

Triladyl-난황 희석제가 한국 재래 흑염소의 정소상체 및 전기자극 유래 정자의 응해 후 생존성에 미치는 영향

김성우[†], 이진욱, 김관우, 김찬란, 전익수, 이성수
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터

Effects of Triladyl-egg Yolk Diluents on the Viability of Frozen Korean Black-goat Spermatozoa from Cauda Epididymis and Electro-ejaculated Semen

Sung Woo Kim[†], Jinwook Lee, Kwan-woo Kim, Chan-Lan Kim, Ik Soo Jeon and Sung-soo Lee

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

ABSTRACT

To preserve genetic materials, cryopreservation of the semen from live animals is the main technique to establish cryo-banking system which could be used for artificial insemination and embryo transfer. However, the population of Korean black goat (KBG) becomes to dwindle in number and is now faced genetic erosion by crossbreeding with non-native breeds in small KBG farms. In this study, simple freezing method was used to preserve frozen semen from KBG using spermatozoa of cauda epididymis (CE) and electro-stimulated semen (ES). The negative effects of seminal plasma on fresh sperm was confirmed using precipitation test of Triladyl egg yolk diluent and sperm viability after thawing was compared between CE and ES spermatozoa. When seminal plasma of fresh ES semen was washed with semen washing media (SWM), the rates of live sperm shown no significant difference between CE and ES spermatozoa before freezing. However, the survival rate of frozen/thawed CE sperm was higher than ES (74.6±10.6% vs 53.8±5.2%) with significant difference ($p < 0.05$). The results of longevity test on frozen/thawed sperm from CE showed healthier sperm than ES. Therefore, spermatozoa from CE could be used for cryo-banking system in KBG lines. The more studies are needed to increase survival rate of ES semen.

(Key words: Korean black goat, Cauda epididymis, Semen, Electro-ejaculation)

서론

한국 재래 산양의 정자를 동결하여 보존하는 것은 가축유전 자원을 보존하는 목적 이외에 흑염소의 개량과 염소의 산업적 이용성을 증진시키기 위하여 매우 중요하다고 할 수 있으나, 흑염소 정자의 동결 보존에 관한 자료는 많지 않다고 판단된다. 포유류 정자의 동결 보존에 있어서 중요한 요인은 정액의 채취 방법, 정자의 냉각 보존, 동결 및 응해 과정에 있어서 정자의 생리적 상태에 있다고 판단되며 이러한 조건은 축 종에 따라 특이성이 존재하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 포유류의 정자는 사출됨과 동시에 정장의 활성 인자에 의하여 운동성을 회복하며 채취된 정액은 축종에 적합한 희석액으로 혼합되어 인공수정에 필요한 적절한 농도로 조정된다 (Slavador 등, 2007). 그러나 염소를 포함하여 돼지, 양, 말 및 소에 있어서 정장 성분은 정자의 보존성 증진에 도움이 되지 않는 것으로

보고되었으며 그 원인은 정자의 미토콘드리아 대사를 촉진하여 일시적인 활력도 증가를 유도하고 산화적 스트레스를 유도하여 막 안정성을 파괴하는 것으로 알려져 있다(Dott, 1974; Bass 등, 1983; Clavete 등, 1995; Gil 등, 2000; Menard 등, 2003). 산업적 목적에 따라 정자는 동결 보존을 하거나 생존성을 최대한 유지하며 유통할 필요가 있는데 일반적으로 저온으로 천천히 낮추게 되어 정자의 대사를 낮추어 생존성을 증진시킬 수 있다. 이러한 과정에서, 정자는 희석 충격을 받게 되며 동시에 동결되기 전 냉각 과정에서 온도 저하에 의하여 저온 충격(cold shock)을 받는 것으로 판단된다. 저온 충격에 의하여 정자는 세포막의 변화, 이온의 소실 및 생리적 안정성이 떨어지는 것으로 보고되었다(Darin-Bennett와 White, 1977; Fisher와 Fairfull, 1986; Graham과 Foote 1987; Simpson 등 1987; White 1993). 저온 충격 또한 축종 별로 매우 다양하게 나타나며 닭의 경우 사출 직후에도 냉각 과정 없이 정액을 4~5°C에

[†] Correspondence: Sung Woo Kim, Ph.D.

