

소미한양동결정액의 생산방법과 융해방법이 융해후 정액의 활성화에 미치는 영향

김 광 혁

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《우리는 어떤 최첨단과학기술이라도 우리의것으로 연구도입할수 있다는 신념과 배심을 가지고 선진과학기술을 받아들이기 위한 투쟁을 대담하게 진공적으로 벌려야 합니다.》
(《김정일선집》 증보판 제22권 24페이지)

집집승유전자은행이 설립되고 그 리용범위가 넓어지면서 동결정액생산방법과 융해방법에서 커다란 개선이 이룩되였다. 동결정액생산에서 지난 시기에는 알동결생산방법이 많이 리용되였지만 최근에는 프로그램동결기에 의한 수지관동결기술이 급속히 보급되였다.

이로부터 우리는 이전의 띄움식알동결생산방법과 프로그램동결기에 의한 생산방법을 비교검토하고 그 효과성을 검증하며 합리적인 융해조건을 찾기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

실험동물로는 몸질량이 70~75kg인 3~4년생 소미한양수컷 30마리를 실험에 리용하였다.

실험기구 및 시약 기구로는 인공질통, 10~30mL 수지주사기 5개, 1~5mL 수지주사기, 고무장갑, 채정병, 항온수욕조(《ZBR-HH501》), 현미경(《XSP-15C》), pH측정기(《PHS-3C》), 정액주입기(《IMV-MRS1DUALV2》), 프로그램동결기(《IMV2704》), 동결함(《IMV-Digitcool250》), 액체질소주입통(《CRYO-XRP60S》), 액체질소보존통(《YDS-20》), 삼각플라스크, 4℃ 저온랭동함(《SANYO-MBR1404GR》), 수지모세관(《IMV》), 자동온도계(《IMV》)를, 시약으로는 포도당, 레몬산나트륨, 사탕, 트리스, 글리세린, 란황, 페니실린, 스트렙토미쥰, 재증류수를 리용하였다.

정액채정 인공질통을 리용하여 정액을 채정하였다.

정액질평가 정액의 활성화, 밀도는 정액활성측정프로그램을 리용하여 측정하였으며 pH는 pH메터로 측정하였다.

희석액조성과 제조방법 포도당(3.5g), 사탕(2.5g), 레몬산나트륨(1.5g), 트리스(0.5g), 페니실린 5만IU, 스트렙토미쥰 5만IU를 100mL의 재증류수에 푼것을 1차희석액으로 하였다. 다음 1차희석액과 란황, 글리세린을 섞어 동결정액생산을 위한 희석액을 제조하였다.

저온처리 알정액생산을 위한 희석액의 저온처리는 다음과 같은 방법으로 하였다.

1차희석액과 란황으로 희석한 정액을 4℃ 랑동함에 넣고 2h동안 저온처리를 한 다음 글리세린을 넣고 15min동안 평형화하고 동결시켰다.

수지관동결생산을 위한 저온처리는 다음과 같은 방법으로 하였다.

1차희석액과 란황, 글리세린을 섞은 희석액으로 정액을 희석하여 수지관주입을 하고 4℃

랭동함에서 2h동안 저온처리를 진행한 다음 동결시켰다.

정액동결방법 띄움식알동결정액생산은 다음과 같은 방법으로 하였다.

액체질소를 담은 통으로 170mm×220mm×110mm 크기의 발포수지함을 리용하였다. 여기에 150mm×80mm×40mm 크기의 동결틀을 놓고 그안에 45mm×45mm×15mm 크기의 마분지판을 놓고 동결시켰다.

마분지판을 액체질소면상 2cm 높이에 설치하고 점적전 2min, 점적후 2min후에 액체질소에 담그었다.

수지관동결정액생산은 다음과 같은 방법으로 하였다.

프로그램동결기로 4℃에서 -10℃까지 7℃/min, -10℃에서 -100℃까지 45℃/min, -100℃에서 -140℃까지 25℃/min의 속도로 동결을 진행하고 동결된 수지관을 액체질소통에 넣어 보관하였다.

