

Diff-Quik 염색방법에 의한 오계 닭 정자의 염색질 이상과 운동성 추정에 관한 연구

김성우^{1†}, 최아름¹, 최창용¹, 김동교¹, 성환후¹, 김재환¹, 김종대²

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²농촌진흥청 국립축산과학원 자원개발부 가금과

The Study of Estimation of Chromatin Abnormality of Ogye Rooster Sperm and Activity by Diff-Quik Staining Method

Sung Woo Kim^{1†}, Ahreum Choi¹, Changyong Choe¹, Dongkyo Kim¹, Hwan-Hoo Seong¹,
Jae-Hwan Kim¹ and Chongdae Kim²

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

²Poultry Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Seonghwan 330-801, Korea

ABSTRACT Ogye rooster sperm chromatin status can be detected using well established sperm assays. In this paper, a simple and fast method to monitor rooster sperm chromatin status could be employed in field for assessment of chicken sperm quality. Using standard bright field microscope, Diff-Quik stains can be reproducibly, easily and routinely monitored with simple staining. The presence of abnormal chromatin staining of rooster sperm was determined by darker stain in head. In the fresh semen, the viabilities of three tested Ogye spermatozoa were 93.53%, 82.42% and 90.63% and normal chromatin rates were 87.96%, 74.25% and 85.10% respectively. However, after freezing, the rates of viability of thawed semen were reduced to 69.58%, 61.98% and 72.20% and normal chromatin rate also reduced to 58.91%, 48.49% and 63.34%. A significant correlation between live sperm and normal sperm nuclei was 0.875 in fresh semen and 0.513 in frozen semen. After incubation of sperm at 37°C for 5min, the rates of viability, chromatin normality and sperm head activity were shown as 90.63±1.28%, 82.44±8.09% and 66.68±10.29% in fresh semen. However, the rates of thawed semen were reduced to 67.92±7.55%, 56.92±12.15% and 47.32 ±5.02%, respectively. The relationship between chromatin normality and sperm head movements in fresh and thawed semen were 0.564 and 0.540, respectively. With these results, the chicken sperm normality could be assessed by the Diff-Quik staining that could be used for chromatin status of sperm head and activated morphology of live spermatozoa, as a simple and rapid staining method.

(Key words : chicken sperm, morphology, viability, Diff-Quik staining)

서 론

포유류를 포함하여 동물의 정자는 난자를 수정시켜 새로운 생명을 탄생시키는 운동성을 가지고 있는데, 이를 분석하는 것은 생자생리 연구에 반드시 필요하다. 특히 축산업의 기반이 되는 품종육성 및 개량기술은 가축을 인공수정하여 다양한 순수 계통을 생산·유지하게 되고, 이것을 활용하여 실용축을 생산하는데 동결정액을 활용하는 기술은 필수적이다. 특히 가금 산업에 있어 육종의 고도화는 품종의 다양성이 줄어들게 만들고 있으며, 순계에서는 유전적 다양성이 매우 낮은 것으로 알려져 있다. 특히, 생축으로서 소수의 개

체를 유지하는 방법은 악성 가금질병에 노출되었을 때, 유전자원을 망실하게 될 위험성이 매우 높으므로 양계산업의 지속가능성을 위협할 수 있는 요인으로 분석되고 있다. 동결 정액과 같은 영구보존 유전자원을 확보하는 방법으로 가금 생식 세포를 동결하는 기술은 유전자원을 보존하고 활용하는 방법의 기초가 되며, 유전자원을 영구 보존하는 방법의 기초가 된다. 닭 동결 정자의 용해 후 생존성과 활력도를 분석하는 방법은 동결 정자의 효율성을 판별하는 측도가 되고 있으나, 포유류 정액과는 달리 형태가 창형 구조로 매우 길며, 뱀이 이동하는 형태(snake like movement)와 유사하게 움직이고 있어서 정자의 움직임을 정확하게 판단하기가 어

[†]To whom correspondence should be addressed : sungwoo@korea.kr

렵다(Holsberger et al., 1998).

