

Coomassie brilliant blue G 및 R을 이용한 말 정액 침체 염색 기법

김성우^{1*}, 신상민², 유연희¹, 이재영¹, 김찬란¹, 고응규¹
¹국립축산과학원 가축유전자원센터, ²국립축산과학원 난지축산연구소

Acrosome staining with Coomassie brilliant blue G or R on the horse spermatozoa

Sung Woo Kim^{1*}, Sang Min Shin², Yeonhee Yu¹, Jae-Yeong Lee¹,
Chan-Lan Kim¹, Yeoung-Gyu Ko¹

¹Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA

²Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, RDA

요 약 말 정자의 침체 손상도를 간단하게 분석하는 기술을 개발하기 위하여 Coomassie brilliant blue G 또는 R 염색 시약을 이용하여 정자 도말 슬라이드에 대한 염색도를 조사하였고, 3.7% paraformaldehyde (PF)과 35% methanol (MT) 고정제가 침체 염색에 미치는 영향을 연구하였다. PF로 고정한 후 말 정자 도말 슬라이드를 0.05, 0.1 및 0.2 % 농도 CBB에 각 2분간 염색을 실시하여 침체를 관찰하면 0.05%의 경우 완전한 침체 염색도가 G형에서 62.6%, R형은 61.5%로 관찰되었으나, 0.1 및 0.2%의 경우, 80.2 및 79.7%로 (G 형), 78.1 및 76.0%로 (R 형) 관찰되어 유의적 차이가 나타났다. 그러나 MT 고정제를 이용할 경우, 침체 외막이 느슨해진 정자의 비율은 3.5%로 관찰되어 PF 고정제를 사용하면 9.0%로 관찰되어 유의적으로 낮게 관찰되었다. 이러한 결과는 말정자침체손상도를 관찰하기 위하여 CBB G 또는 R형 염색시약을 0.1~0.2% 농도로 이용될 수 있음을 증명한다. 또한, 말 정자 슬라이드 도말을 고정하는데 있어 고정제의 선택이 중요하며 MT보다 PF를 활용하는 것이 침체 변화 과정 중인 정자를 관찰하는데 중요하다는 보여 준다. 이러한 방법은 말의 인공수정을 위한 정액의 저온저장 또는 동결보존과정 중에서 정자침체손상율을 정확하게 판별 하는데 이용될 수 있음을 증명한다.

Abstract To develop simple acrosome staining of horse spermatozoa, this study tested the binding properties of Coomassie brilliant blue G or R on the sperm smears after 3.7% paraformaldehyde (PF) or 35% methanol (MT) fixation. After being fixed with PF and stained with 0.05, 0.1, or 0.2 % of CBB G or R for 2 min, horse spermatozoa were examined for their intact acrosome status. The intact acrosome of fresh horse spermatozoa were 62.6% and 61.5% with 0.05% of the G and R CBB solution, but 80.2 and 79.7% with G type and 78.1 and 76.0% with R type. On the other hand, when MT was used for fixation, the acrosome reacting sperm ratio was 3.5%, but was 9.0% in the case of PF. These results show that the intact acrosome of horse sperm could be judged using a 0.1~0.2% CBB G or R staining technique. PF would be an essential fixative for examining acrosome reacting horse spermatozoa. This method could be used to identify sperm with a damaged acrosome during low-temperature storage or cryopreservation for artificial insemination of horses.

Keywords : Coomassie brilliant blue G or R, Staining, Acrosome, Spermatozoa, Horse semen

본 논문은 농촌진흥청 연구사업의 "말정액의 냉동보존 및 이용기술개발 (PJ01362002)" 연구과제로 수행되었음.

*Corresponding Author : Sung Woo Kim(Animal Genetic Resources Research Center)

email: sungwoo@korea.kr

Received August 10, 2020

Revised August 31, 2020

Accepted September 4, 2020

Published September 30, 2020

1. 서론

말 정액의 품질을 판정하는 방법은 여러 가지가 있을 수 있으나 가장 흔히 사용하는 방법은 침체의 완전성에 의한 판정 기법으로 알려져 있다[1-4]. 정자의 침체는 수정과정에서 난관세포와 점막을 제거하는 효소를 함유하고 있으며 난자와 결합 시 투명대를 녹여 난자의 세포막과 정자두부의 막이 융합하여 새로운 생명체를 만드는 중요한 기능을 담당하고 있다[4, 5].

