

진도개 정액의 연령별 성상 및 동결성에 관한 연구

최선호^{1,†} · 김성재¹ · 조상래¹ · 최창용¹ · 손준규¹ · 김종석² · 오석일² · 박병진² · 김상현²

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²진도개사업소

Studies on Characteristics and Freezing Tolerance of Spermatozoa in Jindo Dog

Sun-Ho Choi^{1,†}, Sung-Jae Kim¹, Sang-Rae Cho¹, Chang-Yong Choe¹, Jun-Kyu Son¹, Jong-Suk Kim², Suk-Il Oh², Byung-Jin Park² and Sang-Hyun Kim²

¹National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, ²Korean Jindo Dog Center, Jindo 539-803, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the characteristics within ages and freezing tolerance of spermatozoa in Jindo Dog. Experimental animals were selected 12 herds within 1~8 year's old and collected semen for 2 times in a week. Collected semen was evaluated whole volume and sperm number with CASA system (SIAS, Medical Supply, Korea). Then seminal plasma were separated and diluted with modified Tris-egg yolk extender and added 4, 6 and 8% glycerol for 4 times to final concentration and equilibrated for 1.5 hrs. Before and after freezing, equilibrated semen were evaluated the survival rates. Total volume of sperm at 1~2 year old group is as 5.2×10^8 cells/ml largest and there were no significance among groups. The motility of 1~2 year old group is highest as 90.9% and there were significance among groups. Abnormal sperm showed similar among groups. The survival rate in terms of pre-freezing and post-freezing were decreased all levels of glycerol and revealed 87.0% to 64.5% in 4%, 87.5% to 51.9% in 6% and 73.4% to 29.7% in 8%, there were significant difference among the groups ($p < 0.05$). These results suggest that the optimal sperm-freezing methods in Jindo Dog are utilized with modified Tris egg-yolk extender with 4% glycerol and were improve the reproductive activity by these methods.

(Key words : Jindo Dog, Spermatozoa, Age, Freezing, Glycerol)

서 론

진도개는 천연기념물 제53호로 삼살개 등과 같이 토종견으로 알려져 있고, 종류도 다양하여 한국재래동물로써 연구해야 할 필요성이 다양하며, 예로부터 우리 민족에게 많은 이로움과 우수한 반려동물로써 인정받아온 중요한 유전자원이라고 할 수 있다. 진도개에 대한 연구는 여러 연구자들에 의해 실시되어 왔으나(박 등, 1997; 유 등, 2002; 김 등, 2002), 아직도 많은 부분이 집중 연구되어야 한다. 진도개의 다양성의 확보 및 외모 다양성 개발 등 토종견으로써 갖추어야 할 것이 산재해 있다고 할 수 있으며, 이를 활성화시키기 위해서는 번식기술이 접목되어야 할 것이다. 개의 생식세포인 정자나 난자는 생리적으로 *in vitro*에서의 내성이 약한 편으로 체외배양이나 동결보존 등에 관한 연구가 많이 시도되었으나, 낮은 생존율에 의해 수태율 저하 등의 원인이 되었다.

이를 극복하기 위하여 희석액이 개발되어 왔으나, 적절한 pH, 완충 능력, 적절한 삼투압 등에 의해 좌우되었으

며(Salamon과 Maxwell, 2000), 대부분 Tris buffer(Fischer와 Fairfull, 1987)를 기본으로 난황을 첨가한 희석액(Farstad, 2009; Rota 등, 1995; 2001)을 사용하였으며, 희석제의 종류(Abdelhakeam 등, 1991; Iguer-ourada와 Vestegen, 2001; Nizanski 등, 2001)와 첨가 물질에 따라 다양하게 개발되었다.

동결보존을 위해서도 개정자의 경우, 적절한 동해방지제의 선택과 농도에 의해 동해를 줄일 수 있다고 하였으며(Hammerstedt 등, 1990), 대부분의 포유동물 정자를 위해 glycerol이 가장 많이 이용되며, DMSO도 단독으로 혹은 혼합하여 사용되기도 한다(Holt, 2000). Glycerol의 농도로는 희석액에 따라 다르나 대개 4~11% 사이로 조정하여 이용되고 있으며(England, 1993), 동결 속도(Dobriniski 등, 1993) 등에 의해서도 많은 차이를 보이는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구는 한국재래견인 진도개의 정액의 성상과 glycerol 농도를 통한 정자의 생존율을 조사하여 재래견의 유전자원보존 체계를 확립하기 위해 실시하였다.