가금의 정자를 염색하는 방법은 매우 이른 시기에 시도되었으며, 많은 연구를 통하여 정자의 질과 수정 능력을 추정하는 방법으로 간주되고 있다. 그러나 닭은 정자의 운동성을 평가하는 것은 비교적 활력도가 낮은 정자를 사용하더라도, 수정란을 생산할 수 있음이 보고되었다(Howarth, 1983). 그 원인은 가금 질에서 실제 수정이 일어나는 나팔관으로 정자가 능동적으로 이동되기 때문이라고 밝혔다. 그럼에도 불구하고, 가금류의 인공수정에 1개의 난자를 수정하기에 필요한 최소 정자 수를 정확하게 추정할 수 없는 문제점이 존재하므로, 동결정액을 활용한 인공수정에 정확한 정자수를 추정함에 있어 어려움이 존재한다. 이는 닭의 생리적 특성상 인공 수정된 정액이 자성생식도관에서, 자궁과 질의 경계부에 정자저장소(semen storage tubule)에 1차적으로 보존되고, 장기간에 걸쳐 체내에서 지속적인 수정이 이루어지기 때문이다(Blesbois and Brillard, 2007). 그러므로 닭 정자의 형태적 이상은 정자의 활력도 보다 더 중요한 요인으로 간주되며, 1차적으로 정액의 질적 가치를 판단하는 중요한 자료가 된다. 닭 종축의 개체 관리와 선발을 위하여 개별 정자의 특징과 수정율을 조사하는 것은 매우 중요하며, 인공 수정 및 동결 정액에 적합한 정액인지를 판단할 수 있는 근거가 된다(Donoghue and Wishart, 2000).

일반적으로 정자의 운동성을 추정하는데 있어 가장 많이 이용하는 방법은 정자의 운동성을 디지털 동영상으로 컴퓨터에 저장하고, 정자분석전문프로그램을 활용하여 객관적인 자료를 확보하는 방법이다. 그러나 이 방법은 고해상도의 현미경과 고가의 프로그램 비용이 요구되어 현장에서 바로 이용하기에는 제한적인 경우가 많은 단점이 존재한다. 정자의 염색 방법은 이러한 단점을 극복할 수 있으며, 형태적인 이상을 판별하는데 이용된다. 염색된 도말 슬라이드를 오일 렌즈로 관찰하면, 살아 있는 정자의 미세구조를 관찰할 수 있다(Lake, 1978). 정자 염색에는 다양한 시약 준비 방법이 보고되었으며, 도말 방법도 연구자에 따라 다양한데, 일반적으로 주로 에오신-니그로신 염색법(eosin-nigrosin staining)을 흔히 이용하여 형태적 이상을 관찰할 수 있다. 에오신은 손상 받은 세포막을 통과하기 때문에 세포내의 소기관을 분홍색으로 염색시켜 죽은 정자와 살아있는 정자를 구별할 수 있으며, 살아 있으나 정상적인 정자와 기형정자의 비율과 부분적으로 손상을 받은 정자를 판별할 수 있다(Bask and Cecil, 1997). 그러나 많은 염색방법이 보고되었음에도 불구하고, 반드시 숙련된 연구자에 의한 기형 정자 판정이 필수적인 요소가 되기 때문에, 실험자의 능숙도와 경험이 무엇보다 중요