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

E-mail: sungwoo@korea.kr

노출하여도 생존성에 큰 영향을 끼치지 않으나(Parks와 Lynch, 1992), 돼지의 정자는 생존성이 매우 떨어지는 것으로 알려졌다(Benson 등, 1967). 사출된 정액은 농도가 매우 높으며 희석제를 이용하여 사용에 적절한 정자 농도로 희석하여 냉각하게 되는데 이때 포유류의 경우, 단백질원으로서 난황을 주로 사용하며 이는 저온 충격을 방지하는 효과가 존재한다.

염소의 경우, 정장 성분과 난황의 상호 작용에 의하여 정자의 생존성은 극도로 저하되는 것으로 알려져 있으며 이러한 현상은 소, 돼지 및 심지어 양과 같은 가축에서는 관찰할 수 없는 것으로 보고 되었다(Roy, 1957; Iritani and Nishikawa, 1963). 그 원인은 염소 정장 내에 존재하는 PLA2 효소에 의하여 난황 지질이 대사되기 때문인 것으로 보고되었다(Nunes 등, 1982; Pellicer-Rubio 등, 1997; Leboeuf 등, 2000). 이 효소는 난황의 lecithin을 가수분해하여 지방산과 lysolecithin으로 전변시키는데 정자 두부의 이중막 구조를 자극하여 침체반응을 쉽게 유도시키는 것으로 보고되었으며(Iritani and Nishikawa, 1963), 정자의 핵을 팽화시켜 정자의 안정성을 파괴하고 결국 정자를 죽게 만든다(Aamdal 등, 1965; Sawyer and Brown, 1995). 그러므로, 염소 동결 유전 자원을 생산하고 영구 보존하기 위하여 정액에서 PLA2 단백질을 제거하는 것이 필요하다고 판단되었으며 전기 자극에 의하여 사출된 정액은 정자의 농도가 농후하므로 이러한 정장 성분이 매우 낮을 것으로 추정되었다. 흑염소의 경우, 외래종에 비하여 체중이 적으며, 외부 생식기의 크기가 작은 경우가 빈번하여 적절한 크기의 인공질을 확보하기가 쉽지 않으므로 전기자극 방법이 더 효율적일 것으로 판단하였다. 수컷을 거세하여 회수한 정소에서 정소상체유래 정자를 회수할 경우, 이론적으로 정장 성분이 존재하지 않기 때문에 동결 유전 자원으로 보존하는 효율성이 높을 것으로 판단되었다. 그러므로, 본 연구에서는 반추류 중 소 정액 동결보존을 위하여 가장 쉽게 확보할 수 있는 Triladyl 희석액의 이용성을 흑염소의 정소상체 유래 정자와 전기자극 유래 정자를 이용하여 생존성을 검토하였다. 특히 염소 정장액의 독성 검사를 실시하였으며 정장액을 제거한 정액의 동결 후 생존성을 조사하였다. 동결된 흑염소 정자의 강건성을 판단하기 위하여 용해 후 트릴라딜난황 희석액에서 장수성을 조사하였고 이러한 기본 자료는 한국재래흑염소의 유전자원 보존에 도움이 될 것으로 판단하였다.

재료 및 방법

1. 정액 희석액

기본 희석제로 사용된 정액 희석액은 Mini tube사에서 구매한 Triladyl을 사용하였으며 배양액 및 희석액 제조에 사용된

시약은 Sigma-Aldrich사 제품을 이용하였다. 또한, 특별히 언급되지 않은 세포 배양 관련 일회용품은 BD Falcon사의 제품을 사용하였다. 글리세롤이 함유되지 않은 기본 배양액(Triladyl/G-)은 Triladyl의 기본 조성을 세포 배양용 물로 직접 제조하였으며 100 ml 기준으로 Tris 2.42 g, citric acid 1.48 g 및 fructose 1.0 g이 용해되도록 준비하였다. 원정액에 의하여 오염될 수 있는 미생물을 억제하기 위하여 gentamicin sulfate가 25 µg/ml 함유되도록 조정하였다. 전기자극으로 얻은 정액은 정장 단백질을 제거하기 위하여 정장제거용배양액(semem washing media, SWM)을 제조하였으며 조성은 NaCl 130 mM, KCl 5.1 mM, Glucose 10.54 mM, KH₂PO₄ 1.19 mM Na₂HPO₄ 9.86 mM, MgSO₄·7H₂O 1.47 mM, CaCl₂·2H₂O 0.93mM 으로 Salmon 등(2017)이 보고한 조성으로 제조하였으며 용액의 산도는 7.4, 삼투압은 290 mOsmol로 조사되었다.

