

융해 온도가 유전자원 활용을 위한 희소한우(취소, 흑우 및 백우) 동결 정액의 재 동결 후 정자의 생존성에 미치는 영향

김민수, 최아름, 김찬란, 김동교, 성환후, 김성우[†]
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

Effects of Thawing Temperature of Frozen rare Breed Hanwoo (Korean Native Cattle) Semen on Viability of Refrozen Spermatozoa

Min Su Kim, Arum Choi, Chan-Lan Kim, Dongkyo Kim, Hwan-Hoo Seong, Sung Woo Kim[†]

Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 55717, Korea

ABSTRACT

Cryopreservation of germ cells from genetically proven animals could be a source of restoration tools from the risk of extinction or disappearance of wanted characteristics. Using frozen semen, the genetic gains of Korean native cattle have been increased greatly for 70 years. The preservation of genetic resources as a form of frozen semen straw has limited availability due to the numbers. To circumvent this weakness of frozen semen, we tested two re-freezing methods with different initial thawing temperatures using frozen Korean proven semen and rare breed semen from albino, black and chikso breeders. It has been known that human sperm could resist to cryo-damages by repeated freeze-thaw cycles, but not for Korean proven bulls number (KPN) or for rare breeds. Total 7 frozen semem from brindled(2), black(1), Korean Albino(2) and KPN(1) bulls were used for our research. After thawing straws under 5°C/2min or 37°C/40sec with low temperature water bath and thermo jug, spermatozoa were re-diluted with triladyl diluents after first thawing and re-frozen. Sperm motilities were compared between animals and treated groups after re-thawing. Mean values of motility and viability of refrozen/thawed sperm for expansion of the number of straws were significantly higher in 5°C than in 37°C ($P < 0.05$). However, the activity of viable sperm thawed at 5°C was significantly decreased before refreezing. It is estimated that re-freezing of frozen semen from rare Korean native cattle is possible with resistant properties of survived spermatozoa.

(Key words: semen, freezing, refreezing, genetic materials)

서 론

동결학(cryobiology)에서는 살아있는 생명을 영구보존하기 위해 생명활동을 정지(suspended animation, SA)시키는 수 많은 방법이 연구되어왔다. 이를 위하여 동면하는 동물의 개체와 조직 및 세포를 연구하기 시작하였으며 세포를 저온 저장하는 방법(hypothermal preservation, HP)을 먼저 연구하였다. 그러나, Polge 등(1949)에 의하여 세포는 동결 상태에서 보존할 수 있음이 밝혀졌으며, glycerol에 대한 특성을 동결보호제로 기술하며 연구를 진행하였다. 눈 속에 저온 저장된 닭 정자에서 생명 연장이 유지되고 있음이 우연히 알려지게 되면서 이를 이용한 SA연구 영역은 드라이 아이스(dry ice, DI)위에서 동결된 상태로 초저온냉동고에 보존하는 방법(-70°C)을

개발하게 되었으며, 최종적으로 액체질소에 침지하여 세포를 영구 보존하는 방법이 강구되었다(Evans and Maxwell, 1987). 정자는 SA를 유지하기 위한 여러 조건을 밝히는데 많이 이용되었으며, 동결학에서 가장 많은 성과를 얻었으며 소의 경우 산업화에 성공하였다. 특히 젓소의 육종과 육우의 형질 개량에 공헌한 바가 매우 커서 종축이 소실되어도 보존된 정액은 후대생산과 개량에 계속 사용되는 것이 일반화 되었다. 정자의 동결 기술은 점차 생쥐와 같은 실험동물로 확대되었고, 토끼, 염소, 양 등의 중소가축과 닭, 거위 등 야생조류의 정자로 그 적용대상이 점차 넓어지고 있다. 형질전환 동물과 같이 증식 및 유지가 어렵거나 정자의 생산성이 낮아 번식효율이 낮은 동물에서 계통보존이 가능하게 되었으며 멸종위기에 처한 야생동물의 보존에도 지대한 공헌을 하고 있다(Johnson and

[†] Corresponding author address: Sung Woo Kim, Ph.D.

Phone: 82-63-620-3542; Fax: 82-63-620-3591

E-mail: sungwoo@korea.kr

Lacy, 1995; Wildet 등 1997). 더욱이, 사람에게 있어서도 정자의 동결기술은 불임환자의 치료뿐만 아니라, 방사능치료를 포함하는 항암제 처방이나 생식독성이 있다고 알려진 약물이 처방된 환자의 권익을 보호하기 위한 보조생식술(assisted reproductive technology, ART)의 한 방편으로 응용되고 있다 (Ghasemian 등, 2012). 건강한 사람일지라도, 정관절제술을 실시하거나 피임 후 원하는 아기를 원할 경우, 정관복원술이 실시되는데, 이 경우 ART 시술에 필요한 정액을 공급할 때 정자동결기술은 필수적인 것으로 판단된다(Tomlinson과 Barret, 1999). 특히 불임환자는 ART시술에도 불구하고 빈번하게 임신에 실패할 경우가 많으며 보존된 정자를 융해하여 시술에 이용된 후, 다시 동결하여 사용하는 기술이 활용하기도 한다 (Rofoim 등, 2001; Verza 등, 2009).