한 요인이 되며, 닭 정자의 생존율과 기형을 판정에 있어서 차이가 나타나는 주요 인자라고 보고되었다(Root-Kustritz et al., 1998; Lukaszewicz et al., 2008). 또한, 닭 정자는 다양한 형태의 기형 정자가 나타나고 있음이 보고되어 있는데, 그 분류 기준 또한 연구자마다 다른 기준을 제시하고 있다(Maeda et al., 1986). 특히, 생존율의 경우, 막 투과성 차이에 의하여 살아 있는 정자와 손상 받은 정자는 그 염색도가 연속성을 띠고 있기 때문에 판정이 어려운 경우가 많으며, 이는 염색기법에 의한 생존성 판단의 단점으로 존재한다. 닭 정자의 두부는 포유류에 비하여 두부가 매우 길기 때문에 실험과정에서 손상받기 쉬운 형태라고 판단되며, 정자의 표본 제작 과정이나 슬라이드에 도말되는 과정에서 손상된 정자가 만들어질 수가 있기 때문에 표본 간에 있어 서로 다른 차이를 보일 수가 있는 어려움이 존재한다. 그러므로 최근의 정자 생산 판정 연구에서 정자 생사 염색 시약으로 형광 시약인 propidium iodide과 SYBR 14을 사용한다(Garner and Johnson, 1995). 생사염색기법은 핵을 염색시키는 서로 다른 염색시약을 막 투과성 차이를 이용하여 경쟁 염색을 실시하고 핵상을 관찰하는 방법으로 사용되며 점차 전통적인 염색방법을 대체하고 있다. 그러나 정자의 기형을 검사에는 도말된 정자를 염색시키는 방법이 필수적인데, 포유류 정자에서는 Diff Quik 염색법을 많이 이용하고 있다(Mota and Ramalho-Santos, 2006). 이 방법은 도말된 정자시료를 메탄올 고정방법을 이용하여 고정하고, 에오신에 노출시킨 다음, 티아진 염색시료(thiazin dye)에 간단히 노출시키는 과정을 이용한다. Diff Quik 염색은 과정이 매우 간단하여 분석을 빠르게 실시할 수 있는 장점이 있다. 이 방법에 의하여 정상적인 정자와 핵을 가진 정자는 연하게 염색되며, 손상 받거나 핵 이상을 가진 정자는 아주 진한 색상으로 염색되어서 정자의 손상도를 쉽게 구별할 수 있다(Tomlinson et al., 2001; Benchaib et al., 2003; Henkel et al., 2004; Larson-Cook et al., 2003). 간단히 원리를 소개하면, 도말된 정자 시료는 메탄올 고정제에서 짧은 시간동안 고정되고, Diff Quik 용액에서 에오신은 양이온/산성 염료로서 정자 세포에서 양 전하를 띠거나, 중성 전하를 가진 단백질을 가진 세포 소기관 부위를 분홍색으로 염색한다. 그 후 티아진 염료가 함유된 Diff Quik 용액에서 산화 과정을 통하여 DNA가 푸른색으로 염색되는 특징을 가지고 있다. 이 방법은 각 염색시료에 노출되는 시간이 약 15초에서 20초 내외로 전통적 염색방법에 비하여 매우 빠르며, 정상 정자의 비율이 확인하는 것이 매우 중요한 체외수정 클리닉과 현장에서 실시하는 야생 동물의 연구에 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 오계 정자에 Diff Quik

염색을 실시하여 닭 정자의 형태 관찰과 생존성을 동시에 판별하는 방법으로 이용될 수 있음을 증명하였다. 또한, 신선 정액과 동결정액에서 또한 동일한 시료를 디지털 영상으로 컴퓨터에 저장하여 운동성을 관찰함으로써 운동성을 보이는 정자와 보이지 않는 정자를 분석하였고, 현장에서 채취한 닭 정자는 Diff Quik 용액으로 간단히 염색하여 생존성과 운동성을 유추할 수 있는 근거를 마련하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

국립축산과학원 가축유전자원센터에서 보존 중인 32~40 주령의 재래닭 오계 수탉 9수를 정액 채취용으로 본 실험에 사용하였다.

2. 정액채취 및 동결 정액의 제조와 용해

정액 채취는 맞사지 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°C 하에서 1:1 비율로 동해방지제가 첨가되지 않은 HS-1 희석액으로 희석 후 30분간 평형 시간을 가진 후 1차 희석정액에 동일 비율로 15% MA를 첨가한 희석액에 1:1로 희석하여 동해방지제 MA의 최종농도를 7.5%로 맞추었다. HS-1의 조성은 Hanzawa et al.(2010)의 방법에 따라 제조하였으며, 동결정액의 포장용기로는 0.5 mL straws(Mini tube, Germany)를 사용하였고, 동결방법으로 액체질소 상면 4~5cm에서 30분간 동결 후 -196°C에 침지하였다. 실험을 위하여 동결정액은 5°C의 저온 수조에서 2분간 용해하여 상온에서 5~10분간 방치하고 염색에 이용되었다.

3. 정액 생존율의 평가

오계의 원정액은 HS-1 희석액으로 1:4로 1차 희석하였고, 동결정액과 동일하게 정자의 농도가 150×10^6 /mL로 조정하여 실험에 사용하였다. 미리 가온된 슬라이드와 커버글라스를 이용하여 37°C로 가온된 광학 현미경(Olympus IX71)에 올리고, 20배 대물렌즈로 정자를 관찰하였다. 이미지 전용 컴퓨터를 이용하여 모니터 상에서 나타나는 디지털 영상을 이미지 전용 프로그램(Olympus사의 DP2-BSW, Bandsoft사의 Bandicam v2.0)을 이용하여 저장하였다. 모니터에 나타난 저장된 동영상을 1초간 반복 재생을 실시하고, 트레이싱 페이퍼에 영상을 투과시켜 직접 운동성 정자와 비 운동성 정

자를 표기하여 자료를 획득하였다. 한 시료 당 총 3~5 위치의 동영상을 촬영하여 총 정자수가 200개 이상이 되도록 측정하였다(Kuster et al., 2004).