포유류의 침체를 염색하는 방법은 크게 2가지로 살펴볼 수 있으며 염색시약으로 조직의 구조적 차이를 차별적으로 염색하는 조직염색법(histochemical staining)과 침체 반응에 의하여 노출된 당단백질과 잘 결합물질을 이용하는데 여기에 형광물질을 결합시켜 정량적으로 분석하는 방법, 즉 형광분석법 (fluorescence staining)으로 구별된다[6-9]. 침체의 구조는 2중 막 구조로 내부에 당화된 단백질 효소가 농축되어 있는 것으로 알려져 있는데[2, 5, 10], 두부의 막손상은 정자의 기능을 잃어버리며 생존성과 운동성이 떨어지는 주요 원인으로 추정된다[3, 5]. 그러므로 정자의 운동성과 함께 정자의 구조적 이상을 파악하는 것은 수컷의 정자의 가임 능력을 추정하는 근거로 알려져 있다[2, 5]. 조직 염색은 비교적 간단히 실시할 수 있고 일반 현미경으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있어 널리 사용되는 방법이다. 또한 조직 염색한 슬라이드는 고정되어 있으며 광학현미경에 의한 빛 노출로 조직이 손상되지 않아 검사를 한 후에 다른 연구자에 의하여 다시 검사할 수 있는 장점이 존재한다[7-9]. 그러나 면역형광분석기법은 고가의 형광현미경이 요구되며 외부의 광원에 의하여 형광 물질이 그 성격을 잃어버리는 특성을 가지고 있기 때문에 형광 염색 직후에 정자 슬라이드를 관찰하고 자료를 얻어야 한다. 또다른 방법으로 형광염색된 정자를 유세포분석기(fluorescence assisted cell sorter, FACS)로 판단하는 방법도 있다. 단시간에 많은 정자를 분석할 수 있으므로 자료의 신뢰성을 높일 수 있는 장점이 있어 널리 사용되고 있다[9-11]. 그러나 이 또한 형광물질의 특성을 이용하는 문제가 있고 FACS 자체가 고가의 장비이므로 현장에서 정자를 분석하고 빨리 판단하기에는 적합하지 않다[10, 11].

Coomassie brilliant blue 염색시약은 분자생물학연구에 단백질 염색을 위하여 1960년대 부터 사용하여 왔다[12]. 값싸며 손쉬운 방법으로 소, 말, 토끼 및 실험동물을 포함하여 사람과 같은 정자의 침체 염색에 사용되었다[8, 11]. 그러나, 말의 정자는 독성물질에 민감하게

반응하며 정장액의 점액성분으로 그 염색도가 낮은 것으로 보고되었으며 CBB에 대한 정확한 농도와 노출시간에 대한 자료는 찾아보기 힘들다[13]. 또한 CBB시약은 G-250 type과 R-250 type으로 구조가 약간 다르며 G형이 2개의 methyl 기를 더 가지고 있다. 그러므로 물에 대한 용해도 차이가 존재하나[14, 15], 두 시약에 대한 침체 염색 방법에 대한 비교 자료는 찾아보기 어렵다.

본 연구에서는 말 정자 침체의 신속한 판단을 위하여 조직염색기법으로서 CBB염색기법을 개선하기 위하여 실험을 수행하였으며 한라마 정자를 이용하여 침체염색에 대한 자료를 확보하기 위하여 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 말 정액의 채취, 희석 및 동결