2. 정액의 채취와 희석

흑염소는 근교계로서 가축유전자원센터에서 유전자원으로 선정된 재래종 계통을 선정하였고, 총 10두의 수컷에서 전기 자극법에 의하여 농후한 정자를 얻었으며 당진 계통 3두, 통영 계통 4두 및 장수 계통 3두를 이용하였다. 전기 자극을 유도하기 위하여 직장으로 3~4 V 직류를 4~5초간 2~3회 통전시키고 연이어 6~7 V 직류를 5~7회 통전시켜 외부 생식기에서 흘러나오는 정액을 비닐 꼬깔을 이용하여 15ml 원심분리관으로 회수하였다. 여기에 사용된 펄스형 전류는 HeatWatch사(Iowa, USA)에서 제조된 운동성 억제용 전류발생기(RAU immobilizer, model number IM2000)를 이용하였다. 항문으로 삽입된 통전관의 등쪽 부위는 절연 테이프를 접착하여 전류 흐름을 복부 쪽으로 유도되도록 조절하였다. 전기 자극에 의해 채취된 정자는 15분 이내에 실험실로 이송하고 채취된 정액의 20배 부피의 SWM로 천천히 희석하여 500 g에서 15분간 원심 분리하여 정장액을 제거하였다(Salmon 등, 2017).

4~6개월령의 수컷에서 외과적 수술 방법으로 정소를 적출하였으며 정소를 PBS로 적신 거즈로 밀착하여 혈액을 최대한 제거하였다. 외과적으로 제거된 정소는 30분내로 실험실로 이송하였으며 정소의 혈관을 멸균 처리된 거즈, 미세가위(Solco medical Korea, 004-0801)와 외과용 칼(Feather safety razor Co., No 3-11, Japan)을 이용하여 정소상체에서 분리하였고 혈관이 제거된 정소상체만을 PBS에 적신 거즈 위에 옮겼다. 충분히 혈액이 제거하고 분리된 정소상체를 엄지와 검지 손가락으로 밀착하여 정소상체의 곡세정관을 압박하였다. 분리된 정소상체에서 모세 혈관을 메스로 절개하여 PBS를 적신 거즈로 혈액을 흡수시켜 제거한 뒤 곡세정관을 절개하였으며 압박되어 나온 농후 정자를 수술용 칼 등 부위로 회수하였다. 50ml 원심분리관에서 약 200 µl triladyl-난황 희석액을

수술용 칼 위에 점적하여 정소상체유래 정자를 희석하였고 가볍게 손가락으로 쳐서 천천히 혼합하였다. Triladyl-난황 희석액으로 정자의 농도는 $200\sim 300\times 10^6/\text{ml}$ 농도로 조정하였고 희석 중간에 희석 정액 10 μl 에 멸균수 90 μl 를 혼합하여 운동성을 제거하고 Makler counting chamber를 이용하여 정확한 농도를 측정하였다.

3. 정자의 냉각, 동결 및 용해

원하는 농도로 희석이 완료된 정액은 50ml conical tube로 옮기고 parafilm으로 밀봉한 후 25°C 물을 채운 500ml 용기로 다시 이송하였다. 30(너비) \times 26(길이) \times 15(높이)cm 크기의 아이스박스에 증탕용 용기를 넣고 실험용 얼음(slurry ice)을 채워 2~3시간에 걸쳐 5°C로 냉각하였다. 냉각이 완료된 희석정액을 저온정액처리장치 (FHK, Japan)에서 0.5ml 또는 0.25ml 스트로에 충전하였으며 약 20~30분간 노출하였다. 간이 동결법을 활용하였으며 내부의 수치가 26(너비) \times 45.7(길이) \times 22.3(높이) cm 크기의 스티로폼 박스에 액체질소(LN₂) 약 5cm 깊이로 부어 5분간 정치 시켰다. 0.5ml 스트로는 질소표면 위 5cm에서 10분간 노출하였고 0.25ml 스트로는 질소표면 위 8~9cm 위에서 10분간 노출한 후, LN₂에 침지시켜 동결정액을 제조하였다. 동결이 완료된 정액은 스티로폼 37°C 에서 45초간 용해하였다.