정자 동결학에 관한 역사를 되돌아 보면 50년대와 60년대에 주로 많은 연구성과가 발표되었다. 초기 Polge의 연구에서 닭 정액에서 glycerol의 동결보존에 관한 연구를 처음 발표되었고 많은 연구자들의 추후 연구를 통하여 체계적인 동결 방법이 알려지기 시작되었다. 소에 있어서 성공적인 정자동결 방법은 Bratton 등(1955, 1957)에 의하여 개발되었는데 dry ice 위에서 펠렛(pellet)형태로 동결정액을 제조하여 인공수정에 활용 함으로서 후대 생산이 가능함이 보고되었다. 보통 정자동결에서 성공적이라고 표현하는 것은 융해 후 생존율이 동결직전보다 최소 50%이상인 되어야 한다는 것을 의미하는데 아직까지도 이러한 성적을 얻을 수 있는 품종은 실험동물과 몇몇의 포유동물에 몇 종에 불과하다. 더욱이 닭의 경우, glycerol 기반 희석액에서 동결 후 생존율이 90%이상을 얻더라도 부화율이 매우 낮은은 아직까지 정확한 원인이 보고되어 있지 않다(Sexton 1973). 동물에 있어서 주요 품종 별 정자의 동결은 토끼, 생쥐, 쥐, 말, 돼지에서 성공적인 정자 동결이 가능함이 보고되었으나, 품종뿐만 아니라 계통에 따라 동결정자의 효율성은 상이하다고 알려져 있으며 심지어 돼지의 경우, 같은 계통의 정액이더라도 개체에 따라 융해 후 생존성에 차이가 있음이 보고되어있다.

가축에 있어서 정자를 재 동결하는 방법에 관한 연구는 아직까지 많이 보고된 바가 없으며 주로 성관별에 관한 재동결 연구에 집중되고 있는데, 이는 인공수정에 관한 충분한 수의 정자 공급이 동결정액으로 가능하기 때문에 주요 연구가 수정란 자체에 집중되어 있음이 그 이유라고 판단된다(Hollingshead 등, 2004a; Hollingshead 등, 2004b; de Graaf 등 2007). 그러나, 우수한 종축에 관한 동결정액의 수요는 점차 많아지고 있으며 특히 난소 내 난자 생검기법(Ovum Pick-Up, OPU)이 개발되어 적용됨에 따라 소에 있어서 융해 후 잉여정액의 동결은 중요한 문제임이 틀림없다. 체외수정기법(*in vitro* fertilization, IVF)을 통하여 이식 가능한 배반포를 체외에서 생산하는 효율은 점차

높아지고 있음에 따라, 우수한 정액의 요구도는 높아지고 있다. OPU를 통하여 1두당 채란이 가능한 난자의 수는 5~20개로 개체와 시술시기에 따라 그 차이가 존재하는데 보통 1개의 동결정액에 포함된 유효 정자수는 약 $20\sim 10\times 10^6$ 개가 되지만 IVF에는 난자 1개에 필요한 유효 정자 수는 약 $0.5\sim 2\times 10^4$ 개 정도가 필요하므로 대부분의 정자가 잉여 형태로 버려질 수 있다(Polcz 등, 1998; Bandularatne와 Bongso, 2002). 특히 가축의 개량이 심화될수록 종축 간 근친도는 높아질 수 밖에 없으며, 이것을 해결하기 위하여 바람직하지 못한 인자를 조기에 발견하고 개량의 방향성을 바꾸어야 하는 것이 반드시 필요하다. 이 때에 영구보존된 유전자원은 그 가치를 발휘할 수 있으나 제한된 수량의 동결 정자는 사용 횟수가 제한되어 있을 수 밖에 없고 이용성이 자유롭게 못하기 때문에 정자의 재 동결기술을 적용하여 사용기회를 증대시킬 필요성이 존재한다. 소 정자의 재 동결 기법이 확립되면 우수 종축의 정자를 재활용하여 후대 생산을 위한 수정란생산 효율을 제고할 수 있으므로 본 연구에서는 소의 정자를 재 동결에 필요한 기초자료로서 2가지의 융해방법에 관한 연구를 실시하였으며 재 동결 및 융해 후 정자의 생존성 및 운동성을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

국립축산과학원 가축유전자원센터에서 유전자원으로 보존하고 있는 최소 2두(C006, C12044), 흑우 1두(B013) 및 백한우 2두(W001, W003)의 유전자원축을 동결 보존한 정액과 한우개량사업소의 KPN 757의 총 6두의 동결정액을 본 실험에 사용하였다.