한라마(제주마와 더브렛의 교배종) 3두의 정액을 인공 질법으로 발정기의 암컷을 이용하여 정액을 채정하였다. 필터컵으로 점액질을 제거된 정액을 INRA 96희석액으로 1:2에서 1:3의 부피로 희석하여 650 g에서 15 분간 원심분리를 실시하여 정장액을 제거하였다. 동결정액은 INRA freeze(IMV, france)를 이용하여 $200\sim 300 \times 10^6$ /ml 농도를 맞추어 희석하였으며 중탕기법으로 상온에서 $4\sim 5^\circ\text{C}$ 로 2시간에 걸쳐 서서히 냉각시켰다. 5°C 로 조절된 정액처리장치(FHK, Japan)에서 냉각된 정액을 0.5 ml 스트로에 봉입하였다. 1~2mm 크기의 공기가 1~2 개 포함되도록 조절하였으며 초음파스트로실링장치(Ultra seal 21, Minitube, Germany)로 밀봉하였다. 포장된 정액은 액체질소(LN₂)위 5 cm에서 10 분간 노출시켜 동결을 실시하고 LN₂에 침지시켜 동결정액을 제조하였다.

2.2 CBB염색시약의 제조

CBB-R과 CBB-G (Sigma, USA)를 0.3g을 45 ml 메탄올에 녹여 농축용액을 제조하였고, Fig 1에서 관찰되는 바와 같이 CBB-R은 보라색에 가깝게 관찰되며 CBB-G는 파란색에 가깝게 관찰되었다. 10 ml acetic acid를 45 ml 증류수에 혼합하여 CBB 희석액을 제조하였다. CBB 농축액 4.5 ml을 희석액 5.5 ml에 넣어 0.3% CBB용액을 제조하였고, 증류수를 이용하여 0.05, 0.1 및 0.2%로 다시 희석하여 사용하였다.

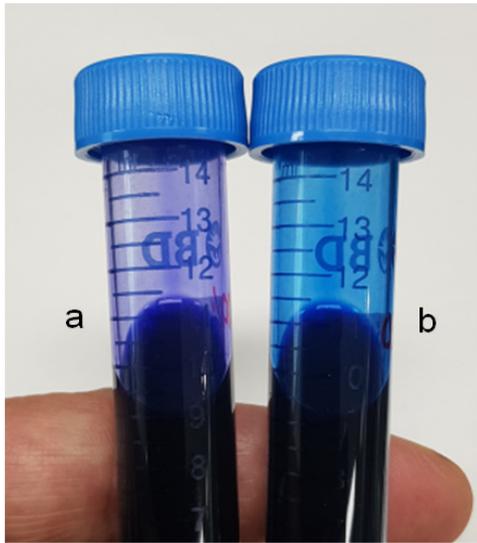


Fig. 1. The image of methanol stock of CBB-R (a) and CBB-G (b)

2.3 말 정액의 침체 염색

희석된 신선 정액을 calcium과 magnesium이 없는 PBS로 1:9의 부피비율로 혼합하여 650 g 에서 10 분간 원심 분리하여 희석액 성분을 제거하였으며 10~20 μ l의 정자를 슬라이드위에 올리고 다른 슬라이드를 이용하여 천천히 도말을 실시하였다. 3.7% paraformaldehyde가 포함된 PBS (PF-PBS) 또는 35% methanol에 슬라이드를 1, 2 및 3분간 침지하여 고정을 실시하였다. 고정된 슬라이드는 PBS에 2회, 10초간 연이어 침지하여 잔여 PF-PBS를 제거하고 CBB 염색 시약에 각각 2분간 침지하여 염색하였다. 염색 후 공기 중에서 도말된 슬라이드를 건조시켜 정자 염색슬라이드를 준비하였다. 동결정액은 37°C에서 45 초간 용해하여 사용하였으며, 염색이 끝난 도말 슬라이드는 모두 증류수에 1 회 5 초간 침지하여 여백에 존재하는 여분의 염색시약을 제거하고 37°C 슬라이드 가온판 위에서 2-3 분 동안 건조시키고 현미경으로 관찰하였다.

2.4 말 정액의 침체 반응도 분석

염색슬라이드는 100 배 오일 렌즈가 장착된 현미경 (IX71, Olympus, Japan)으로 관찰하였으며, 그림 2에서 관찰되는 바와 같이 침체가 온전한 정자, 침체 반응으로 침체의 외막이 늘어진 형태를 보이는 침체 반응된 정자 및 침체 반응이 일어난 정자로 판단하였으며 최소 200 개 이상의 정자를 판정하여 정액의 침체 변화도를

판정하였다.