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

재료 및 방법

공시동물

본 연구에 사용된 공시동물은 진도개사업소(전남 진도군 소재)에서 사육 중인 1~8세의 수컷 성견 12두를 사용하였고, 자연교미를 한 적은 있으나, 인공적으로 정액채취의 경험이 전혀 없는 것을 이용하였다. 이들의 체중은 16~20 kg이었고, 각각 단독의 사육장에서 충분한 운동, 1회의 사료(대한사료) 급여와 무제한 물을 급여하여 사육하였다.

정액채취

정액 채취는 2주 1회의 간격으로 수압법을 이용하여 실시하였고, 발정 암컷을 주변에 두어 수컷이 리비도(libido)가 발생되도록 유도하였다. 청결한 채취를 위해 생식기 주위를 청결히 하고, 음경을 마사지하여 발기를 유도시킨 후 팽대부 밖으로 포피를 밀어내어 발기가 원활히 되도록 하였으며, 발기된 음경과 팽대부를 압박하며 사정을 유도하였다. 이 때 음경 포피가 건조하여 출혈이 발생되지 않도록 젤을 도포하였다. 사정된 정액은 총량의 조사를 위해 전 정액을 채취하였고, 총 정액량과 총 정자수 등의 일반적인 성상을 검사하였다.

정액검사

채취된 정액은 원심관으로 총 정액량을 환산하고, 정액을 1,500 rpm으로 20분간 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 액체질소통에 보관하기 전에 생존율을 검사하였다.

정액의 동결 및 융해

정액의 동결은 정장액과 농후부를 분리하고, 농후부를 37°C 난황트리스액(modified Tris-egg yolk buffer, Table 1)과 1:1로 희석하여, 정자가 안정화되도록 하였다. 희석된 정액은 동결보호제 및 예비동결 시간을 고려하여 6개 구로 나누어 4°C까지 냉각하였다. 동결보호제인 glycerol을 4, 6 및 8%로 구분하였다. 1:1로 희석된 정액이 4°C로 냉각된 후 glycerol 최종 농도의 1/8, 1/4, 1/2 그리고 최종 농도가 되도록 glycerol을 첨가하였고, 첨가는 각 15분 간격으로 하였으며, 최종 농도로 1시간 동안 평형을 실시하였다. 예비동결 시간은 액체질소 위 5 cm 5분, 5 cm 10분을 실시한 후 액체질소에 침지하여 동결을 하였다. Glycerol 평형은 4°C에서 30분, 1시간, 2시간 동안 실시하여 최종 농도에 도달하도록 하였고, 평형이 된 정자는 20~40×10⁶ cells/ml로 조정하여 스트로에 봉입하였고, 스트로 선단부는 sealing gel을 이용하여 봉합하였다. 동결된 정액은 동결 후 생존율 검사를 위해 액체질소에서 꺼내 공기중에서 10초간 예비융해를 하였고, 37°C 온수에서 20초간 융해한 후 생존율 검사를 하였다.

통계처리

Table 1. Composition of modified extender for dilution and freezing

Ingredient	Components (g)
Tris	2.4
Catalase	0.02
Citric acid	1.4
Streptomycin sulfate	0.1
Na-benzyl penicillin	0.06
Fresh egg yolk	20 %(v/v)
DW	100 ml

본 연구에서 연령별 정자의 활력과 glycerol 농도와 액체질소 위에서 한 예비동결시간에 의한 생존율 실험을 4회 실시하였으며, 실험 결과는 통계 프로그램인 STATVIEW를 이용한 ANOVA test로 분석하여 유의성을 검정하였다.

결 과

정액검사

채취한 진도개의 정액은 정액 동결시험에 사용할 수 있는지를 검사하기 위해 총 정액량, 총 정자수, 정자의 활력 등을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 채취된 정액은 정액 총량, 총 정자수, 정장량을 조사하고, 정장 분리 후 Table 1의 희석액으로 1:1로 희석하여 정자의 활력은 CASA 시스템으로 기형 정자는 현미경으로 관찰 조사하였다.