융해 알동결정액과 수지관동결정액을 각이한 온도에서 융해하고 활성을 비교검토하였다.

결과 및 논의

1) 융해방법에 따르는 동결정액활성변화

알 및 수지관동결정액을 각이한 온도에서 융해하였을 때 정자의 활성변화를 관찰한 결과는 표 1, 2와 같다.

표 1. 알정액동결의 융해후 활성화에 미치는 융해온도의 영향

융해 온도/℃	원정액			정자활성/%	
	pH	밀도 /($\cdot 10^9$ 개 \cdot mL $^{-1}$)	활성/%	저온처리후	동결-융해후
50	7.0	15	83.3 \pm 4.0	72.3 \pm 2.5	36.8 ^b \pm 1.5
55	7.0	15	83.3 \pm 4.0	72.3 \pm 2.5	37.0 ^b \pm 2.0
60	7.0	15	83.3 \pm 4.0	72.3 \pm 2.5	44.4 ^a \pm 1.8
65	7.0	15	83.3 \pm 4.0	72.3 \pm 2.5	41.0 ^a \pm 1.2
70	7.0	15	83.3 \pm 4.0	72.3 \pm 2.5	31.1 ^b \pm 2.3

n=30, a, b: p<0.05

표 1에서 보는바와 같이 동결정액알을 60℃의 수욕조에서 녹이였을 때 활성이 제일 높았다.

표 2. 수지관동결정액의 융해후 활성화에 미치는 융해온도의 영향

융해 온도/℃	원정액			정자활성/%	
	pH	밀도 /($\cdot 10^9$ 개 \cdot mL $^{-1}$)	활성/%	저온처리후	동결-융해후
35	7.0	15	82.0 \pm 4.4	70.7 \pm 4.2	43.9 ^b \pm 2.0
37	7.0	15	82.0 \pm 4.4	70.7 \pm 4.2	54.4 ^a \pm 2.2
40	7.0	15	82.0 \pm 4.4	70.7 \pm 4.2	50.1 ^a \pm 2.5
45	7.0	15	82.0 \pm 4.4	70.7 \pm 4.2	46.6 ^b \pm 1.9

n=30, a, b: p<0.05

표 2에서 보는바와 같이 동결수지관을 37℃의 수욕조에서 녹이였을 때 활성이 가장 높았다.

정액동결때 일정한 동결속도를 보장하여 정자들이 $-15\sim-60^{\circ}\text{C}$ 사이의 위험온도구간을 극복하게 하는것은 정자막과 세포질내 고분자물질들의 고차구조를 보존하여 동결피해를 방지하는데서 중요한 역할을 한다. 이와 마찬가지로 동결정자의 융해때에도 이러한 조건을 만족시켜야 정자의 손상률을 최대한 줄일수 있다. 또한 동결정액의 융해때에는 동결때와 달리 정자들이 과열피해를 받아 손상될수 있다.[1]

빠른 동결속도로 동결하였을 때에는 빠른 융해속도로 융해하여야 세포내 얼음재결정을 막을수 있으며 일반적으로 빠른 속도의 융해는 느린 속도의 융해에 비하여 융해후 활성회복에 유리하다.[2]

알동결방법은 정액을 액체질소면상에 띄워놓은 마분지팩우에 점적한 후 2min 지나 직접 액체질소에 잠그는 초급속동결방법이므로 융해할 때도 급속히 녹여야 얼음재결정이 생기지 않는다. 따라서 우리는 $50\sim70^{\circ}\text{C}$ 사이의 비교적 높은 온도구간에서 적합한 융해온도를 확정하기 위한 실험을 하였으며 60°C 가 알동결정액의 융해후 활성에 가장 좋은 온도라는 것을 밝혔다. 이것은 55°C 가 가장 적합한 융해온도라는 결과[2]와 조금 차이이지만 이러한 차이는 융해할 때 동결정액을 담은 용기의 열전도성의 차이 등에 의한것으로 볼수 있다.