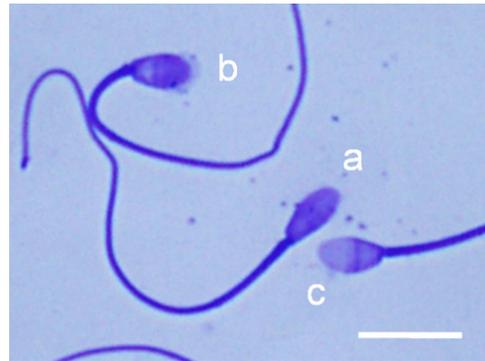


Fig. 2. The image of horse spermatozoa stained with 0.2 Coomassie blue stain R. Spermatozoa with intact acrosome (a) have bright blue staining pattern over the entire acrosome, but damaged spermatozoa with swollen outer membrane (b) or with no staining pattern over the acrosome (c). The white bar is 10 μ m

2.5 통계 분석

용해된 세포의 생존율을 One-way ANOVA test를 실시하여 분석하였으며 분석된 자료의 평균간 유의성은 Duncan의 다중검증법(Duncan's multiple range test)로 분석을 실시하였다.

3. 결과

3.1 CBB-G/R 염색 시약 농도 효과

2가지 형태의 CBB시약의 농도가 말 정액 침체 염색에 미치는 영향을 조사하기 위하여 신선 정액을 이용하여 0.05, 0.1 및 0.2% 농도로 각각 2분간 염색한 결과는 Fig 3 및 Fig 4에서 관찰할 수 있다. Fig 3은 CBB-G로 신선 정액을 염색한 결과로, 0.05% 농도에서는 완전한 침체의 염색도가 $62.6 \pm 6.6\%$ 로 관찰되었고 0.1% 및 0.2% 농도에서는 $80.2 \pm 5.8\%$ 및 $79.7 \pm 3.9\%$ 로 관찰되었고 유의적 차이가 존재하였다. 반면, 침체 반응이 진행 중인 형태는 각각 $0.8 \pm 0.4\%$, $10.0 \pm 3.7\%$ 및 $9.7 \pm 2.6\%$ 로 관찰되어 0.05%는 유의적으로 낮게 관찰되었다. 침체 반응이 완전히 일어나 침체가 염색되지 않는 비율 또한 $36.6 \pm 6.6\%$, 9.7 ± 2.6 및 $10.5 \pm 2.8\%$ 로 관찰되었고 0.05%는 유의적으로 높게 관찰되었다.

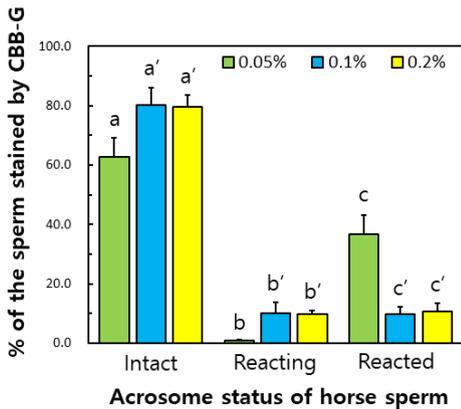


Fig. 3. The effects of CBB-G concentration on acrosome status of fresh horse spermatozoa. Data are expressed as the mean±SD for three independent experiments. Different superscripts mean statistically different values ($p<0.05$).

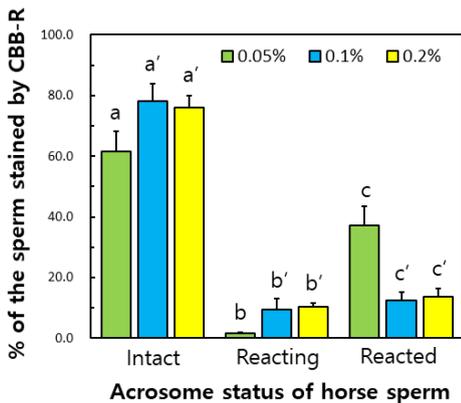


Fig. 4. The effects of CBB-R concentration on acrosome status of fresh horse spermatozoa. Data are expressed as the mean±SD for three independent experiments. Different superscripts mean statistically different values ($p<0.05$).