2. 정액채취, 희석 및 동결

가축유전자원센터에서 보유하고 있는 유전 자원축에서 인공질을 사용하여 정액을 채취하였다. 신선 정액은 $32\sim 34^{\circ}\text{C}$ 로 유지하여 15분 안에 실험실로 이동하였으며 상온에서 trilady1 난황희석액으로 1:1 희석방법을 반복하여 원하는 농도로 희석하였다. 스트로 당 정자의 농도를 $80\sim 40\times 10^6$ 이 되도록 희석하고 2~3시간에 걸쳐 $22\sim 27^{\circ}\text{C}$ 에서 5°C 로 저온 중탕법으로 냉각시켰다. 스티로폼을 활용한 간이동결 방법으로 정자를 동결하였으며 액체질소(liquid nitrogen, LN₂) 표면 위 5cm에서 10분간 노출시켜 예비동결을 실시하고 LN₂에 침지시켰다. 1차 동결을 실시하고 2~3개월 후 정자를 5°C 에서 2분간 융해하거나 37°C 에서 40초간 융해하여 2~3ml의 trilady1 난황희석액으로 바로 희석을 실시하였으며 1차 동결과 동일한 방법으로 2시간 동안 5°C 로 냉각하였다. 냉각 후 첫번째 동결과 동일한

간이 동결 방법으로 2차 동결을 실시하였으며 이 때 0.25ml 스트로를 이용하여 정액을 포장하였고 LN₂ 표면 위 6cm에서 7분간 노출하고 LN₂에 침지시켰다.

3. 정액의 성상 검사

정자의 운동성을 관찰하기 위하여 SAIS (MediSupply, Seoul, Korea) 정자자동분석프로그램 (computer assisted sperm analysis, CASA)을 이용하였으며 소 정자의 운동성을 판별하기 위하여 조정된 변수를 사용하였다. 초당 30장의 프레임을 얻었으며 1초간 동영상에서 움직이는 정자의 이동거리와 방향을 계측하였으며 Farrell 등(1988)에 의하여 발표된 논문의 조정치와 동일하게 분석하였다. CASA에 의하여 검사된 정자 운동성에 대한 각 항목은 정자의 농도(total concentration, TC), 운동성 정자의 비율(total motility, TM), 전진성 운동 정자의 비율(progressive motility, PM), 정자두부 운동 경로(호)의 이동속도(curvilinear velocity, VCL), 정자 두부의 직선거리 이동속도(straight-line velocity, VSL), 정자두부의 이동속도 (path velocity, VAP), 정자 두부의 이동에 따른 좌우 진폭 평균 거리 (amplitude of lateral head displacement, ALH), 직진성(linearity, LIN), 정자가 각 방향에 따라 정자이동곡선을 가로지르는 진동수(beat cross frequency, BCF) 및 VCL에 대한 VAP의 비율(Wobble, WOB) 등을 조사하였다.

4. 정자의 형태학적 검사

37℃로 45초간 용해한 정자를 동일한 온도의 PBS(-) 7ml로 800G에서 10분간 원심분리하여 glycerol과 난황을 제거하였다. 용해된 정액을 20~40×10⁶/ml 농도 범위를 조정하고 약 4~6 μl 용량을 가온된 슬라이드 글라스 끝부분에 점적하였다. 이 때, 다른 슬라이드를 경사면에 접촉시켜 천천히 밀어 전체 슬라이드에 도말하였고, Diff Quik 염색 시약(Dade Behring Inc. USA)을 활용하여 염색하였다. 도말된 슬라이드는 37℃로 가온된 슬라이드 건조대에서 공기 중에 노출시켜 건조시켰으며 완전히 건조 후, Diff Quik 고정제에 10~20초 노출하여 고정 후 Eosin 염색 용액과 Thiazin 염색용액에 연속적으로

로 동일한 시간으로 노출시킨 후 증류수에 3~5초 동안 노출하여 과도한 염색 시약을 제거하였다. 염색된 시료는 상온에 보관하였으며 X100 오일 렌즈에서 관찰하였고 형태적 이상을 가진 정자와 정상적인 형태를 가진 정자를 한 시료 당 전체 정자가 200개 이상이 되도록 최소 4군데 이상에서 측정하였다. 균일한 결과가 얻을 수 있도록 혼련된 2명 이상의 연구자가 동일한 시료를 관찰 및 비교하여 균일하고 반복성 있는 실험을 유지하였다.

5. 통계처리

난자의 성숙율, 난황율 및 발생율은 Student's *t*-test로 분석을 실시하였다. *P*값이 0.05보다 낮은 실험군은 대조군에 비하여 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 희소 한우 정액의 성상

희소한우에서 인공질을 이용하여 채취한 정액은 Table 1에서와 보는 바와 같이 약 5~7ml 부피의 사출정액을 얻을 수 있었다. 총 3~5회의 반복 실험을 관찰할 때 실험실로 이송된 정액은 10분후 바로 희석하였으며 동결 전 생존율을 조사할 때 모두 90%이상의 정자가 생존하였으며 기형율은 백한우 (albino line) 1두에서만 26.0%의 기형율을 관찰할 수 있었고 칩소와 흑우 정자기형율은 양호한 수준임을 알 수 있었다. 정액의 부피는 약 5ml에서 7ml 수준으로 큰 변화가 없는 편이었으며 백우 1두는 전기자극으로 채정된 정액을 활용하여 동결정액을 제조하였다. 전기자극으로 정장액이 많이 포함된 부분은 폐기하고 농후한 정액을 1차 동결 실험에 사용하였으며 황소들 간의 동결 직전 정자의 생존성에 있어서 차이는 존재하지 않았다(*P*>0.05).