4. 정자의 생존성 및 장수성 검사

용해된 염소정액은 동결 정액을 calcium과 magnesium이 없는 PBS 6 ml로 500 G 원심력에서 15분 간 원심 분리하여 글리세롤과 난황을 제거하였으며 Triladyl/G- 희석액을 이용하여 희석하였다. $50\sim 60\times 10^6/\text{ml}$ 농도로 희석하고 17°C 저온배양기(MyClone, Hanil Science Medical, Korea)에서 보존하였다. 배양 후 5분, 60분 및 120분에 시료를 꺼내어 37°C

가온플레이트에서 1~2분간 배양 후, Makler counting chamber를 이용하여 10배 phase contrast 대물렌즈를 장착한 현미경(Olympus IX71, Japan)에서 디지털 카메라로 (DP20, Olympus Japan)으로 정자의 운동성을 디지털 동영상으로 촬영하고 1초간 움직이는 정자를 영상 분석하여 정자의 생존성과 장수성을 분석하였다.

5. 통계 자료 분석

각 실험은 3~5회 반복 실시하였으며, 정자의 생존율에 대한 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 실시하였다. *p* 값이 0.05보다 낮은 실험군은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 전기자극 유래 정액과 정소상체 유래 정자의 성상 비교
가축유전자원센터에서 근교계로 보존하고 있는 흑염소 종축에서 전기자극으로 채취된 정액과 성숙시기에 도달한 개체를 거세하여 정소를 회수하고 재료 및 방법에서 상술한 방법으로 정소상체에서 채취한 정액의 기본 자료를 조사하였다. Table 1에서는 흑염소 당진, 통영 및 장수 계통에서 전기자극으로 얻은 정자는 $503\sim 2445\times 10^6/\text{ml}$ 의 농도로 채정할 수 있었으며 정액의 부피 또한 0.5~2.8ml로 다양하게 나타나는 것으로 관찰되었다. 이러한 차이는 계통에 따른 것이 아니라 전기자극에 따른 개체 반응도가 서로 다르게 나타나는 것으로 판단하였다. 전기자극에 의하여 채정한 정자의 운동성을 실험실로 이송하여 조사하면 전기자극의 경우 79.6~93.8%로 관찰되었으며 정소상체 유래 정자는 92.3~95.4%로 관찰되었다.

Table 1. The semen properties of electrostimulated or epididymal sperm of Korean black goat.

Sources of semen	Line	Semen Volume (ml)	Sperm concentration of Semen ($\times 10^6$ 개/ml)	Motile sperm (%)
Electro	Dangjin	0.7	2445.7	92.7
	Tongyoung	0.5	1088.0	93.8
	Jangsu	2.8	503.1	79.6
Epididymal	Dangjin			92.3
	Tongyoung	NA	NA	95.4
	Jangsu			94.3

As explained in materials and methods, electro-stimulated semen was expressed as "Electro" and cut and squeezed semen from epididymus was depicted as "Epididymal". The exact data of semen volume and concentration in epididymal concentrated spermatozoa could not be obtainable, so was marked as "NA". The effluent sperm concentrate was diluted just after extraction process with surgical scalpel.

2. 전기자극 유래 정액과 Triladyl 난황 희석제의 반응도 조사
 전기자극으로 채취된 정액을 15분 이내에 실험실로 옮겨 원정액 10 μ l 에 Triladyl 난황 희석액을 90 μ l 투입하고 17°C 에서 2시간 반응하여 생존성 및 희석액의 상태를 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 난황이 포함된 Triladyl 특유의 반투명한 노란색(NP)이 일부 우유 빛깔의 연노랑색으로 변화하며 침전되는 현상(P)을 관찰할 수 있었다. 이는 난황 성분이 정자와 반응하여 응고되며 이를 현미경으로 관찰하였을 때, 난황 희석액의 유동성이 없어지며 정자는 죽은 형태로 존재함을 알 수 있었다. Table 2서 살펴 보는 것과 같이 총 17번 전기자극 정액 채취를 시도하면 흑염소에서 82.4%의 성공율로 정액을 얻었을 수 있었으며 전기자극유래 정액을 Triladyl

난황희석액에 반응시 약 42.9%가 응고하는 현상을 관찰할 수 있었다.