CBB-R의 경우, CBB-G의 말 첨체 염색 경향과 큰 차이가 없었다. 0.05% 농도에서는 $61.5\pm 2.8\%$ 로 관찰되었고 0.1% 및 0.2% 농도에서는 $78.1\pm 1.9\%$ 및 $76.0\pm 4.8\%$ 로 관찰되었고 유의적 차이가 존재하였다. 반면, 첨체 반응이 진행 중인 형태는 각각 $1.5\pm 0.6\%$, $9.4\pm 1.8\%$ 및 $10.3\pm 2.6\%$ 로 관찰되어 0.05%는 유의적으로 낮게 관찰되었다. 첨체반응이 완전히 일어나 첨체가 염색되지 않는 비율 또한 $37.0\pm 3.0\%$, $12.5\pm 3.7\%$ 및 $13.6\pm 2.4\%$ 로 관찰되었고 0.05%는 유의적으로 높게 관찰되었다(Fig 4).

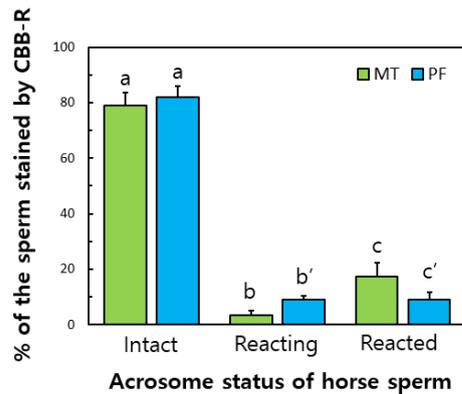


Fig. 5. The effects of fixative on acrosome status of fresh horse spermatozoa. MT = 35% methanol fixative, PF = 3.7% paraformaldehyde fixative. Data are expressed as the mean±SD for five independent experiments. Different superscripts mean statistically different values ($p<0.05$).

3.2 고정제가 첨체 변화에 미치는 영향

Fig 5에서 보는 바와 같이, 한라마의 신선정액을 도말 슬라이드로 제작하고 35% methanol 또는 3.7%의 PF로 각각 2분간 고정한 후 2% CBB-R로 2분간 염색하였을 때, 첨체 손상이 없는 정자의 비율은 각각 $79.1\pm 4.5\%$ 와 $82.0\pm 3.8\%$ 로 관찰되어 유의적 차이가 없었다. 그러나 첨체 반응이 진행 중인 정자로서 외막이 손상된 정자의 비율은 $3.5\pm 1.6\%$ 및 $9.0\pm 1.5\%$ 로 관찰되었으며, 첨체 반응이 완료되어 첨체가 없는 형태는 $17.5\pm 4.7\%$ 및 $9.0\pm 2.6\%$ 로 관찰되어 유의적 차이가 존재하였다.

Table 1. The Acrosome status of frozen horse semen stained by CBB-R and its motility

| Horse ID | Motility | Acrosome status | | |
|----------|---------------|-----------------|---------------|---------------|
| | | Intact | Reacting | Reacted |
| A | 65.4 ± 3.8 | 57.1 ± 5.7 | 15.7 ± 4.5 | 27.3 ± 2.7 |
| B | 67.2 ± 3.0 | 61.0 ± 3.2 | 13.2 ± 3.1 | 25.8 ± 3.4 |
| C | 47.9 ± 7.5 | 35.6 ± 6.8 | 24.8 ± 2.9 | 39.6 ± 4.1 |

Data are expressed as the mean±SD for three independent experiments.

3.3 동결 및 융해 정자의 첨체도 분석

표 1에서 보는 바와 같이 한라마 3두의 동결 정액 도말을 이용하고 CBB-R 0.2% 용액으로 염색하였을 때, 온전한 첨체를 가진 정자의 비율은 개체마다 서로 달랐

으며 운동성이 $65.4 \pm 3.8\%$ 을 나타내는 정자에서는 온전한 침체를 가진 정자비율은 $57.1 \pm 5.7\%$ 였고, $67.2 \pm 3.0\%$ 의 운동성을 보여주는 동결 정액의 경우 $61.0 \pm 3.2\%$ 로, $47.9 \pm 7.5\%$ 는 $5.6 \pm 6.8\%$ 로 관찰되어 운동성을 가진 정자의 비율이 침체손상이 없는 정자의 비율보다 높게 나타났다.