일반적으로 수지모세관동결정액의 융해온도는 $35\sim45^{\circ}\text{C}$ 범위이며 많은 연구자들은 $36\sim40^{\circ}\text{C}$ 에서 융해할 때 활성이 가장 높다는 결과를 발표하였다.[4, 5] 우리는 $35\sim45^{\circ}\text{C}$ 의 온도구간에서 적합한 융해온도를 확정하기 위한 실험을 진행한 결과 37°C 가 수지모세관동결정액의 융해후 활성에 가장 좋다는것을 밝혔으며 이것은 선행연구[4]의 결과와도 일치한다.

2) 동결방법에 따르는 동결정액의 융해후 활성비교

떡잎식동결기구를 리용하여 만든 알동결정액과 프로그램동결기에 의한 수지관동결정액의 융해활성과 효과성을 검토하였는데 그 결과는 표 3과 같다.

표 3. 알동결정액과 수지관동결정액의 융해후 활성비교와 효과성검토

동결방법	원정액			정자활성/%		200마리분의 동결정액을 생산하는데 걸리는 시간/min
	pH	밀도 $/(\cdot 10^9 \text{개} \cdot \text{mL}^{-1})$	활성/%	저온처리후	동결융해후	
알동결	7.0	15	91.0 ± 3.6	84.1 ± 2.9	$44.4^* \pm 3.0$	60
수지관동결	7.0	15	91.0 ± 3.6	86.2 ± 3.3	$57.1^* \pm 2.5$	16

$n=30$, * $p<0.05$

표 3에서 보는바와 같이 알동결에 비하여 프로그램동결기로 생산한 수지관동결정액의 융해후 활성이 12.7% 더 높았다.

알동결방법에서는 정액이 액체질소면우에 띄어진 마분지팩에 떨어어져 동결되게 되는데 밑바닥에 접한 정액의 온도와 공기와 접한 윗부분의 정액의 온도가 서로 차이나게 된다. 그러나 프로그램동결방법에서는 액체질소를 동결함에 분무하여 온도내림과정을 프로그램적으로 세밀하게 조절함으로써 그안의 수지모세관의 온도가 균일해져 저온충격을 보다 적게 하여 융해후 활성이 높아졌다고 본다.[3]

우리가 실험에 리용한 프로그램동결기로 한번(8min)에 동결할수 있는 수지모세관은 200개로서 알동결방법에 비하여 200마리분의 동결정액을 생산하는데 걸리는 시간이 44min이나 더 단축되게 됨으로써 대량적인 동결정액생산에 유리한 조건을 마련하여준다.

맺 는 말

알동결정액은 60℃, 수지관동결정액은 37℃의 수욕에서 녹이였을 때 융해후 활성이 가장 높았다.

프로그램동결기에 의한 수지관동결정액의 융해후 활성이 알동결정액에 비하여 12.7% 더 높았으며 200마리분의 동결정액을 만드는 시간도 프로그램동결법이 알동결법보다 44min 더 빨랐다.

참 고 문 헌

- [1] Heiko Paulenz et al.; Theriogenology, 61, 1719, 2004.
- [2] 哈敏 等; 上海畜牧兽医通讯, 2, 2, 2006.
- [3] 杨红 等; 黑龙江动物繁殖, 10, 3, 31, 2002.
- [4] 张春波; 当代畜牧, 4, 37, 2002.
- [5] 渊锡藩 等; 黑龙江动物繁殖, 13, 3, 3, 2005.
- [6] 古兰白尔 等; 黑龙江动物繁殖, 21, 1, 9, 20013.

주체104(2015)년 3월 5일 원고접수

Effect of Frozen Method and Thaw Method of Fatty-Small Tail Sheep Semen on Frozen-Thawed Semen's Activity

Kim Kwang Hyok

The motility of post-thawed semen was 12.7% higher and the time making the cryopreserved semen for 200 sheeps was 44 minutes faster in straws using the programmable freezer than pelletes and the motility of post-thawed semen was the highest when semen was thawed at 60℃ in pellets, at 37℃ in straws.

Key words: fatty-small tail sheep, semen