

## N-Methylacetamide 동결보호제가 오계 동결정액의 생존성, 수정 및 부화율에 미치는 영향

최진석<sup>1</sup> · 김성우<sup>1</sup> · 신단비<sup>1</sup> · 고응규<sup>1</sup> · 도윤정<sup>1</sup> · 김동훈<sup>1</sup> · 공일근<sup>2</sup> · 박수봉<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, <sup>2</sup>경상대학교 농업생명과학대학 축산학과

### Effects of N-Methylacetamide on the Viability, Fertility and Hatchability of Cryopreserved Ogye (Korean Native Black Fowl) Semen

Jin Seok Choi<sup>1</sup>, Sung Woo Kim<sup>1</sup>, Dan-Bi Shin<sup>1</sup>, Yeoung-Gyu Ko<sup>1</sup>, Yoon-Jung Do<sup>1</sup>, Dong-Hun Kim<sup>1</sup>, Il-Keun Kong<sup>2</sup> and Soo-Bong Park<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Institute of Agriculture and Life Science, Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

**ABSTRACT** The use of methylacetamide (MA) as a cryoprotective agent for freezing Korean Native Black rooster Ogye semen was examined with artificial insemination. The diluted Ogye semen with HS-1 was subjected for 2 step dilution method of cryopreservation in which the final concentration of MA was adjusted to 7.5%. The sperm viability after thawing was reduced from  $95.17 \pm 0.93\%$  to  $55.93 \pm 1.38\%$  which was confirmed by live-death analysis based on Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). The rates of fertilized eggs with fresh or frozen-thawed semen were reduced from  $94.98 \pm 3.93\%$  to  $66.36 \pm 8.43\%$  at day 7 with significant difference. However, the hatching rates of experiments at day 21 did not shown difference between  $92.64 \pm 2.33\%$  and  $90.45 \pm 8.05\%$  ( $P < 0.05$ ). With these results, the utilization of MA for freezing of Ogye spermatozoa could affect on viability of frozen-thawed semen but not on the fertility of lain eggs and hatchability of fertilized eggs and also provide possible tools of freezing for poultry genetic resource conservation.

(Key words : Ogye, cryoprotective agent, n-methylacetamide, semen)

## 서 론

가축의 유전적 다양성 보존은 지속 가능한 축산업 발전을 위하여 육종 소재 개발 및 발굴을 위해 반드시 필요한 요소이다. 축산업의 기반이 되는 품종 육성과 개량에는 육종 소재로서 다양한 품종과 특색있는 개체를 보유하는 것이 전제되어야 한다. 그러나 가금 산업의 발전은 단일 품종의 대량 사육을 요구함으로써 닭 유전자원의 다양성을 극단적으로 좁히고 있으며, 가금 육종 기술 또한 집단 내 유전적 다양성을 감소시키는 방향으로 작용하고 있다. 현재 널리 이용되고 있는 품종과 집단 내 유전적 다양성의 감소는 기후 변화, 다양한 악성 질병 발생, 소비자의 기호 변화 등 여러 가지 변화요인을 고려할 때, 장기적으로 양계 산업의 지속적 발전을 위협할 가능성이 높아지고 있다.

가축 유전자원을 성공적으로 보존하는 기술로서 생식세포 동결보존은 생체보존을 대체할 수 있으며, 동물유전자원을 보다 경제적으로 보존할 뿐만 아니라 증식효율을 조절할 수 있어 유전집단의 관리에도 효과적으로 활용되고 있다. 현재 국내에서는 소의 정액 동결보존기술만이 산업적으로 실용화되어 널리 이용되고 있으나, 가금 정액의 동결보존 기술에 대한 연구는 미진하여 실험실 수준에 머무르고 있다. 특히 오계의 경우, 유전자원으로 보존할 가치가 높으나, 생축으로만 보존 및 유지되고 있어 악성 질병에 취약할 가능성이 높다고 추정된다.