연령별 정액의 총량은 10.9~12.9 ml로 차이를 보이지는 않았으나, 총 정자수는 1~2세가 5.2×10⁸개로 가장 많았고, 3~6세가 1.1×10⁸로 가장 적었으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 정장의 양도 총 정액량과 마찬가지로 연령별로 9.1~11.8 ml로 커다란 차이를 보이지는 않았다. 정자의 활력은 1~2세가 90.9%로 가장 높았고, 3~6세가 73.0%로 가장 낮았으며, 연령별로 유의차를 보였으나(p<0.05), 개체간의 차이가 커서 나타난 것이었다. 기형 정자 출현율은 6.0~6.8%로써 비슷한 경향을 나타내었다.

Glycerol 농도에 의한 동결 전후의 생존율

정자의 농후부를 분리하여 희석액으로 1:1로 희석한 후 glycerol을 4, 6 그리고 8%를 4단계로 나누어 1시간 평형을 실시하였고, 동결 전과 후의 생존율을 조사한 것은 Table 2와 같다.

동결 전 4%로 평형된 것은 87.0%의 생존율을 보이다가 64.5%로 생존율이 낮아졌고, 6%의 경우는 87.5%이었던 것이 51.9%로 생존율이 낮아졌다. 8%의 경우는 동결 전 73.4%이던 것이 29.7%로 급격히 떨어지는 것으로 나타났다. Glycerol 농도에 따른 동결 전과 동결 후의 생존율은 유의적인 차이를 보였으며(p<0.05), 특히 동결 후의 생존율 중 8%의 경우는 급격히 떨어지는 것으로 나타났다.

Table 2. Characteristics of fresh semen within ages in Jindo Dog

Age	Total volume (ml)	Total sperm number (cells/ml)	Vol. of seminal plasma (ml)	Motility (%)	Abnormal sperm (%)
1~2	10.9± 8.8	5.2×10 ⁸ ±7.4×10 ⁸	10.1± 8.3	90.9± 5.2 ^a	6.4±1.0
3~6	10.3± 7.6	1.1×10 ⁸ ±1.0×10 ⁸	9.1± 6.8	73.0±40.9 ^b	6.8±1.0
7 <	12.9±15.4	2.0×10 ⁸ ±1.3×10 ⁸	11.8±14.0	81.0±12.4 ^a	6.0±1.0

* The different superscript means significant difference in the same column ($p<0.05$).

Table 3. Survival rate of pre- and post-frozen sperm of Jindo dog on glycerol concentration in modified Tris-egg yolk diluent

Diluent	Glycerol con. (%)	Survival rate (%)	
		Pre-frozen	Post-frozen
Tris-egg yolk	4	87.0± 5.3 ^a	64.5±15.8 ^a
	6	87.5± 4.3 ^a	51.9±27.6 ^b
	8	73.4±16.1 ^b	29.7±24.8 ^c

* The different superscript means significant difference in the same column ($p<0.05$).

고찰

희석액은 Tris를 기본 완충액으로 사용하였고, 신선 계란의 난황을 분리하여 20% 첨가하였으며, 이는 Farstad (2009)가 보고한 바와 같이 세포벽을 동해로 부터 방지하게 되며, 세포벽의 인지질의 손실을 보충하거나 혹은 방지하는 것으로 알려져 있다. 그러나 난황은 복합물로서 정확한 생물학적 성상에 대해서는 명확하지 않아 유해성에 대해서는 알 수가 없는 상황이다. 그러므로 난황 대체 물질에 대하여 거론되기도 하고 있다. 특히 식물성 lecithin은 난황의 대체물질로서 활용을 위한 연구가 수행되고 있으며, 난황이 가지고 있는 항산화 물질은 활성산소로부터 정자의 충격을 완화시켜주는 것으로 보고되고 있어 난황을 이용한 정자 실험이 상당기간 진행될 것이다.