3. Triladyl egg yolk 희석제가 염소 정액의 동결에 미치는 영향
 전기자극으로 채취된 정액은 15분 이내에 실험실로 옮겨 SWM로 세정하였으며 정소상체 유래 정자는 바로 Triladyl 난황으로 희석하여 동결 보존을 실시하였다. Table 3에서 보는 바와 같이, 세정후 전기자극에 의하여 채취된 정자는 96.7 \pm 2.1%가 운동성을 보유하고 있었으며 정소상체 유래 정자는 92.7 \pm 4.3%가 운동성을 보유하고 있었다. 간이 동결법으로 동결된 정자를 용해 하였을 때, 정자의 생존율은 전기자극 유래 정자는 53.8 \pm 5.2%가 운동성을 보유하고 있었으며 정소

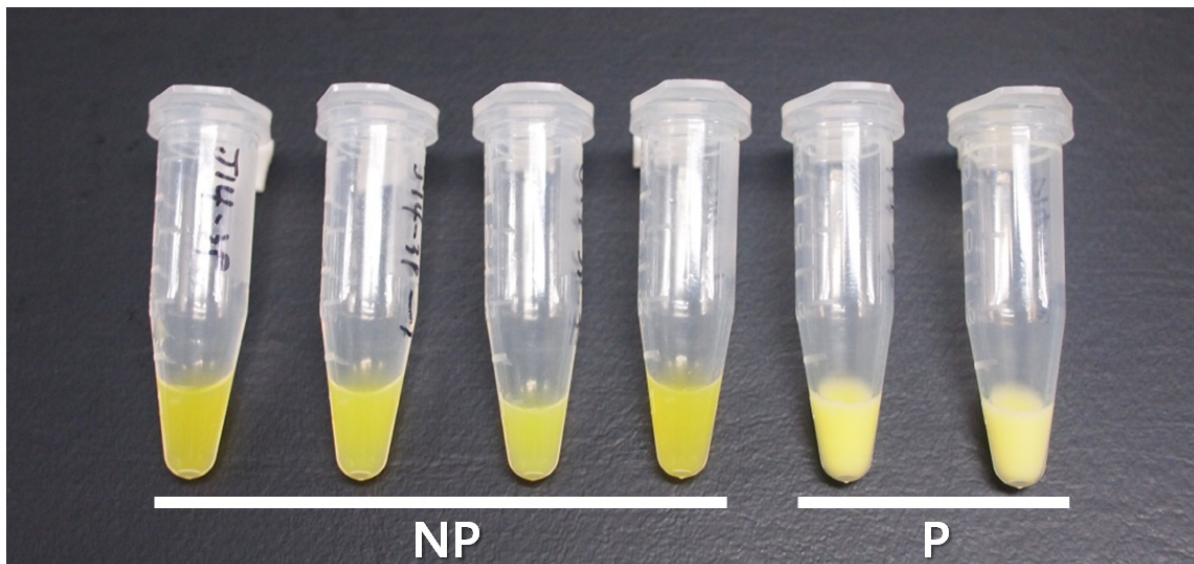


Figure 1. Precipitation test of diluted goat semen with triladyl egg yolk diluents

The different goat semen was ejaculated by electro stimulation and mixed with triladyl-egg yolk diluents. The clotted semen (P) which have whitish-yellow color contained only 1~3% of motile sperm within 2 h of incubation at 17 °C. However, non-clotted semen (NP) which have yellow color showed 45~65% of motile sperm (data not shown).

Table 2. Effects of Korean black goat semen on the aggregation of Triladyl egg yolk diluents

Trials	Number of goat	Number success of electro-ejaculation (%)	Number of precipitated semen (%)
1	4	3 (75)	0 (0)
2	2	2 (100)	2 (100)
3	3	2 (66.7)	1 (50)
4	3	3 (100)	1 (33.3)
5	5	4 (80)	2 (50)
Total	17	14 (82.4)	6 (42.9)

10 different goats were used for electro ejaculation experiment. The rate of aggregation was judged by naked eyes with difference yellow and whitish-yellow color after 2 h of incubation at 17 °C same as in figure 1.