Polge et al. (1949)은 glycerol이 닭 정액의 정자 운동성을 저온에서 유지시켜준다는 현상을 최초로 보고하였으며, 동결보호제로서 glycerol의 기능에 관한 연구를 개시하였다. 그 후 많은 연구자에 의하여 닭 정액 희석액에 glycerol은 2%

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed : psb292@rda.go.kr

이상 첨가될 경우 정자의 수정 능력을 저해한다(Allen and Bohr, 1955; Nevill et al., 1971; Sexton et al., 1973)라고 보고되었다. 또한 Lake et al. (1981)은 인공수정 시 glycerol 농도를 1.501% 이하로 유지하여야 함을 보고하였으며, Hammerstedt and Graham (1992)은 glycerol을 제거해 주어야 하는 타당성을 보고하고 있다. 따라서 동결보호제로 glycerol을 첨가하였을 경우, 동결 용해 후 희석, 밀도 구배 및 원심분리에 의해 제거를 해야 하며, 희석충격을 막기 위해 단계적으로 희석을 해야 하는데, 이러한 과정은 동결정액의 품질을 저하시키는 요인으로 작용하여 실용화를 방해하는 큰 요인이 되고 있다. 이러한 glycerol의 수정능력 억제효과 때문에 많은 연구자들은 동결보호제로서 dimethylsulfoxide(DMSO)를 이용하기도 하였으며(Sexton et al., 1980; Van Voorst and Leenstra, 1995a,b), dimethylacetamide (DMA)와 dimethylformamide (DMF)를 이용하여 닭의 정자를 동결 보존하였다(Lake and Ravie, 1984; Tselutin et al., 1999 Tereshchenko et al., 1992). 특히 최근 일본의 연구팀인 Hanzawa et al. (2010)은 N-methylacetamide (MA)의 이용성을 보고하였다.

본 연구는 동결보호제로 사용되는 MA를 이용하여 재래 가금인 오계정액의 생존성, 수정 및 부화율에 미치는 영향을 검토하였으며, 재래 닭 품종의 정자 동결보존 방법의 기초를 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시축

국립축산과학원 가축유전자원 시험장에서 보존 중인 오계(62주령) 수탉 10수를 정액 채취용으로 사용하였으며, 인공수정용 암탉은 동일 주령의 White Leghorn 40수를 공시하였다.

### 2. 정액 채취 및 제조

정액 채취는 마사지 정액채취법(Burrows and Quinn, 1935, 1937)의 변형인 횡취법(side collection)으로 주 2회 눈금이 있는 15 mL 튜브(Becton Dickinson, USA)에 혼합 채취하였다. 채취된 정액은 5°C 보온병에 담아 10분 이내로 실험실로 운반하였다. 운반된 정액은 5°C하에서 동결보호제가 첨가되지 않은 HS-1 희석액으로 1:1 비율로 희석 후 30분간 평형시간을 가진 후, 1차 희석정액에 동일 비율로 15% MA를 첨가한 희석액에 1:1 비율로 희석하여 동결보호제 MA의 최종 농도를 7.5%로 맞추었다. 본 연구에 이용된 닭 정액 희석액인 HS-1의 조성은 Table 1에 표현하였으며, 포장용기로는 0.5 mL

**Table 1.** Composition of HS-1 diluent used for cryopreservation of Ogye rooster semen

| Ingredients                     | Amount (g)      |
|---------------------------------|-----------------|
| L-Glutamic acid monosodium salt | 1.2             |
| Potassium acetate               | 0.3             |
| D(+) Glucose                    | 0.2             |
| D(+) Trehalose                  | 3.8             |
| BES                             | 0.5             |
| Bis-Tris                        | 0.5             |
| Distilled water                 | Up to 100 mL    |
| pH                              | 6.8             |
| Osmotic pressure                | 350~360 mOsm/kg |

straws(FHK, Japan)를 사용하였고, 동결 방법으로 액체질소 상면 4 cm에서 30분간 동결 후 -196°C에 침지하였다(Hanzawa, 2010).