2. 희소한우 동결정액의 용해 후 생존율

희소한우 동결 정액을 용해하고 생존성을 조사하였을 때,

Table 1. The properties of semen from the rare-breed Korean bulls (Hanwoo).

Name of line (ID number)	Volume of ejaculated semen (ml)	n	Concentration (×10 ⁶ /ml)	Viability (%)	Abnormality (%)
Brindle (C006)	5.5 ± 0.8	5	602.0 ± 46.0	90.2 ± 3.7 ^a	17.6 ± 2.9 ^{ab}
Brindle (C12044)	5.0 ± 0.5	5	871.8 ± 62.1	91.2 ± 5.4 ^a	16.4 ± 3.8 ^{ab}
Black (B013)	7.6 ± 1.1	5	672.0 ± 30.3	90.0 ± 4.2 ^a	17.0 ± 3.7 ^{ab}
White (W001)	2.4 ± 1.0	3	420.3 ± 28.2	95.7 ± 2.5 ^a	13.7 ± 2.5 ^a
White (W004)	5.1 ± 0.7	5	548.0 ± 43.8	89.6 ± 6.1 ^a	26.0 ± 7.0 ^b

With different superscript letters are significantly different (*P*<0.05).

Fig. 1에서와 같이 최소 C006은 $73.4 \pm 5.5\%$, C12044는 $73.0 \pm 4.5\%$ 로 관찰되었으며, 흑우 B013은 $79.6 \pm 3.2\%$, 백우 W001은 $76.7 \pm 4.7\%$, W004는 $82.8 \pm 9.0\%$ 로 양호한 생존율을 관찰할 수 있었다. 동결정액에 관한 법적 기준은 60%이상의 생존율을 보장되어야 하기 때문에 희소한우의 정액은 비교적 우수한 동결정액임을 확인할 수 있었으며 생존율 간 유의적 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$).

3. 37°C에서 40초간 용해 후 재 동결한 희소 한우 정액의 생존성
 희소한우의 정액과 보증씨수소의 정액을 37°C에서 40초간 용해 후 낮은 농도로 다시 희석하여 첫번째 동결방법과 동일하게 재 동결하고, 다시 용해하여 생존율을 검사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 최소 C006의 정자는 $75.1 \pm 4.6\%$ 에서 $35.7 \pm 1.8\%$ 로 낮아졌으며, C12044 개체는 $79.5 \pm 2.2\%$ 에서 $7.9 \pm 5.1\%$ 로, 흑우 B013은 $79.1 \pm 3.2\%$ 에서 $50.2 \pm 4.9\%$, 백우 W001은 $73.7 \pm 4.5\%$ 에서 $34.3 \pm 0.9\%$, W004는 $77.8 \pm 3.0\%$ 에서 $37.9 \pm 4.0\%$ 로 낮아졌으며 이러한 경향은 한우 보증씨 수소 KPN 757에서도 동일한 경향치로 관찰되었고($72.9\% \pm 4.0\%$ 에서 $39.3 \pm 6.6\%$), 동결정액 후 40초간 용해 하여 다시 동결한 정액의 생존성은 모두 유의적으로 낮아짐을 관찰하였다($P < 0.05$).

4. 5°C에서 2분간 용해 후 재 동결한 희소 한우 정액의 생존성
 상기 실험방법과 동일하게 희소한우의 정액과 보증씨수소의 정액을 5°C에서 2분간 용해 후 낮은 농도로 다시 희석하여

첫번째 동결방법과 동일하게 재 동결하고, 다시 용해하여 생존율을 검사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 최소 C006의 정자는 $33.3 \pm 5.8\%$ 에서 $29.9 \pm 6.1\%$ 로 낮아졌으며, C12044 개체는 $32.5 \pm 1.8\%$ 에서 $29.7 \pm 3.6\%$ 로, 흑우 B013은 $54.5 \pm 11.0\%$ 에서 $44.9 \pm 4.4\%$, 백우 W001은 $58.0 \pm 5.3\%$ 에서 $42.4 \pm 6.1\%$, W004는 $66.6 \pm 11.7\%$ 에서 $45.4 \pm 4.7\%$ 로 낮아졌다. 또한 한우 보증씨 수소 KPN 757에서도 $60.4 \pm 8.4\%$ 에서 $46.6 \pm 8.1\%$ 로 낮아졌는데 이는 5°C에서 2분간 용해 후 재동결한 정액에서 그 생존성은 백우와 보증씨수소에서 유의적으로 낮아짐을 확인하였다($P < 0.05$).