4. Diff Quik 염색

신선정자와 동결정자는 Diff Quik 염색 시약(Dade Behring Inc. USA)을 활용하여 염색하였다. 약 4~10 μ L를 가온된 슬라이드 글라스에 점적하고, 다른 슬라이드를 경사면에 접촉시켜 도말을 실시하였다. 37°C로 가온된 슬라이드 건조대에서 공기 중에 노출시켜 건조시켰다. 준비된 도말 슬라이드는 Diff Quik 고정제에 10~20초 노출시켰으며, 그 후 에오신 염색 용액과 티아진 염색 용액에 연속적으로 동일한 시간으로 노출시켜 염색하고, 증류수에 짧게 노출하여 과도한 용액을 제거하였다. 염색된 시료는 상온에 보관하였으며, $\times 100$ 오일 렌즈에서 관찰하였고, 밝은 두부를 가진 정자와 진한 두부를 가진 정자로 구별하여 분석하였다. 한 시료 당 전체 정자가 200개 이상이 되도록 최소 4군데 이상에서 측정하였다. 균일한 결과가 얻을 수 있도록 훈련된 3명의 연구자가 동일한 시료를 자료를 수집하여 상호 비교하여 균일하고 반복성 있는 실험을 유지하였다.

5. 정자 활력도의 검사

용해된 동결정자를 HS-1희석액으로 1:8로 재희석을 실시하고, 37°C에서 5분간 배양하며 37°C로 미리 가온된 슬라이드 글라스에 희석정액 4 μ L를 점적 후, 슬라이드 가온판 위에서 재빨리 다른 슬라이드를 정자소적에 접촉하여 도말을 실시하였다. 염색된 정자에서 두부가 물결모양으로 관찰되는 정자를 측정하여 활력도가 우수한 정자로 판정하였다.

6. 주요 조사항목

희석정액과 동결정액의 영상분석을 실시하였으며, 오계정자의 생존성과 염색질 이상 핵형 염색 출현빈도, 정자의 활력도를 조사하였다.

7. 통계처리

통계분석은 Statistical Analysis System(SAS release ver 9.1, 2002)의 Student's *t*-test를 이용하여 평균값을 비교하였고, Pearson's correlation coefficients analysis를 이용하여 연관성을 검증하였다.

결 과

1. 오계 정자의 신선 정액과 동결 정액의 운동성과 염색 질 이상 염색

오계정자는 동결 전 신선상태의 정자의 운동성과 용해 후 정자의 운동성을 관찰하여 그 활력도를 판정하였으며, Diff-Quik 염색방법에 의한 핵상 염색도에 따라 이 비율을 상호 비교하였다. Fig. 1에서는 동결 후 용해된 오계정자의 슬라이드를 Diff-Quik 염색법으로 염색할 때 정자의 염색질 이상 추정이 가능함을 보여주고 있으며, 그 결과는 Table 1와 같다. Fig. 1에서는 파손된 염색질을 가진 정자의 두부는 Diff-Quik 염색에 의하여 진하게 염색이 되고 있으며, 정상적인 염색질을 보유한 정자의 두부는 염색도가 낮게 나타남을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 오계의 개체별 차이를 관찰하고자 총 계 3개체에서 원정액을 채취하고, Diff-Quik 염색을 실시하고 동영상으로 움직임 관찰하여 그 생존율을 비교하였다. Table 1에서는 오계의 신선 정액의 생존성이 93.53%, 82.42% 및 90.63%일 때, Diff-Quik 염색질의 정상도는 87.96%, 74.25% 및 85.10%로 관찰되었으며, 동일한 시료를 동결하고 용해 후 정액의 생존성은 조사하면 69.58%, 61.98% 및 72.20%로 관찰될 때, 염색질의 정상도는 58.91%, 48.49% 및 63.34%로 관찰되었다.