### 3. 정액생존율의 평가

희석 정액과 5°C 조정된 저온 수조에서 2분간 용해시킨 동결정액의 생존율은 SYBR-14와 Propidium iodide(PI)(Live/Dead sperm viability Kit, Invitrogen, USA)의 이중 형광 프로브를 이용하여 HS-1 희석액에 최종 농도  $90 \times 10^6$ /mL로 희석된 희석액 400  $\mu$ L 정액에 DMSO를 이용하여 20  $\mu$ M 농도로 희석된 SYBR-14 5  $\mu$ L를 첨가하여 실온에서 5분간 배양하고 2.4 mM 농도의 PI 5  $\mu$ L를 다시 첨가하여 5분간 배양한 후에 유세포분석기(BD FACS Aria, USA)를 이용하여 생존율을 분석하였다(Christensen, 2004; Donoghue, 1996; Garner, 1995).

### 4. 인공수정, 집란 및 부화

인공수정은 희석정액의 경우, 동결보호제가 포함된 HS-1 희석액에 4배 희석 후(MA 최종 농도 7.5%), 동결정액의 경우 5°C 저온수조에서 2분간 용해 후 최대한 5°C를 유지한 상태에서 각각 총 정자수  $200 \times 10^6$ 의 0.2 mL 정액을 1 mL 주사기를 이용하여 암탉의 질 속 2~3cm에 주입되도록 하였다. 인공수정은 오후에 이틀 연속으로 실시 후 3일 후에 2차 수정을 실시하였다. 집란은 첫 수정 후 48시간째부터 7일간 종란을 수집하였다. 수집된 종란은 훈증 소독을 거쳐 종란 보관실에 저장하였다. 입란 후 7일째 검란등을 이용하여 수정율을 조사하였으며, 21일째 부화율을 조사하였다.

## 5. 주요 조사 항목

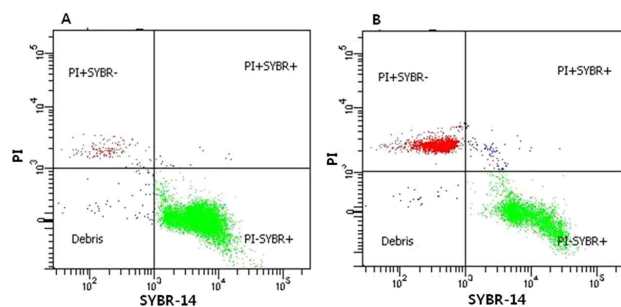
희석정액과 동결정액의 생존율 및 인공수정을 실시하여 수집된 종란에서 각각 무정란, 발생중지란 및 부화란 수를 조사하였다.

## 6. 통계처리

통계분석은 Statistical Analysis System(SAS release ver. 9.1, 2002)의 General Linear Model procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고 One-way ANOVA procedure를 이용하여 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

공시된 오계의 정자를 동결 보존하는데 있어서 동결보호제로 MA가 정자의 용해 후 생존성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 정자의 생사염색을 실시하였다. Fig. 1에서는  $3.64 \times 10^9$ /mL 농도의 원정액과  $910 \times 10^6$ /mL 농도의 동결 및 용해된 동결정자를 이용하여 총 10,000개의 정자에서 SYBR-14와 PI의 형광 발현 분포도를 2차원 dot plots으로 표현하였다. PI-SYBR- 집단은 염색이 되지 않은 입자군으로 추정되었으며, DNA를 포함하지 않는 세포 유래 debris로 간주하였다. PI-SYBR+ 집단은 SYBR의 녹색 형광만 발현된 정자로 세포막 생리적 투과성이 온전함을 나타냈다. PI+SYBR- 집단은 막 투과성이 파괴된 정자군으로 생존능력이 없는 정자군으로 간주되었으며, PI+SYBR+ 집단은 PI와 SYBR의 염색이 동시에 이루어지는 집단으로 FACS의 분석 과정에서 죽어가는 정자군으로 간주하였다. 신선한 정자와 MA를 동결보호제로 이용하여 동결한 후 용해된 정자군의 생존율은 Table 2에