4. 논의

말 정액은 동결 보존에 매우 민감하다고 알려져 있으며[16-19], 계통 별 및 개체별 변이가 다양하게 관찰되며 일반적으로 동결정액의 생존성은 비교적 낮은 편으로 알려져 있다[17, 18]. 그러므로 이러한 정자 특색은 한라마도 동일한 것으로 판단되며 동결정액의 효율성을 증진하기 위하여 정확한 정자 침체 분석은 매우 중요한 기법으로 알려져 있다[2-4, 10]. 가장 간단한 염색기법으로 CBB염색기법이 포유류의 정자 판단에 많이 이용되었으나[11] 염색시약의 특성에 따른 자료와 염색농도에 관한 자료는 찾아보기 어렵다. 그러므로 CBB에 의한 말 정자 침체의 염색성에 대한 세부 연구 자료를 확보함으로써 동결과정에서 침체 변화도 분석을 용이하게 할 수 있어 인공수정과 종축으로서 활용성을 검증하기 위한 기본 자료로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 CBB-G와 CBB-R의 염색시약 모두 말 정액에 응용될 수 있음을 밝혔으며 신선정액과 동결 정액 모두 도말슬라이드를 이용하여 분석할 수 있었다. 신선하게 제조된 시약일수록 깨끗한 염색성을 관찰할 수 있었으며, 0.05% 농도에서는 침체 염색도가 충분하지 않아 False Negative로 볼 수 있는 염색이 증가하였다. 즉 침체반응이 완료된 것과 유사한 형태의 정자로 정상정자가 판정될 수 있음을 보여주고 있다. 반면, 0.1%와 0.2% 모두 말 정자 침체염색에 이용할 수 있는 것으로 판단되었다. 그러나 CBB-G의 경우, 상온에서 1일 보존된 염색시약에서 응고된 형태의 염색도가 CBB-R보다 많이 나타났다. 이는 슬라이드 도말에서 비 특이적 염색도가 증가하는 현상이 관찰되었다. CBB의 이러한 특성은 연구자에 따라 염색시약의 선호도를 결정할 수 있을 것으로 판단된다.

고정제의 경우 Methanol은 침체 외막의 지방 막 성분을 녹여내어 침체가 일어나고 있는 정자의 비율을 낮게 관찰하게 되는 결과를 야기하는 것으로 판단된다. 특히 성숙이 완료된 말 사출 정자의 세포막은 불포화 지방

산은 중요하며 이는 정소상체에서 이루어지는 누적되는 것으로 밝혀졌다[20]. 그러므로 고정 과정에서 MT를 활용하는 것은 바람직하지 않은 것으로 추정된다. 이는 침체반응 중인 정자의 비율을 낮추어 침체반응이 완료된 것으로 판단할 수 있는 것으로 보인다. 이러한 결과에 근거하며, 정자의 침체반응 중인 결과가 중요한 자료의 실험에서는 오류를 나타낼 수 있다. 그러므로 말의 침체 염색은 PF에 의한 고정이 필요하며 침체의 반응도를 조사할 때 매우 중요한 것으로 판단되었다.