2. 오계 정자 생존성과 Diff-Quik 정상 핵형 염색의 연관성 분석

오계정자에서 생존성을 보이는 정자의 비율과 Diff-Quik 염색에서 정상 핵형 염색의 출현비율에 관한 연관성을 분석

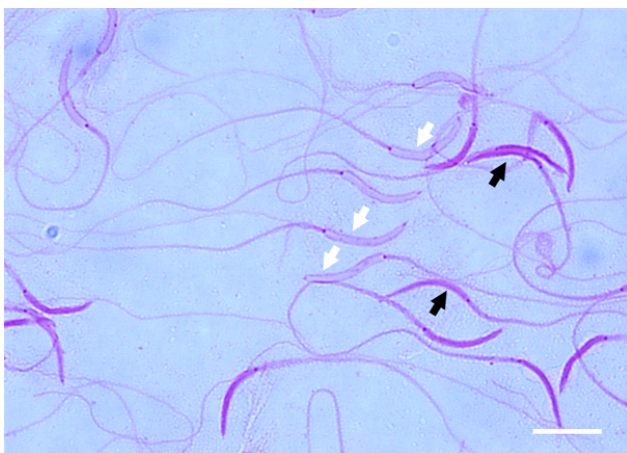


Fig. 1. Ogye rooster spermatozoa assessed by Diff-Quik staining. Ogye spermatozoa with different staining intensities can be observed with a standard bright field microscope, which include normal staining pattern (white arrow), and sperm with abnormal dark staining heads (black arrow). Measuring bar is 10 μm.

Table 1. Morphological properties of chromatin status of Ogye rooster semen

Ogye rooster No	Treatment	Diff-Quik normal stain (%)	Viability (%)
1	Fresh	87.96± 6.01 ^a	93.53±0.96 ^a
	Cryopreserved	58.91± 3.40 ^b	69.58±8.72 ^b
2	Fresh	74.25± 8.22 ^a	82.42±1.92 ^a
	Cryopreserved	48.49± 7.64 ^b	61.98±5.22 ^b
3	Fresh	85.10± 1.17 ^a	90.63±1.28 ^a
	Cryopreserved	63.34±18.60 ^b	72.20±6.33 ^b

^{a,b} Means with different superscripts were significantly different ($p<0.01$).

하였다. Table 2에서는 신선 정자군에서 정자의 생존성과 정상 핵형 염색의 출현율에 관한 상관 계수는 0.875로 관찰되었으며, 동결 정자군에서는 0.513으로 관찰되었다.

3. 활성화된 오계 정자의 Diff-Quik 염색 분석

오계정자를 동결 보호제가 없는 HS-1회색액으로 1:8로 희석을 실시하고, 37°C에서 5분간 가온하면 정자의 활력도가 증가한다. 이때 정자를 미리 동일한 온도로 맞춘 슬라이드 글라스에 4 μL를 점적하고, 도말을 재빨리 실시하면 정자의 두부의 움직임이 슬라이드 글라스 상에서 남게 된다. Fig. 2에서는 오계 정자의 두부가 움직임이 없이 공기 중에서 건조되어 고정된 정자의 두부는 약간 휘어진 구조로 관찰되며, 살아 있으면서 활성화된 정자는 두부에서 뱀의 움직임(snake-like movement)과 같은 형태로 관찰되었다(Fig. 2). Table 3에서는 오계의 신선 정액의 정상 핵형이 82.44±8.09%일 때 생존성은 90.63±1.28%로 관찰되었으며, 활성화된 정자의 두부 움직임을 보여주고 있는 정자의 비율은 66.68±10.29%로 관찰되었다. 오계의 동결 후 용해된 정자에서는 정상 핵형이

Table 2. Correlation coefficients between Diff-Quik normal stains and viability

	Viability	
	Fresh (n=9)	Cryopreserved (n=9)
Diff-Quik normal stain	0.875	0.513

All values are statistically significant ($p<0.01$).

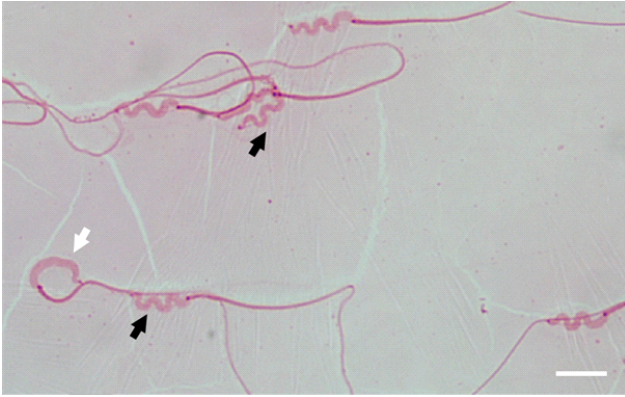


Fig. 2. The image of moving heads in Ogye rooster activated fresh spermatozoa. The head of Ogye spermatozoa shows different moving images, which includes non-moving head (white arrow) and moving head (black arrow). Measuring bar is 10 μ m.