**Fig. 1.** FACS analysis on sperm membrane integrity of unfrozen (A) and frozen-thawed (B) chicken spermatozoa stained with SYBR-14 and PI. PI-SYBR- quadrant contains debris, PI-SYBR+ quadrant contains live spermatozoa, PI+SYBR- quadrant contains dead spermatozoa and PI+SYBR+ quadrant contains dying spermatozoa.

**Table 2.** Plasma membrane integrity of chicken spermatozoa in fresh and frozen-thawed semen (results expressed as mean  $\pm$  SD)

| Semen  | Live (PI-SYBR+)               | Dying (PI+SYBR+)            | Dead (PI+SYBR-)               |
|--------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Fresh  | 95.17 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup> | 0.4 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup> | 3.57 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>  |
| Frozen | 55.93 $\pm$ 1.38 <sup>b</sup> | 3.7 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup> | 39.43 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup> |

Different superscripts within lines indicate significant differences: <sup>a,b</sup>  $P < 0.05$  ( $n=3$ ).

표현되었다. 신선정액의 살아있는 정자군은 95.2%고, 동결정액의 살아있는 정자군은 55.9%로 유의적으로 감소하였으며, 희석된 신선정액의 경우, 죽은 정자군은 3.6%로 관찰되어 동결정액의 39.43%와 차이가 나타났으며, 죽어가는 정자군은 각각 0.4%와 3.7%로 각각 유의적 수준의 차이가 관찰되었다( $P < 0.05$ ). Partyka et al.(2010)은 닭 정액을 다른 acetamide 계열의 동결보호제인 DMA를 이용하여 동결 및 용해된 정자의 비율은 유세포분석기를 이용하여 분석하였으며, 보고에 따르면 약 24.7%가 살아 있는 것으로 본 연구에서 보고된 55.9%의 결과와 비교해 볼 때, 오계의 정자를 동결 보존하는 함에 있어 MA가 닭 동결정자의 생존성을 증진하는데 유리할 것으로 추정된다.

동결보호제로서 MA가 수정율과 부화율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 대조군으로서 MA가 첨가된 희석액으로 1:4의 비율로 희석된 정액과 실험군으로써 동일하게 희석된 정액을 동결 및 용해하여 암컷 White Leghorn에 인공수정을 실시하였다. Table 3에서는 7일 동안 회수된 수정란의 수, 수정율, 발생중지란의 수 및 부화율에 관한 결과를 표시하였다. 7% MA가 첨가된 동결희석액을 이용한 동결정액의 수정율과 부화율은 각각 66.36%와 90.45%로 관찰되었으며, 동일한 농도의 MA가 함유된 HS-1희석액으로 희석된 신선정액의 수정율과 부화율은 94.98%와 92.64%로 각각 관찰되었다. 이와 같은 결과는 동결보호제로서 MA는 오계 동결정자의 수정란에 대한 수정율에는 유의적 수준으로 차이가 났으나 부화율에 유의적 차이가 없는 것으로 관찰되었으며 동결 후 용해된 정자를 이용하여 생산된 종란의 수정율 저하 현상은 동결 과정에서 손상을 받은 정자의 효과로 추정되며, 그 외에 알려지지 않은 다른 요인에 의하여 발생한 원인으로 사료된다( $P < 0.05$ ).