5. 결론

본 연구는 말 정자 침체 염색을 간편하게 실시하는 방법에 관한 연구로 CBB시약에 대한 자료를 확보하였다. 도말 슬라이드는 현장에서 간단하게 준비할 수 있고 추후 염색을 통하여 분석하는 방법이므로 가장 간단하다고 판단되었다. 도말 정자의 염색도를 관찰하면 말 정자는 3.7% PF와 0.2% CBB-R 또는 CBB-G를 이용하여 2분간 염색하는 것이 말 침체 분석에 유리한 것으로 판단되었다. 특히 말 정자는 동결보존에 취약한 특성을 나타내는 축종으로 정자의 손상도 분석은 다른 축종보다 더 중요하다고 알려져 있다[8, 21]. 그러므로 수태율의 예측과 수정율의 진단을 위하여, 또한 정자 보존을 위하여 최적의 방법을 판단하는데 있어 침체를 정확하게 분석해야 한다. 특히 말의 경우, 번식능력보다 승용마나 경주마로서의 능력이 더 중요하게 간주되고 있으며[21], 이런 가축 사육의 특성은 정자의 질적 저하가 다른 축종에 비하여 더 심한 경우가 많다[20-22]. 그러므로 말 정자 침체 손상도 분석은 중요한 의미를 가지며 본 연구에서 제안된 방법에 따르면, 특별한 장비 없이 현미경으로 보다 정확한 자료를 쉽고 빠르게 획득할 수 있어 말 산업에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

- [1] J. I. Martí, J. A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, "Assessment of the acrosomal status of ram spermatozoa by RCA lectin-binding and partition in an aqueous two-phase system." *Journal of Andrology*, Vol.21, No.4, pp.541-548, January 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02119.x>
- [2] V. G. Pursel, L. A. Johnson, G. B. Rampacek, "Acrosome morphology of boar spermatozoa

- incubated before cold shock.” *Journal of Animal Science*, Vol.34, No.2, pp.278-283, February 1972.
DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1972.342278x>
- [3] N. L. Cross, S. K. Watson, “Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins.” *Theriogenology*, Vol.42, No 1 pp.89-99, 1994.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90665-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90665-6)
- [4] P. J. Casey, R. B. Hillman, K. R. Robertson, A. I. Yudin, I. K. M. Liu, E. Z. Drobnis, “Validation of an Acrosomal Stain for Equine Sperm That Differentiates Between Living and Dead Sperm.” *Journal of Andrology*, Vol.14, No.4, pp.289-297, July/August 1993.
DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1993.tb03367.x>
- [5] J. M. Bedford, “Sperm capacitation and fertilization in mammals.” *Biology of Reproduction*, Vol.2, Supplement, pp.128-158, 1970.
DOI: https://doi.org/10.1095/biolreprod2.Supplement_2.128
- [6] N. L. Cross, P. Morales, J.W. Overstreet, F.W. Hanson, “Two simple methods for detecting acrosomereacted human sperm.” *Gamete Research*, Vol.15, No.3, pp.213-226, May 1986.
DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.1120150303>
- [7] A. M. Brum, A. D. Thomas, K. Sabeur, B. A. Bal, “Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa”, *American Journal of Veterinary Research*, Vol.67, No.2, pp.358-362, May 2006.
DOI: <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.2.358>
- [8] G. Kútvolgyi, J. Stefler, A. Kovács, “Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa.”, *Biotechnic and Histochemistry*, Vol.81, No.4-6, pp.109-117, December 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1080/10520290600931007>
- [9] A. L. Way, M. A Henault, G. J. Killian, “Comparison of four methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa.”, *Theriogenology*, Vol.43, No.9, pp.1301-1316, June 1995.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00115-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00115-0)
- [10] P. F. Silva, B. M. Gadella, “Detection of damage in mammalian sperm cells.”, *Theriogenology*, Vol.65, No.5, pp.958-978, March 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- [11] J. L. Larson, D. J. Miller, “Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species.”, *Molecular Reproduction and Development*, Vol.52, No.4, pp.445-449, April 1999.
DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199904\)52:4<445::AID-MRD14>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199904)52:4<445::AID-MRD14>3.0.CO;2-6)
- [12] J. L. Brunelle, R. Green, “Coomassie Blue Staining.”, *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*, pp.161-167, March 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420119-4.00013-6>
- [13] B. M. Gadella, R. Rath, J.F.H. M. Brouwers, T.A.E. Stout, B. Colenbrander, “Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm.”, *Animal Reproduction Science*, Vol.68, No.3-4 pp.249-265, December 2001.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00161-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00161-0)
- [14] R. Kahn, R. W. Rubin, “Quantitation of submicrogram amounts of protein using Coomassie brilliant blue R on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide slab-gels.”, *Analytical Biochemistry*, Vol.67, No.1 pp.347-352, July 1975.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90305-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90305-x)
- [15] I. Syrový, Z. Hodný, “Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis.”, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Vol.569, No.1-2 pp.175-196, September 1991.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80229-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80229-6)
- [16] M. A. Alvarenga, F. O. Papa, C. R. Neto, “Advances in Stallion Semen Cryopreservation.”, *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, Vol.32, No.3 pp.521-530, October 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>
- [17] E. S. Metcalf, “The efficient use of equine cryopreserved semen.”, *Theriogenology*, Vol.68, No.3 pp.423-428, August 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.039>
- [18] S. Prien, S. Iacovides, “Cryoprotectants & cryopreservation of equine semen: a review of industry cryoprotectants and the effects of cryopreservation on equine semen membranes.”, *Journal of Dairy, Veterinary and Animal Research*, Vol.3, No.1 pp.1-7, January 2016.
DOI: <https://doi.org/10.15406/jdvar.2016.03.00063>
- [19] J. Aurich, J. Kuhl, A. Tichy, C. Aurich, “Efficiency of Semen Cryopreservation in Stallions.”, *Animals*, Vol.10, No.6, article 1033, June 2020.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10061033>
- [20] C. Gautier, D. Scarlet, R. Ertl, I. Walter, M. Wulf, C. Nagel, J. Aurich, C. Aurich, “Expression of enzymes involved in polyunsaturated fatty acid synthesis in the stallion testes and epididymis.”, *Reproduction, Fertility and Development*, Vol.32, pp.851-861, June 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1071/RD19342>
- [21] R. A. Griffin, M. Baker, R. J. Aitken, A. Swegen, Z. Gibb, “What makes a fertile sperm? Unique molecular attributes of stallion fertility.”, *Reproduction*, Vol.158, No.4, pp.R125-R137, October 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-19-0060>
- [22] B. Leemans, T. A. E. Stout, C. De Schauwer, S. Heras, H. Nelis, M. Hoogewijs, A. Van Soom, B. M. Gadella, “Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species?”, *Reproduction*, Vol.157, No.5, pp.R181-R197, May 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-18-0541>