Table 3. Morphological properties of activated sperm head

Treatment	Diff-Quik normal stain (%)	Live (%)	Activated sperm heads (%)
Fresh	82.44 \pm 8.09 ^a	90.63 \pm 1.28 ^a	66.68 \pm 10.29 ^a
Cryopreserved	56.92 \pm 12.15 ^b	67.92 \pm 7.55 ^b	47.32 \pm 5.02 ^b

^{a,b} Means with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

56.92 \pm 12.15%일 때 67.92 \pm 7.55%로 관찰되었으며, 활성화된 정자의 두부 움직임에 보여 주고 있는 정자의 비율은 47.32 \pm 5.02%로 관찰되었다.

4. 오계 정자의 Diff-Quik 정상 핵형 염색과 활성화된 두부 운동성의 연관성 분석

오계의 신선 정자와 동결정자에서 Diff-Quik 정상 핵형 염색과 활성화된 두부의 움직임에 관한 연관성 분석을 실시하였다. Table 4에서는 신선 정자군에서 정자의 생존성과 정

Table 4. Correlation coefficients between Diff-Quik normal stains and activated sperm heads

	% of activated sperm heads	
	Fresh (n=9)	Cryopreserved (n=9)
Diff-Quik normal stain	0.564	0.540

All values are statistically significant ($p < 0.01$)

상 핵형 염색의 출현율에 관한 상관계수는 0.564로 관찰되었으며, 동결 정자군에서는 0.540으로 관찰되었다.

고 찰

닭 정액의 활용성을 분석하는 요인에 있어서 정자의 핵상이 정상적인가에 관한 평가는 아직까지 많은 연구가 없으며, 특히 정자의 동결 방법에 관한 많은 연구가 진행되었으나, 용해 후 핵상의 정상성에 관한 연구는 찾아보기가 힘들다. 정자 염색질의 정상성을 판단하는 기준으로 정자가 얼마나 안정적인가를 판단하는 방법은 사람의 정자를 대상으로 많은 연구가 진행되었다(Agarwal and Allamaneni, 2004; Alvarez, 2003). 특히 인공수정의 결과로서 수정란 생산에 미칠 수 있는 정자 영향을 분석하는데, 정상 핵형의 비율은 매우 중요한 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(Spano et al., 2005). 정자의 손상도를 분석하는 방법은 많은 연구를 통하여 개발되었는데, 실질적인 DNA의 손상도를 관찰하는 방법이 있다(Sharma et al., 2004). 대표적으로 TUNEL 분석법과 comet 분석법을 그 예로 들 수 있는데, 전자는 손상된 DNA nick에 효소적 반응을 이용하여 형광물질을 붙여주는 방법(Varum et al., 2007)이며, 후자는 손상된 세포의 DNA를 세포단위로 전기영동하여 손상된 DNA가 세포를 빠져 나오는 정도를 측정하는 방법이다(Hughes et al., 1996; Donnelly et al., 2000). 이러한 측정 방법은 직접적인 DNA의 손상을 정량할 수 있는 장점이 있는 반면, 시약의 가격이 비싸며, 실험 시간이 많이 소요되고, 고가의 장비가 반드시 필요하다는 단점이 존재하여 실제 많은 실험실과 연구소에서 분석하기가 용의하지 않다. 그러므로 농가나 종축장에서 정자의 손상도를 쉽게 분석하는 방법은 값이 싸고 간단하면서 빠른 분석법으로 정자 손상도를 쉽게 알 수 있는 방법이 필요하다. 이론적으로 Diff-Quik 염색법은 DNA의 손상도를 직접적으로 정량하기 어렵다는 단점이 있으나, 정자의 특이적인 염색질 응축도를 빠르게 관찰할 수 있는 장점이 존재한다. 즉, 염색질의 이상이 존재하면 노출되는 DNA 또한 확률이 높아지게 되므로 Diff-Quik에서 염색도가 강하게 나타나는 정자는 위험에 노출되는 확률이 높다고 판단하게 된다. 염색물질이 얼마나 정자의 DNA에 접근하기 쉬운가에 따라 염색도가 확연히 구별되며, 개체에 따른 차이와 정자의 준비과정에서 나타날 수 있는 정자 손상도를 추정하는데 필요한 평가요인이 된다(Bungum et al., 2007; Erenpreiss et al., 2006; Varum et al., 2007; Sousa et al., 2009). 또한, 정자의 형태를 관찰하도

록 염색하는 것이 Diff-Quik 염색법이므로 핵형의 안정성 연구와 정자의 형태학적 분석을 동시에 실시할 수 있는 장점이 존재한다.