동결보호제로 glycerol을 사용한 동결정액의 수정율은 93% (Lake et al., 1981)로 보고하였으나, 박창식 등(2003)은 68%의 수정율을 보고하였다. 또한 DMA를 활용한 펠렛화 동결

**Table 3.** Effects of artificial insemination using either fresh or frozen-thawed semen on subsequent fertility and hatchability of Oyge hatchery eggs

| Semen  | No. of eggs laid for 7 days | No. of unfertilized eggs (mean) | Fertility (%)             | No. of dead eggs during hatch (mean) | Hatchability of fertile eggs (%) |
|--------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| Fresh  | 114                         | 6(0.86 ± 0.69) <sup>a</sup>     | 94.98 ± 3.93 <sup>a</sup> | 8(1.14 ± 0.38)                       | 92.64 ± 2.33                     |
| Frozen | 115                         | 38(5.43 ± 1.13) <sup>b</sup>    | 66.36 ± 8.42 <sup>b</sup> | 7(1.00 ± 0.82)                       | 90.45 ± 8.05                     |

Values are expressed as mean ± SD.

Different superscripts within lines indicate significant differences: <sup>a,b</sup>  $P < 0.05$  (n=7).

방법에 의하여 생산된 동결정액으로 인공 수정한 경우에는 92.7%, 스트로를 이용하여 동결하였을 경우에는 프랑스의 Tselutin et al.(1999)은 26.3%의 수정율을 보고하였으며, 국내의 김학규 등(2002)은 10.5%의 수정율을 보고하였다. 한편, 일본의 Sasaki et al.(2010)은 MA를 동결보호제로 이용하여 생산된 닭 동결정액에서 90% 이상의 수정율을 보고하였으나, Hanzawa et al.(2010)은 70.5%의 수정율을 보고하였다. 이것은 본 연구 결과의 66.4%의 수정율과 비슷한 수준이며 닭의 동결정액의 수정율은 Donoghue and Wishart (2000)의 보고에서 언급한 바와 같이 연구자에 숙련도에 의해 크게 다르게 나타나며, 계통의 차이가 매우 크다고 한 내용을 확인할 수 있었다(Alexander et al., 1993). 본 연구에서는 오계의 정자를 이용하여 백색산란계인 White Leghorn에 수정하여 동결정액의 수정율과 부화율을 판단하였으며, 이와 같은 이유로 계통간의 차이가 오계만을 이용하여 실험을 반복할 때에 도출되는 결과와는 차이가 있을 것으로 추정된다. 그러므로, 닭 정액의 유전자원 보존연구에 있어서 계통간의 변이를 최소화하는 동결보존방법에 대하여 추후 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

## 적 요

본 연구는 동결보호제로 이용되는 MA가 오계 정액의 생존율과 생산된 종란의 수정 및 부화율에 미치는 영향을 검토하여 재래가금의 동결보존 방법의 기초를 마련하고자 실시하였다. 10수의 오계 수탉에서 채취한 혼합정액을 희석정액을 제조하고 동시에 동일한 희석액으로 준비된 신선정액을 준비하여 각각 20수의 White Leghorn 암탉에 인공수정하였다. 7일 동안 생산된 종란을 각각 114개 및 115개를 회수하여 인공부화기에 입란하였고, 발생 7일째에 검란하여 수정율을 관찰하였으며, 발생 21일째에 부화율과 발육 중지란을 조사하였다. 동결정액을 이용하여 생산된 종란의 수정율은 66.36%

로 관찰되었으며, MA가 함유된 희석액으로 준비한 동일한 농도의 신선 정액을 이용하여 생산된 종란의 수정율은 94.98%로 관찰되었다. 또한, MA 동결보호제가 함유된 희석정액과 동결정액을 이용하여 생산된 종란의 부화율은 모두 90% 이상으로 관찰되어 유의성이 없었으며, Glycerol 동결보호제의 문제점으로 보고된 수정 능력 및 부화 억제 효과는 없는 것으로 사료된다. 그러므로 동결정액을 이용한 종란에서 무정란 수는 신선한 희석 정액을 사용하였을 때보다 약 6.3배로 유의적 높았으나, 동결보호제에 의한 효과로 추정되지는 않았다. 닭 동결정액의 기술의 실용화를 위해서는 조류 정액의 보존 및 동결 연구에는 여전히 해결되어야 할 문제점이 많으며, 특히 품종 간 및 개체 간의 변이가 크기 때문 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