Table 3. The viability of frozen/thawed KBG spermatozoa from different sources.

Sources of semen	n	% of Motile spermatozoa	
		After dilution	After thawing
Electro *	5	96.7 ± 2.1 ^a	53.8 ± 5.2 ^a
Epididymal	5	92.7 ± 4.3 ^a	74.6 ± 10.6 ^b

* The electro-ejaculated semen was washed with SWM for cryopreservation as explained in materials and methods. Different superscripts within the same column are significantly different ($p < 0.05$). The “n” means replicate numbers.

상체 유래의 정자는 74.6±10.6%가 운동성을 보유하고 있어 유의적인 차이가 존재하였다($p < 0.05$).

4. 응해 정자의 장수성

응해된 정자의 장수성을 조사하기 위하여 난황과 글리세롤을 원심분리로 제거하고 Triladyl/G-희석액으로 재 부유시켰다. Table 4에서 보는 바와 같이, 17°C 저온배양기에서 5분, 60분 및 120분 보존하였을 때, 살아 있는 정자의 비율은 전기 자극으로 채취된 정액의 경우 50.3±8.7, 36.8±15.9 및 29.5±11.3 %로 관찰되었으며, 정소상체 유래 정자의 경우 76.2±7.0, 63.1±10.6 및 52.4 ± 17.8 %로 관찰되었다. 정자의 장수성 또한 정소상체에서 채취한 정자가 전기자극 유래 정자보다 모두 우수한 것으로 판단되었다 ($p < 0.05$).

고 찰

포유류 정액의 희석과 동결 보존을 위하여 난황과 글리세롤은 가장 흔하게 이용되는 물질로 알려졌다. 난황은 정자의 희석과정에서 나타날수 있는 희석 충격을 방지하며, 특히 정자의 막의 변화를 유도하여 보존을 위하여 저온으로 온도를 낮출 때 나타나는 저온 충격을 방지한다고 알려져 있다(Quinn 등, 1980). 또한, 난황은 동결전 정자 두부의 침체 반응을 저하시켜 안정화를 유도하는 것으로 알려져 있어 동결보존에 매우 중요한 역할을 한다(Witte 등, 2009).

난황의 주요 기능은 인지질과 저농도지방구(low density liposome, LDL)의 기능으로 추정되고 있는데 전자의 경우 저온 처리 과정 동안 정자의 막성분에서 이탈할 수 있는 지질과

콜레스테롤을 보충하여 정자의 막 안정성을 유도한다고 보고되었다(Kampschmidt 등, 1952; Quinn과 White, 1965; Pace와 Graham, 1974; Manjunath 등, 2002). 그럼에도 불구하고, 염소의 정액은 다른 가축과 다르게 정액사출과정에서 요도구선(bulbourethral gland)에 분비하는 지질분해효소(lipase)가 존재한다는 것이 알려졌으며 이는 정자 생존성과 동결 보존성을 낮추는 주요 원인으로 보고되었다(Aamdal 등, 1965; Iritani와 Nishikawa, 1963; Leboeuf 등 2000).

염소의 정자 동결 정액에 관한 생존성에 관한 자료는 산업적으로 이용 가능한 수준인 60%~70% 이상의 생존성을 보여주는 실험 방법이 많이 없으며 이러한 성적은 인지질분해효소(phospholipase)에 의한 정자의 활력도 및 막성분의 변화가 동결 보존에 있어 반복성을 떨어트리며 변이를 높이는 주요 원인으로 판단된다. 본 연구에서도 표 2에서 언급된 바와 같이 10마리의 염소에서 전기자극을 이용하여 정액을 채취하였을 때, 42.8%가 응고되는 현상을 관찰하였으며 여기에서는 생존 정자가 존재하지 않거나 극도로 낮은 수준(1~3%)으로 존재함을 알 수 있었다(미 발표자료). 일반적으로 추정하기로 전기 자극에 의한 정액 채취 방법은 농후한 정자 성분만을 얻을 수 있어 정장액에 노출되지 않을 것으로 추정되나, 본 연구 결과에 따르면 10배 희석 후 저온 보존에 의하여 응고되는 것으로 보아 전기 자극에 의한 정액 또한 문제점이 상존하고 있음을 알 수 있었다. 또한 동일한 개체에서 전기자극으로 채취한 정액간에도 응고 효과가 서로 다른 것으로 추정된다. 그러므로, 염소 정액의 난황 분해 현상은 개체에 따라 반응도가 다른 것이 아니라 전기자극에 따른 요도구선에 분비되는 효소의 함유량이 정장 성분에 서로 다르게 나타난다는 것을 추정할 수 있었다. 또한, 이러한 효과는 난황을 기반으로 제조된