본 연구에서는 오계 정자의 동결 과정에 나타날 수 있는 염색질 이상도를 신선정자와 비교하여 관찰하였으며, 정자의 생존성과 연관성을 분석하였다. 최 등(2013)에 의한 MA 동결 보호제를 활용한 오계 정자의 동결 결과, 정자의 생존율이 35%에서 67%로 다양하게 나타남을 보고하였다. 특히 닭 정자의 생존성과 운동성 측정은 정자의 수정능과 발생능을 추정할 수 있는 중요한 요인으로 간주되고 있으나, 닭의 정자는 형태가 매우 길고, 두부와 편모의 경계가 명확하지 않아 판정이 어려운 것으로 알려져 있다. 본 연구의 결과에서는 오계의 신선 정액이 생존율이 서로 상이하게 나타나더라도, 정자 두부의 정상적인 염색질의 출현율은 비교적 균일하게 나타남을 보여주고 있다. 닭의 정액 동결 성적에 관한 균일성을 좌우하는 것이 개체에 따른 정자 염색질의 이상성이 한 원인이 될 수 있음을 설명하고 있으며, 닭 정액의 동결에 고려하여야 할 사항임을 상기시켜 준다. 특히 오계정액의 신선정액에서 나타나는 정자 염색질의 정상도는 정자의 생존성과 고도의 연관성이 있음이 본 연구에서 밝혀졌으며, 이는 닭 정액 품질을 판단하는데 있어서 동결 전 정액의 염색 방법으로 Diff-Quik 염색을 응용할 때 염색질의 정상도를 판단하는데 가치가 높음을 의미한다. 또한, 닭 정자의 움직임은 포유동물과는 다르게 두부에서 이동성을 나타내는 운동이 개시되고 있다. 이러한 특성을 잘 이용하여 슬라이드 도말을 준비하게 되면, 닭 정자는 간단한 방법으로도 활성화된 정자의 움직임이 슬라이드 상에서 관찰할 수 있음을 본 연구에서 밝혔다. 이러한 특성을 이용하게 되면 동결 후 융해된 정자의 활성도를 도말 슬라이드 위에서 유추할 수 있으며, 정자의 정상핵형 염색도와 생존성, 정자 두부의 운동성은 서로 상관관계가 존재함을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구결과에 따르면, 닭 정자에 있어서 Diff-Quik 염색방법은 사람의 정자와 동일하게 정자의 이상성 유무를 판단하게 하는 가장 간편하고 가장 빠른 염색방법으로 응용할 수 있음을 알 수 있으며, 특별한 실험도구나 장비를 이용하기 어려운 현상이나 농가에서 닭 정액의 품질을 객관화 할 수 있는 실험 방법으로 추정된다.

적 요

본 연구에서는 육종이 필요한 종계장에서 슬라이드 위에 도말된 닭 정액시료를 간편하게 염색하여 정자의 염색질 이

상성과 운동성을 유추할 수 있는 기법을 확립하고자 실시하였다. 오계 정자 도말 슬라이드를 Diff-Quik 시약으로 염색하여 관찰하면 신선정액에서는 정자 생존성이 93.53%, 82.42% 및 90.63%일 때, Diff-Quik 염색질의 정상도는 87.96%, 74.25% 및 85.10%로 관찰되었다. 동일한 시료를 동결하고 융해 후 정액의 생존성은 조사하면 69.58%, 61.98% 및 72.20%로 관찰되었으며, 염색질의 정상도는 58.91%, 48.49% 및 63.34%로 관찰되었다. 융해된 동결정액에서 활력이 우수한 정자를 쉽게 관찰하기 위하여 정자를 HS-1 희석액으로 재 희석하고, 37℃에서 가온하여 도말하면 염색된 정자의 두부에서 활력이 우수한 정자의 비율을 간단히 유추할 수 있음을 보여주었다. 특히, 신선 정자에서 정상 염색질을 가진 정자의 비율과 생존성이 상관관계는 매우 높은 것으로 판단되며, 동결 정자에서도 상관관계가 높다고 추정되었다. 이러한 결과는 Diff-Quik 염색방법으로 닭 정액의 품질을 정자의 염색질의 이상성 유무로 판단할 수 있음을 보여주고 있다. 특히 본 연구에서 제시된 방법은 닭 정자의 우수성을 판단하는데 유용할 것으로 판단되며, 닭 정액 시료를 준비할 때 준비한 도말 슬라이드를 현미경적 관찰에 의하여 활성화된 정자의 비율과 정상 염색질을 가진 정자의 비율을 추정하는 방법을 제시하였으며, 이는 인공 수정에 필요한 현장에서 수컷 개체의 종축 이용성을 쉽게 판단할 수 있는 근거를 마련할 수 있음을 의미한다.

