 줄여주고 운동성을 높여주는 효과를 얻을 수 있는 것으로 판단된다.

## 2. Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류에 따른 동결, 용해정자의 활력도

CASA로 평가한 자료는 Table 2에서와 같다. 운동성은 Fru+Tre, Fru+Tre+Xyl, Tre+Xyl, Fru+Xyl, Xylose, Trehalose, Fructose구보다 유의적으로 높았다(79±6, 75±3, 74±8, 71±11, vs 70±4, 66±15, 63±12%; P<0.05). 또한 수정율과 유의성이 높은 전진운동율에 있어서도 Fru+Tre, Fru+Tre+Xyl, Tre+Xyl, Fru+Xyl구가 Xylose, Trehalose,

Table 2. Effect of sugar kind in Tris-buffer on post-thaw motility analyzed in canine

Kind of sugar	MOT (%)	PROG (%)	VAP (mic/s)	VCL (mic/s)	VSL (mic/s)	LIN (%)	STR (%)	ALH (mic.)
Fructose	63±12 <sup>b</sup>	53±10 <sup>b</sup>	64± 2	75± 3	58± 1	73±2	87±1	3.9±0.2
Trehalose	66±15 <sup>b</sup>	57±13 <sup>b</sup>	62± 9	73±10	57± 8	76±2	89±2	3.6±0.5
Xylose	70± 4 <sup>b</sup>	60± 2 <sup>b</sup>	64± 2	77± 2	58± 2	72±2	87±1	4.0±0.1
Fru+Tre	79± 6 <sup>a</sup>	67± 7 <sup>a</sup>	69±14	82±17	62±12	72±2	86±1	4.3±0.8
Fru+Xyl	71±11 <sup>b</sup>	61± 8 <sup>b</sup>	66± 6	79± 7	60± 5	72±1	87±2	4.1±0.2
Tre+Xyl	74± 8 <sup>b</sup>	62± 6 <sup>b</sup>	67± 4	80± 4	61± 4	73±2	86±1	4.2±0.3
Fru+Tre+Xyl	75± 3 <sup>ab</sup>	64± 3 <sup>b</sup>	69± 9	83±10	62± 8	73±2	87±1	4.2±0.3

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

Fructose구보다 유의적으로 높았다(67±7, 64±3, 62±6, 61±8, vs 60±2, 57±13, 53±10%; P<0.05).

1당류와 2당류를 혼합 첨가함으로써 훨씬 높은 운동성과 정상정자 침체율을 얻을 수 있음으로써, 1당류와 2당류 사이의 기능적 차이가 당의 종류에 따라 개 정자의 보호기능의 형태와 위치 등이 다른 것으로 판단된다. 즉, 1당류가 할 수 있는 기능과 2당류가 할 수 있는 기능이 다르다면 이들을 적절한 비율로 혼합하여 첨가하는 것은 궁극적으로 동결융해 정자의 운동성, 활력도뿐만 아니라 정상 침체율을 향상시켜 이들 정자를 이용할 경우 수정에 성공할 가능성을 크게 높일 수 있을 것으로 판단된다.

### 적 요

본 연구는 개의 동결정액제조 시 동결보호 희석액 내에 첨가되는 당의 종류와 조합이 동결융해 후 정자 두부의 침체의 손상과 생존을 및 운동성 등에 미치는 영향에 대하여 조사하고자 실시하였다.

당의 종류에 따른 정자의 침체손상 정도는 정상 정자비율은 Fru+Tre, 처리구가 Fructose, Trehalose, Fru+Tre+Xyl, Fru+Xyl, Tre+Xyl, Xylose구에 비해 가장 높았다(83.0±5.6%, 82.3±3.1%, 81.7±2.1%,

81.0±5.6%, 80.3±4.5%, 76.7±3.8%, 72.0±2.0%; P<0.05).

Fru+Tre처리구에서 CASA 분석 후 운동성이 Fru+Tre+Xyl, Tre+Xyl, Fru+Xyl, Xylose, Trehalose, Fructose구에 비해 가장 높았다.(79±6 vs 75±3, 74±8, 71±11, 70±4, 66±15, 63±12%; P<0.05). 전진운동율은 Fru+Tre 처리구가 Fru+Tre+Xyl, Tre Xyl, Fru+Xyl, Xylose, Trehalose, Fructose구에 비해 가장 높았다(67±7, 64±3, 62±6, 61±8, 60±2, 57±13, 53±10%; P<0.05).

본 연구결과 70 mM Fru+Tre (two combination) 가 침체 손상정도가 낮았으며 가장 높은 운동성 및 전진 운동율의 결과를 얻을 수 있었다.

### 참고문헌

- Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA and Chaloner KM. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effect of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology*, 28:43-49.
- Aslam M, Ahmad KM, Ahmad M and Gill SA. 1992. Additive effects of carbohydrates in tris as bull semen extenders equilibrated for three

- or five hours. Pakistan Vet. J. 12:174-177.
- Foote RH. 1964. Extenders for freezing dog semen. Am. J. Vet. Res., 25:37-39.
- Garcia MA and Graham EF. 1989. Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effects of sugars and sugar alcohols on post thaw motility. Theriogenology, 31:1029-1037.
- Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N and Somlev B. 1997. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminum tubes using three extenders. Theriogenology, 48:1343-1349.
- Molinia FC, Evans G and Maxwell WMC. 1994. *In vitro* development of zwitterions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. Reprod. Nutr. Dev., 34:491-500.
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C and Rodriguez-Martinez H. 1997. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38 °C. Theriogenology, 47:1093-1101.
- Seager SWJ, Platz CC and Fletcher WS. 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. J. Reprod. Fertil., 45:189-192.
- Seager SWJ. 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. AI Digest., 17:6-7.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M and Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology, 54:579-585.
- Watson PF. 1979. The preservation of semen in mammals. In: Finn CA (ed), Oxford Reviews of Reproduction Biology. Oxford; Oxford University Press, p. 283-351.
- Woelders H, Matthijs A and Engel B. Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. Cryobiology, 35:93-105.

---

(접수일: 2003. 6. 2/ 채택일: 2003. 8. 20)