김 성 우(Sung Woo Kim)

[정회원]



- 1997년 8월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학석사)
- 2002년 2월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학박사)
- 1998년 1월 ~ 2002년 6월 : 한국 기초과학연구소 연구원
- 2002년 6월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사

<관심분야>

가축번식학, 생명공학, 동결학

이 재 영(Jae-Yeong Lee)

[준회원]



- 2014년 2월 : 명지전문대학 기계과 (전문학사)
- 2017년 2월 : 건국대학교 동물자원학과 (농학사)
- 2019년 9월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사

<관심분야>

가축번식학, 동물면역학, 생명공학

신 상 민(Sang Min Shin)

[정회원]



- 2009년 2월 : 전북대학교 수의과대학(수의학 석사)
- 2009년 9월 ~ 2011년 9월: 전북대학교 수의주사보
- 2015년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사

<관심분야>

체외수정란생산, 정자동결

김 찬 란(Chan-Lan Kim)

[정회원]



- 1999년 2월 : 서울대학교 수의과대학 수의학과 (수의학학사)
- 2005년 3월 : 일본 기후연합대학원 수의학과 (수의학박사)
- 2006년 7월 ~ 2014년 10월 : 국립축산검역본부 수의연구사
- 2014년 10월 ~ 현재 : 국립축산과학원 수의연구사

<관심분야>

수의학, 예방의학, 친환경

유 연 희(Yeonhee Yu)

[준회원]



- 1992년 2월 : 우석대학교 신문방송학과 (학사)
- 2013년 5월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구원

<관심분야>

체외수정란생산, 정자동결

고 응 규(Yeong-Gyu Ko)

[정회원]



- 1997년 8월 : 전북대학교 축산학과 (농학석사)
- 2004년 3월 : 동경대학교 수의학과 (수의학박사)
- 1994년 7월 ~ 2015년 7월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사
- 2015년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구관

<관심분야>

가축번식학, 세포생화학, 생명공학