사 사

본 연구는 농림부 Golden Seed Project의 『신품종 작출용 유전자원수집 및 집단의 순수화 (PJ00992302)』의 지원에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- Agarwal A, Allamaneni S 2004 The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* 56:235-245.
- Alvarez JG 2003 DNA fragmentation in human spermatozoa: Significance in the diagnosis and treatment of infertility. *Minerva Ginecol* 55:233-239.
- Bakst MR, Cecil HC 1997 Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination. 3. Sperm viability. I. Nigrosin/eosin stain for determining live/dead and abnormal sperm counts. *The Poultry Science Association*

- Inc., Savoy, Illinois. pages 29-34.
- Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois GJ 2007 Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 87:93-100.
- Blesbois E, Brillard JP 2007 Specific features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. *Animal* 1:1477-1481.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A 2004 The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 19:1401-1408.
- Burrows WH, Quinn JP 1935 A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poultry Sci* 14:251-254.
- Burrows WH, Quinn JP 1937 Artificial insemination of chickens and turkeys. *Proc. 7th World's Poultry Congress*. pages 82-85.
- Choi JS, Shin DB, Ko YG, Do YJ, Byun M, Park SB, Seong HH, Kim H, Kong IK, Kim SW 2013 Effects of kinds of cryoprotectants on the characteristics of frozen fowl semen. *Korean J Poult Sci* 40:171-1789.
- Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE 2000 Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared spermatozoa. *Hum Reprod*. 15:1552-1562.
- Donoghue AM, Wishart GJ 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reprod Sci* 62:213-232.
- Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J, Giwercman A 2006 Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: Clinical implications. *Hum Reprod* 21:2061-2064.
- Garner DL, Johnson LA 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53:276-84.
- Hanzawa S, Niinomi T, Miyata T, Tsutsui M, Tajima A 2010 Cryopreservation of chicken semen using N-methylacetamide as cryoprotectant. *Jp Poult Sci* 47:J27-J32.
- Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF 2004 Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 81:965-972.
- Holsberger DR, Donoghue AM, Froman DP, Ottinger MA, 1998. Assessment of ejaculate quality and sperm characteristics in turkeys: Sperm mobility phenotype is independent of time. *Poult Sci* 77:1711-1717.
- Howarth Jr B 1983. Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis, epididymis, and vas deferens following intramaginal insemination. *Biol Reprod* 28:586-590.
- Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin A, Thompson W 1996 Comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using the modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 2:613-619.
- Kuster CE, Singer RS, Althouse GC 2004. Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology* 61:691-703.
- Lake PE 1978 The principles and practice of semen collection and preservation in birds. In: *Symp Zool Soc. London*. p. 43.
- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kaspersen KM, Aamold ET, Evenson DP 2003 Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 80:895-902.
- Lukaszewicz E, Jerysz A, Partyka A, Siudzińska A 2008 Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Res Vet Sci* 85:583-588
- Maeda T, Terada T, Tsutsumi Y 1986 Studies of the factors causing abnormal acrosomes and crooked-necks in fowl spermatozoa during freezing and thawing. *Br Poult Sci* 27:695-702
- Mota PC, Ramalho-Santos J 2006 Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology* 65:1360-1375.
- Root-Kustritz MV, Olson PN, Johnston SD, Root TK 1998 The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *Journal of the American Animal Hospital Association* 34:348-352.
- Sharma RK, Said T, Agarwal A 2004 Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 6:139-148.
- Sousa APM, Tavares RS, Velez de la Calle JF 2009 Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Human*

Reprod 24:28-36.

- Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi GC, Sakkas D 2005
The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17:255-260.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D 2001 Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: Implications for assisted

conception. *Hum Reprod* 16:2160-2165.

- Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, Teodosio C, Paiva A, Ramalho-Santos J 2007 Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil Steril* 87:572-583.

Received Mar. 24, 2015, Revised Apr. 17, 2015, Accepted May. 18, 2015