개 정액의 보존을 위해 glycerol의 이용은 희석액의 종류에 따라 달리 농정자의 농후부를 분리하여 희석액으로 1:1로 희석한 후 glycerol을 4, 6 그리고 8%로 평형한 후 Pena 등(1998)은 2~8% glycerol에서 2시간 평형 시 5.3~21.8%의 운동성을 보여 본 연구 결과의 동결전 생존율보다 아주 낮은 결과를 나타냈으며, 동결-용해한 결과 4%에서 동결-용해 후 생존율이 가장 높게 나타났다. 이는 이 등(2003)의 결과와 동일하였으나, Pena 등(1998)은 8%에서 가장 높은 57.0%를 나타내어 본 연구의 결과와는 상반된 결과를 보였다. 이러한 결과는 결정적으로 각 동물종의 생리적 차이에 의한다고 한 것과 일치(Watson 1979)하는 것으로써 아직까지 희석액과 glycerol 농도와 복잡한 상호 작용에 의해 개의 동결보존에 있어서 논란이 되고 있다. 동해방지제는 대체로 상온에서는 독성을 지니고 있어 낮은 농도의 항동해제의 사용이 절실하며, 본 연

구의 결과와 같이 4%가 동결 전이나 후에도 가장 높은 생존율을 나타내어 고무적인 현상이라고 할 수 있다. 또한, 희석액의 경우도 최대한 제조 당일 산란된 계란을 사용하였고, 난황의 농후부가 첨가되지 않도록 원심을 2,000 rpm으로 30분 이상 처리한 결과, 희석액의 질이 더 좋아졌을 것으로 추측된다. 그밖에 난황에는 영양물질, 단백질, 비타민, 인지질, 당 등 복합물이 함유되어 있어 equex STM, skim milk 등 비침투성 동해 방지 물질에 대한 연구도 더 활발히 이루어져야 할 것이다.

인용문헌

1. Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA, Chaloner KM(1991): Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen : Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, types of sugars and the method of dilution. *Cryobiology* 28:43-49.
2. Dobrinski I, Lulai C, Barch AD, Post K (1993): Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil Suppl* 47:291-296.
3. England GCW (1993): Cryopreservation of dog semen : a review. *J Reprod Fertil Suppl* 47:243-255.
4. Farstad W (2009): Cryopreservation of canine semen-new challenges. *Reprod Dmest Anim Suppl* 2:336-341.
5. Fischer PS, Fairfull RW (1986): The effects of rapid cooling, cold shock of ram semen, photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 63:1995-2005.
6. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Andro* 11:73-88.
7. Holt WV (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62:3-22.
8. Iguer-ouada M, Versteegen JP (2001): Long term preservation of chilled canine semen : effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55(2):671-684.
9. Nizanski W, Dubiel A, Bielas W, Dejheka GJ (2001): Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the utility of dog semen after th-

- awing. *J Reprod Fert suppl* 57:365-369.
10. Pena AI, Barrio F, Quintela LA, Herradon PG (1998): Effects of different glycerol treatment on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosome integrity. *Theriogenology* 50:163-174.
 12. Rota A, Storm B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (1995): Effect of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44:885-900.
 13. Rota A, Frishing A, Vannozzi I, Camilo F, Romagnoli S (2001): Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fert Suppl* 57:377-381.
 14. Salamon S, Maxwell WM (2000): Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62:77-111.
 13. Watson PF (1979): The preservation of semen in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 1:283-350.
 15. 김홍률, 이계웅, 공일근 (2002): 진도개 동결정액제조를 위한 정액성상과 동결정액의 운동성에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 26(3):253-261.
 16. 박병권, 박창식, 이성호, 박영석 (1997): 한국 진도견 정액의 성상 및 보존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 21:405-409.
 17. 유대중, 정수룡, 오인석, 김홍률, 이계웅, 조성균, 배인휴, 양철주, 공일근(2002): Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류가 동결·융해정자의 운동성에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 17(2):137-143.
 18. 유대중, 공일근 (2003): Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류가 동결·융해정자의 침체 손상에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 18(2):91-96.
 19. 이제협, 박향, 박흠대, 김재명 (2003): 개 정자의 동결 보존에 있어서 Glycerol 농도, 동결 및 융해 속도가 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 18(3):195-201.
- (접수일자: 2010. 9. 15 / 채택일자: 2010. 9. 20)