5. CASA에 의한 2차 용해 후 한우 정액의 활력도 판정

Table 2에서는 용해온도에 의하여 2차 용해 후 생존한 정자에서 활성도가 우수한 정액의 비율을 관찰하였다. 최소 C006 개체의 재동결에서 37°C 용해군이 활성화 정자가 더 많은 것(26.8% 대 17.5%)으로 관찰되었으나, 최소 C12044 개체에서는 오히려 5°C 용해군이 활성도가 비교적 높았다(1.3% 대 14.3%). 흑우 B013과 백우 W001 및 W004의 경우에는 유의적 차이가 존재하지 않았으며, 보증씨 수소의 경우 37°C 용해군에서 활성화 정자의 비율이 높게 관찰되었다. Table 3에서는 재동결 실험에 대한 결과가 우수한 B013개체에서 각 실험단계별 CASA자료를 관찰하였다. 여기에서 보는 바와 정자의 성상이 1차 용해 후 생존성이 우수할수록 재동결에 관한 동결정액의 재생산이 가능함을 보여주고 있다.

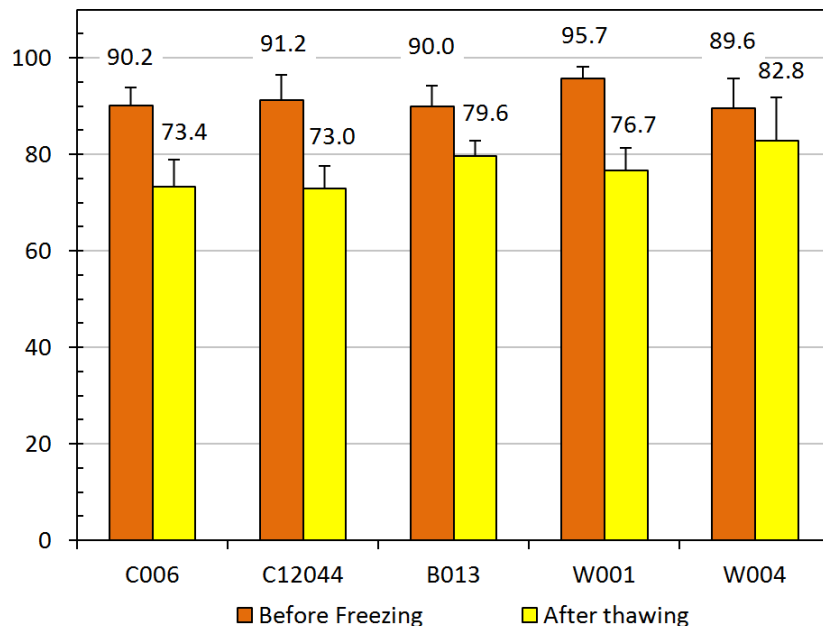


Fig. 1. The viability of spermatozoa from a rare breed hanwoo after thawing 37°C for 40 sec.

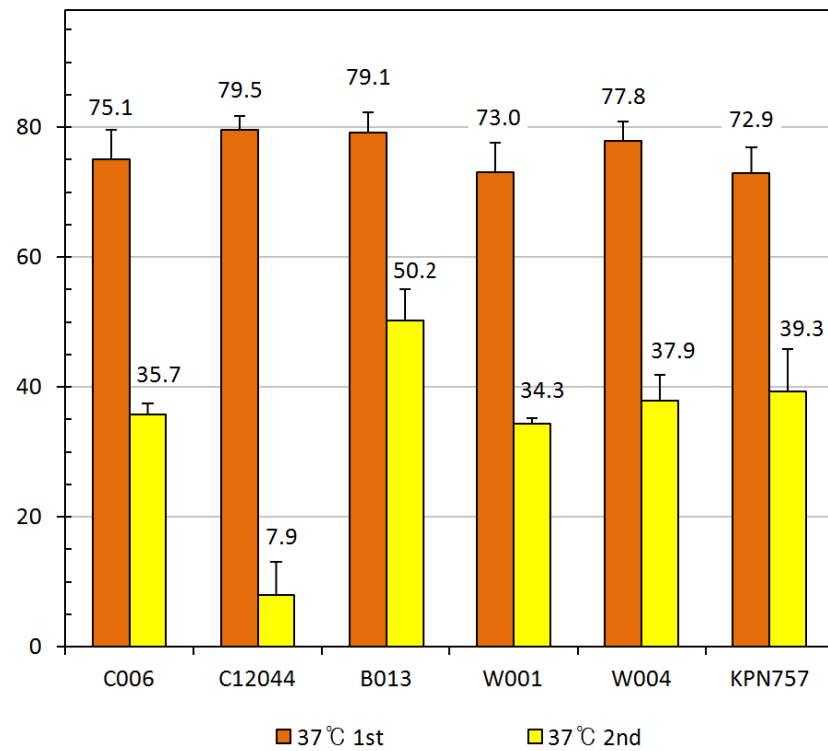


Fig. 2. The effects of 1st thawing at 37°C on the viability of rare breed and Korean Proven Bull spermatozoa from hanwoo after 2nd thawing.