(색인어 : 오계, 동결보호제, n-methylacetamide, 정액)

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 닭 유전자원의 다양성 보존 및 복원기술개발(과제번호 PJ0082402012)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

## 인용문헌

- Alexander A, Graham JK, Hammerstedt RH, Barboto GF 1993 Effects of genotype and cryopreservation of avian semen on fertility and number of perivitelline spermatozoa. *Br Poult Sci* 34:757-764.
- Allen TE, Bobr LW 1955 The fertility of fowl spermatozoa in glycerol diluents after intra-uterine insemination. *Poultry Sci* 34:1167-1169.
- Burrows WH, Quinn JP 1935 A method of obtaining sperm atozoa from the domestic fowl. *Poultry Sci* 14:251-254.

- Burrows WH, Quinn JP 1937 Artificial insemination of chickens and turkeys. Proc 7<sup>th</sup> World's Poultry Congress pp. 82-85.
- Christensen P, Stenvang JP, Godfrey WL 2004 A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. J Androl 25:255-264.
- Donoghue AM, Thistlethwaite D, Donoghue DJ, Kirby JD 1996 A new method for rapid determination of sperm concentration in turkey semen. Poultry Sci 75:785-789.
- Donoghue AM, Wishart GJ 2000 Storage of poultry semen. Animal Reproduction Sci 62:213-232.
- Garner DL, Johnson LA 1995 Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol Reprod 53:276-84.
- Hammerstedt RH, Graham JK 1992 Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. Cryobiology 29:26-38.
- Hanzawa S, Niinomi T, Miyata T, Tsutsui M, Tajima A 2010 Cryopreservation of chicken semen using N-methylacetamide as cryoprotective agent. JP Poultry Sci 47:j27-j32.
- Lake PE, Ravie O, McAdam J 1981 Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: Application to breeding programmes. Br Poult Sci 22:71-77.
- Lake PE, Ravie O 1984 An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. Br Poult Sci 25:145-150.
- Neville WJ, Macpherson JW, Reinhart B 1971 The contraceptive action of glycerol in chickens. Poultry Sci 50:1411-1415.
- Partyka A, Nizanski W, Łukaszewicz E 2010 Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. Theriogenology 74:1019-1027.
- Polge C, Smith AV, Parkes AS 1949 Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164:666.
- Sasaki K, Tatsumi T, Tsutsui M, Niinomi T, Imai T, Naito M, Tajima A, Nishi Y 2010 A method for cryopreserving semen from Yakido roosters using N-methylacetamide as a cryoprotective agent. JP Poultry Sci 47:297-310.
- Sexton TJ 1973 Effect of various cryoprotective agents on the viability and reproductive efficiency of chicken spermatozoa. Poultry Sci 52:1353-1357.
- Sexton TJ 1980 Optimal rates for cooling chicken semen from +5 to -196°C. Poultry Sci 59:2765-2770.
- Tereshchenko AV, Artemenko AB, Sakhatsky NI 1992 Cryopreservation of chicken semen. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands, Vol 3 pp.1602-1604.
- Tselutin KF, Seigneurin F, Blesbois E 1999 Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Sci 78:586-590.
- Van voorst A, Leenstra FR 1995a Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. Poultry Sci 74:136-140.
- Van Voorst A, Leenstra FR 1995b Effect of dialysis before storage of cryopreservation on fertilizing ability of fowl semen. Poultry Sci 74:141-146.
- 김학규 2002 정액의 액상 및 동결보존이 닭의 번식능력에 미치는 영향. 충남대학교 박사학위논문.
- 박창식 이봉덕 이경우 김학규 2003 육용종계 정자의 동결보존에 관한 연구. 한국가금학회지 30(2):91-94.  
(접수: 2012. 11. 1, 수정: 2012. 12. 3, 채택: 2012. 12. 4)