Table 4. The effect of triladyl (-G) diluent on the longevity of frozen/thawed Korean black goat spermatozoa

Sources of semen	n	% of Motile spermatozoa after incubation at 17 °C (min)		
		5	60	120
Electro *	3	50.3 ± 8.7 ^a	36.8 ± 15.9 ^a	29.5 ± 11.3 ^a
Epididymal	3	76.2 ± 7.0 ^b	63.1 ± 10.6 ^b	52.4 ± 17.8 ^b

* The electro-ejaculated semen was washed with SWM before dilution as explained in materials and methods. Different superscripts within the same column are significantly different ($p < 0.05$). The “n” means replicate numbers.

희석액에 국한된 것이 아니며 탈지유를 기반으로 제조된 정액 희석액에서도 동일한 효과가 나타나며 37도에서 배양할 때 심각한 정자 운동성 소실이 일어난다고 보고된 바 있다 (Pellicer-Rubio 등, 1997). 또한, 본 연구에서 정장액을 SWM로 제거하고 정자를 동결보존하였을 때 융해 후 생존 정자는 53.8%로 정소상체 유래 정자보다 유의적으로 차이를 보여주고 있는 것은 정장액을 제거 하더라도, 잔존 효소가 존재할 수 있다는 판단을 할 수 있으며 일단 정장액의 PLA2효소에 노출된 정자의 막 성분은 구조적으로 달라 동일한 동결보존액에 대한 생리적 반응도가 달라져 있을 수 있음을 추정해 볼 수 있다. 본 연구에서 흑염소 동결 유전자원을 확보하기 위하여, 동결 정액을 생산하기 위한 자료를 확보하였다. 흑염소는 도입종에 비하여 계절번식특성이 없으며 정액 채취를 지속적으로 실시할 수 있어 동결 유전자원 생산과 번식 활용도가 높은 특징이 존재한다. 본 연구 결과에 따르면, 흑염소 정소상체 유래 동결정액의 생존율은 74.6%로 매우 양호하다고 판단되며 정자의 장수성 또한 우수한 것으로 관찰되었다. 소 정액의 희석 및 동결 보존에 활용되고 있는 상업용 triladyl-난황 희석액은 glycerol 농도가 6.4%로 본 연구의 흑염소 정소상체 유래 정자의 동결 유전자원 생산에 큰 문제점이 없는 것으로 판단된다. 그러나, 산업적으로 활용하기 위하여 살아 있는 개체에서 지속적인 동결 정액을 생산하는 것은 매우 중요하다고 판단되어 전기자극에 의한 정액을 보존하였다. 또한 전기자극에 의한 흑염소의 정액은 triladyl-난황 희석액과 반응하여 응고 반응이 나타나는 것으로 알 수 있었으며, 이는 기존에 보고된 바와 같이 SWM를 활용하는 것이 필수적이라는 것을 알 수 있었다. 그러므로 흑염소 동결 정액을 대량 생산하기 위하여 표준화된 정액 동결 프로그램을 마련하기 위한 더 많은 연구가 필요하다고 판단된다.