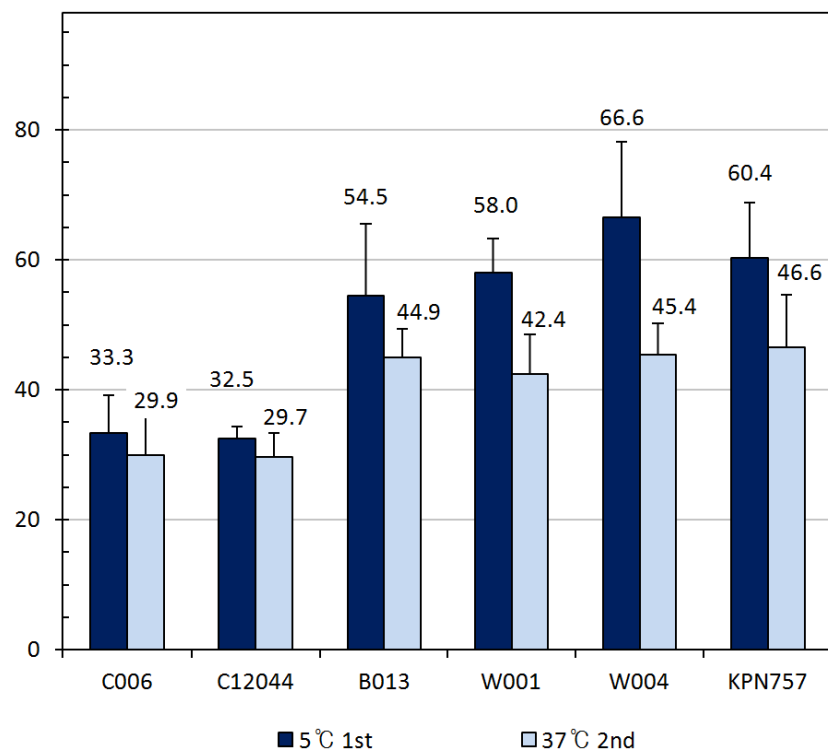


Fig. 3. The effects of 1st thawing at 5°C on the viability of rare breed and Korean Proven Bull spermatozoa from hanwoo after 2nd thawing.

Table 2. The effects of 1st thawing temperature on the rates of hyperactive spermatozoa after 2nd thawing

Name of line (ID number)	First thawing temperature (°C)	% of hyperactive sperm
Brindle (C006)	37	26.8 ± 6.3 ^b
	5	17.5 ± 4.5 ^a
Brindle (C12044)	37	1.3 ± 1.5 ^a
	5	14.3 ± 0.9 ^b
Black (B013)	37	26.3 ± 2.5 ^a
	5	28.5 ± 6.0 ^b
White (W001)	37	20.1 ± 4.3 ^a
	5	25.9 ± 4.0 ^a
White (W004)	37	20.0 ± 3.1 ^a
	5	19.8 ± 1.4 ^a
KPN 757	37	31.7 ± 3.5 ^a
	5	19.5 ± 3.8 ^b

With different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3. The CASA results of refreezing treatment on semen of black B013 bulls

Treatment	MT	PM	VCL	VSL	VAP	ALH	LIN	STR	BCF	WOB
1 st T at 37°C	85.5	57.7	82.3	32.2	57.0	4.4	42.4	56.4	5.7	69.4
Freezing/2 nd T	50.8	26.2	51.7	21.4	37.2	2.9	48.4	57.2	3.3	72.1
1 st T at 5°C	54.3	38.1	55.7	21.1	39.9	3.3	44.8	52.4	4.1	72.4
Freezing/2 nd T	45.9	29.1	46.7	20.3	34.5	2.8	50.6	58.8	3.4	74.0

Abbreviation definitions are followed as MT, motile spermatozoa (%); PM, progressive motility (%; $\geq 80 \mu\text{m}/\text{sec}$ and $\geq 60\%$ STR); VCL, curvilinear velocity ($\mu\text{m}/\text{sec}$); VSL, straight-line velocity ($\mu\text{m}/\text{sec}$); VAP, average path velocity ($\mu\text{m}/\text{sec}$); ALH, amplitude of lateral head displacement (μm), LIN, linearity (%; VSL/VAP); STR, straightness (VSL/VAP); BCF, beat cross frequency (Hz); WOB, wobble (%; VAP/VCL).

고찰

본 연구에서는 유전자원으로 보존되고 있는 동결 정자의 용해조건에 따라 2차 동결에 관한 정자의 생존성과 활력도에 관한 자료를 분석하였다. 동결된 정액 유전자원은 용해와 재동결 과정을 통하여 실험목적에 따라 원하는 정액의 농도와 부피로 재 조정하여 동결 보존할 수 있음을 보여주고 있다. 유전자원으로 영구보존하고 있는 소 동결정액은 재동결 방법으로 유전자원을 재활용할 수 있음을 의미한다. 그러나, Fig. 2에서 보는 바와 같이 정자의 용해방법에 따라 생존율은 상당한 변이를 보인다는 것을 알 수 있으며 1차 용해 후 생존율이 낮은 개체는 재동결 방법으로 정자를 활용할 수 없는 것으로 판단된다. 그러나 6개체 중에서 5개체는 재동결에 의하여 활력이 우수한 정자를 얻을 수 있었으며 이는 1차 용해의 생존율이 우수하더라도 최소 C12044와 같이 2차 용해 후 생존율과 활력도는 낮게 나타날 수 있다는 것을 보여주고 있다. 특

히, 37°C에서 용해하고 동일한 희석액으로 희석한 후 재 동결한 정액에서 비교적 높은 생존성을 얻을 수 있었으며 (23~60%), 이는 5°C에서 용해한 실험군(29.7~ 46.6%) 보다 생존율의 차이가 넓은 것을 알 수 있다. 그럼에도 불구하고 5°C에 용해한 2차 동결 정액의 활력도는 37°C에 비하여 낮게 관찰되는 경우가 더 많이 관찰되는 것으로 보아 5°C에서 1차 용해를 실시하는 방법보다 37°C에서 1차 용해를 실시하는 방법이 더욱 유리하다는 것을 예측할 수 있다. 그러나, 37°C에서 1차 용해를 실시하는 방법으로 생존정자를 얻지 못하는 경우에 5°C에서 1차 용해를 실시하고 동결하는 방법은 다른 동결 방법으로 이용할 수 있음을 관찰하였다.

보증씨 수소(KPN) 동결정액의 경우, 스트로 당 총 정자의 수는 $20\sim 30 \times 10^6$ 개 수준으로 10×10^6 개 이상의 유효 정자가 보 증되어 있어야 인공수정에 활용될 수 있다. 체외수정에 동결 정액을 이용할 때 1개의 난자에 필요한 총 유효 정자수가 2×10^4 개로 계산하면, 동결정액 1개를 용해하여 체외 수정에

활용될 수 있는 난자는 이론적으로 약 500개라고 계산할 수 있다. 그러나 동결 및 융해된 정자의 처리과정에서 발생하는 정자의 회수율과 사망률 증가에 따라 약 100개에서 250개의 난자를 수정시킬 수 있다고 보여진다. 이는 IVF에서는 사용될 수 있는 정자는 적절하게 처리될 때, 정자의 양은 작아도 상관없이 AI에 비하여 높은 농도($75\sim 100\times 10^6/\text{ml}$ vs $15\sim 30\times 10^6/\text{ml}$)의 정액이 필요하다고 알려져 있다(Parish 등, 2014). 그러므로 1개의 난자를 체외수정시키는데 필요한 정자의 수는 인공수정에 비하여 훨씬 낮으며, OPU기법이나 동결된 난자를 융해하여 적은 수의 난자를 활용할 경우, 우수한 종축이나 유전자원의 동결정액을 재 동결하여 이용하는 것이 유전자원을 활용하는 방법으로 효율적이라는 것을 추정할 수 있다. 그러나, 본 연구에서 이용된 한우 정액의 재 동결 연구 결과는 생존율이 최대 79.5%에서 7.9%로 낮아지는 경우도 관찰되었으며 79.1에서 50.2%로 저하되는 경우도 관찰되었다. 이러한 결과는 사람의 재동결 연구에 비하여 성적이 낮다고 판단되나 2차 동결 정액으로 체외수정에 응용이 가능하다는 것을 보여주고 있다. 소의 성관별에 관한 재 동결 연구 결과(Underwood 등, 2009)에 따르면, 소의 성관별 정액 활용성을 높이기 위하여 재 동결을 실시하였으며 유의적으로 낮은 수준의 정자생존율, 운동성이 보고되었으며 acrosome의 반응도는 변화가 없었다고 보고되었다. 여기에서 2차 동결 후 생존율은 약 80%에서 55%로 감소하였으며 활성화된 정자의 비율은 약 48%에서 32%로 감소하였다. 이는 본 연구의 성적과 같이 생존율과 활성화 정자의 비율은 감소하는 결과와 동일하다고 판단된다.

최소한우의 경우, 5℃에서 융해한 동결정액은 생존율과 활력도가 상대적으로 저하되는 것을 알 수 있었으며 생존율은 최대 66.6%에서 45.4%로 낮아졌으며 최소 32.5%에서 29.7%로 낮아지는 것을 확인하였다. 그러므로 37℃에서 융해한 정액을 2차 동결할 때 그 생존율이 급격히 떨어지는 경우에는 5℃에 융해하는 방법으로 동결하는 것이 유리할 수 있음을 보여주고 있다. 또한, 37℃에서 1차 융해의 생존성이 우수한 동결정액에서 2차 동결 생존성이 높아지는 경향을 관찰하였으나, 5℃ 융해 방법은 그 번이가 오히려 적다는 현상을 관찰하였다. 또한 활성화 정자의 비율 또한 개체에 따라 서로 다른 반응도를 보여주었으며, 보증씨 수소 KPN 757의 경우 5℃ 융해 방법이 불리하다는 증거를 관찰하였다. 백우와 흑우의 경우, 정액의 재동결 후 활성화 정자의 비율에 관한 차이가 없었으나, 오히려 생존율의 정자비율이 5℃에서 융해한 동결정액에서 높게 관찰되었기에 재동결에 있어 5℃ 융해 방법이 유리할 수 있다는 보여주었다. 이러한 결과는 재동결에 관한 정액의 반응도가 개체에 따라 서로 다를 수 있다는 것을 보여주고 있으나, 생존율에 관한 번이가 계통에 따른 차이라고 판