적 요

가축유전자원으로서 흑염소 정액은 가축의 증식 및 유전적 개량을 위하여 동결정액으로서 보존될 필요성이 높으나 아직까지 연구 결과가 많이 누적되어 있지 않은 것으로 판단된다. 국내의 흑염소 동결유전자원의 생산성과 효율성 분석을 위하여 가축유전자원센터에서 보유 중인 흑염소 3 계통을 이용하여 전기자극방법에 의하여 채취된 정자와 정소상체유래 정자를 동결 보존하였다. 동결 전 Triladyl 난황희석액을 이용하여 흑염소의 정액과 혼합하여 17°C에서 2시간 보존하면 응고현상을 관찰할 수 있었으며 42.9%의 비율로 난황이 변화한다는 것을 육안으로 관찰할 수 있었다. 정장 제거용 배양액으로 전기자극 유래 정자를 세정 후 동결 보존하면 융해 후 정자 생

존율이 정액 세정용 배양액 53.8±5.2%로 나타났으며 정소상체 정자는 74.6±10.6%로 유의적으로 높게 관찰되었다. 융해된 정자의 장수성을 17°C에서 조사해 보면 정소상체 유래 정자가 전기자극 유래 정자보다 우수한 것으로 조사되었다. 그러므로, 염소 동결 유전자원을 보존하는 방법으로 정소상체 정자는 활용성이 인정되며, 염소의 개량과 선발을 위하여 농가에서 활용 가능한 동결정액의 생산과 융해 후 생존성 증진을 위하여 더 많은 동결 보존 연구가 필요하다고 판단된다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 2017년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 흑염소 유전자원 보존 및 인공수정 상용화 기술 개발 연구, 과제번호: PJ011997)에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- Aamdal, J., Lyngset, O. and Fossum, K., 1965. Toxic effect of lysolecithin on sperm. A preliminary report. *Nord. Vet. Med.* 17:318-319.
- Baas JW, Molan PC and Shannon P. 1983. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J. Reproduction Fertil.* 68:275-280.
- Benson RW, Pickett BW, Komarek RJ and Lucas JJ. 1967. Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. *J. Anim. Sci.* 26:1078-1081.
- Calvete JJ, Reinert M, Sanz L and Topfer-Petersen E. 1995. Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins, *J. Chromatogr. A* 711:167-173.
- Darin-Bennett A and White IG. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14:466-470.
- Dott HM. 1974. The effects of bovine seminal plasma on the impedance change frequency and glycolysis of bovine epididymal spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.* 38:147-156.
- Fiser PS and 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* 23:518-524.
- Gil J, Soderquist L and Rodriguez-Martinez H. 2000. Influence

- of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology* 54:93-108.
- Graham JK and Foote RH. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24:42-52.
- Iritani A and Nishikawa Y. 1963. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 8:113-117.
- Kampschmidt RF, Mayer DT and Herman HA. 1952. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 36:733-742.
- Leboeuf B, Restall B and Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 113-141.
- Parks JE and Lynch DV. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29:255-266.
- Pellicer-Rubio MT, Magallon T and Combarrous Y. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 57:1023-1031.
- Nunes JF, Corteel JM, Combarrous Y and Baril G. 1982. Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reprod. Nutr. Dév.* 22:611-620.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A and Ménard M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.* 67:1250-1258.
- Ménard M, Nauc V, Lazure C, Vaillancourt D and Manjunath P. 2003. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 66:349-357.
- Pace MM and Graham EF. 1974. Components in egg yolk which protect bovine sperm during freezing. *J. Anim. Sci.* 39:1144-1149.
- Quinn PJ, Chow PYW and White IG. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60:403-407.
- Quinn PJ and White IG. 1965. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 12:263-270.
- Roy A. 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen of Cowper's gland of the goat. *Nature* 179:318-319.
- Salmon VM, Leclerc P and Bailey JL. 2017. Novel technical strategies to optimize cryopreservation of goat semen using cholesterol-loaded cyclodextrin
- Salvador I, Viudes-de-Castro MP, Yaniz JL, Gomez EA and Silvestre MA. 2007. Effect of different extenders and washing of seminal plasma on buck semen storage at 5°C. *J. Animal Veterinary Adv.* 6:272-277.
- Sawyer DE and Brown DB. 1995. The use on an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reprod. Toxicol.* 9:351-357.
- Simpson AM, Swan MA and White IG. 1987. Susceptibility of epididymal boar sperm to cold shock and protective action of phosphatidylcholine. *Gamete Res.* 174:355-373.
- Witte TS, Schäfer-Somi S, Kuchar A, Möstl E, Iben C and Aurich C. 2009. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 110:293-305.
- White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:639-658.

Received August 13 2017, Revised September 12, 2017,

Accepted September 15, 2017