단할 수 있는 자료를 축적하지는 못하였다. 특히, 재동결에 관한 개체간 번이가 높게 관찰되는 것으로 보아 아직 사람의 정액과 같이 연속적인 동결 방법을 적용할 수 없는 것으로 추측되며 추후 연구를 통하여 번이를 낮출 수 있는 연구가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

유전자원을 동결 보존하는 것은 유전적인 개량과 우수한 종축의 재생산 및 멸종 위기종의 유전자 집단을 보존하는데 있어 중요한 방법으로 알려져 있다. 그러나 동결 유전자원의 대표적인 정액은 살아 있는 종축에서 채취하여 보존하고 있는데 동결자원은 그 수가 제한되어 있어 이용에 한계가 존재하고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 본 연구에서는 동결정액을 2가지 방법으로 융해하고 재 동결을 실시하여 그 정자의 특성을 CASA로 분석하고 생존성을 비교하였다. 일반적으로 사람의 정액은 재동결 과정을 극복하여 반복적인 동결 및 융해가 가능하다고 보고되었으나 한우 정액에 관한 재 동결 성적에 관한 연구는 자료가 찾아보기 힘들다. 본 연구에서는 최소 2두, 흑우 1두, 백한우 2두 및 보증씨수소 1두의 동결정액을 이용하여 재 동결에 관한 연구를 실시하였으며 개체에 따라 29.7%에서 46.6%의 생존율을 얻었다. 2차 동결 방법에 있어서 생존율은 5℃에서 융해하는 방법이 37℃ 융해방법보다 더 높으며 번이가 낮은 것으로 관찰되었다. 그럼에도 불구하고 2가지 방법에 의한 재동결 기법은 체외 수정이나 OPU 유래 수정란 생산을 위하여 한우의 증식에 적용할 수 있을 것으로 보이며 추후 수정란 생산에 관한 연구에 도움이 될 것으로 판단된다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 2016년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 정액의 성조절 기술개발을 통한 최소한우의 조기증식 세부과제 번호: PJ010967012016)과 2016년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정지원사업에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- Bandularatne E and Bongso A. 2002. Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. *J. Androl.* 23:242-249.

- Bratton RW, Foote RH and Cruthers JC. 1955. Preliminary Fertility Results with Frozen Bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 38:40-46.
- Bratton RW, Flood JC, Foote RH, Wearden S and Dunn HO. 1957. Fertility of Bovine Spermatozoa Stored at Minus 79°C for One Week and for Seventeen Weeks. *J. Dairy Sci.* 40:154-162.
- de Graaf SP, Evans G, Maxwell WMC, Cran DG and O'Brien JK. 2007. Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 67:391-398.
- Evans G and Maxwell WMC. 1987. Frozen storage of semen. In *Salamon's Artificial Insemination of sheep and goat*. Butterworths, Wellington, pp. 122-141.
- Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC and Foote RH. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49:871-879.
- Ghasemian F, Faraji R, Mohammadi Sordoo M and Bahadori MH. 2012. Evaluation of serial thawing-refreezing on human spermatozoa resistance using cryovials and straws. *Int. J. Fertil. Steril.* 6:157-164
- Hollinshead FK, Evans G, Evans KM, Catt SL, Maxwell WMC and O'Brien JK. 2004a. Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction* 127:557-568.
- Hollinshead FK, O'Brien JK, Maxwell WMC and Evans G. 2004b. Assessment of *in vitro* sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. *Theriogenology* 62:958-968.
- Johnston LA and Lacy RC. 1995. Genome resource banking for species conservation: selection of sperm donors. *Cryobiology* 32:68-77.
- Parrish JJ. 2014. Bovine *in vitro* fertilization: In vitro oocytes maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* 81:67-73 (Review).
- Polcz TE, Stronk J, Xiong C, Jones EE, Olive DL and Huszar G. 1998. Optimal utilization of cryopreserved human semen for assisted reproduction: recovery and maintenance of sperm motility and viability. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15:504-512.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666-676.
- Rofeim O, Brown TA and Gilber BR. 2001. Effects of serial thaw-refreeze cycles on human sperm motility and viability. *Fertil. Steril.* 75:1242-1243.
- Sexton TJ. 1973. Effects of various cryoprotectants on the viability and reproductive efficiency of chicken spermatozoa. *Poultry Sci.* 52:1353-1357.
- Tomlinson M and Barret C. 1999. Cryo-survival of spermatozoa. *Human Reprod.* 14:2925 (Abstract).
- Underwood SL, Bathgate R, Maxwell WMC and Evans C. 2009. *In vitro* characteristics of frozen-thawed, sex-sorted bull sperm after refreezing or incubation at 15 or 35°C. *Theriogenology* 72:1001-1008.
- Verza Jr S, Feijo CM and Esteves SC. 2009. Resistance of human spermatozoa to cryoinjury in repeated cycles of thaw-refreezing. *Int. Braz. J Urol.* 35:581-591.
- Wildt DE, Rall WF, Critser JK, Monfort SL and Seal US. 1997. Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation. *Bioscience* 47:689-698.

Received November 06 2016, Revised November 22, 2016,
Accepted December 27, 2016