

Glass Wool Filtration을 이용한 개 희석정액의 운동성과 생존률의 검정

윤재원 · 이영준 · 김수희 · 지동범* · 김용준¹

전북대학교 수의과대학

*지동범 동물병원

Evaluation of Extended Canine Semen by Glass Wool filtration

Jae-Won Yoon, Young-Jun Lee, Sue-Hee Kim, Dong-Beom Ji* and Yong-Jun Kim¹

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

*Ji Dong Beom Animal Clinic

Abstract: Damaged spermatozoa are supposed to be trapped in glass wool. In the respect of this, two glass wool filtration spermatozoa groups (0.5 cm, 1 cm depth) were compared with control group to assay sperm motility, HOS values, and vital rate by CFDA/PI staining method following glass wool filtration. The motility of canine sperm extended with PBS+PVP after glass wool filtration was lower in both filtrated groups than that of the control group ($p<0.01$) and the same significant difference was also shown in canine semen extended with Tris buffer ($p<0.01$). The motility of canine sperm diluted with PBS+PVP was higher than that diluted with Tris buffer in the same experimental groups ($p<0.05$). The motility of control group was not significantly decreased until 2 hours immediately after extending, however, the motility of both glass wool filtrated spermatozoa were significantly decreased as time passed until 2 hours after filtration ($p<0.01$). At each time for assay (immediately, 30 min, 2 hours after filtration), the motility of canine sperm of control group was higher than the filtrated groups ($p<0.05$), whereas the motility of 0.5 cm depth group was higher than 1 cm depth group at the immediate time after filtration ($p<0.05$), 30 minutes later ($p<0.05$) with no difference at 2 hours. No difference was shown among the experimental groups in HOS values of canine sperm after glass wool filtration. The vital rate assayed by CFDA/PI staining of both filter groups was higher than the control group ($p<0.05$).

Key words : canine sperm, glass wool filtration, motility, vital rate, extender.

서 론

동결정액을 이용한 인공수정에서 가장 문제가 되는 것은 수태율이다. 수태율을 높이기 위해서는 수정적기의 판정, 수정기술의 능숙도 등 여러 가지 중요한 요소들이 있으며 이런 요소들과 함께 수정능력이 있는 정자를 선택해야 하는 중요한 점이 있다.

수태력을 높일 수 있는 정자를 선택하기 위해 정자의 운동성, 생존율, 정자의 수정능력 등에 대한 검정방법이 많이 연구되고 있다.

동물 정액의 검정은 일반적으로 광학 현미경을 이용한 정자 활력의 검사^{2,4,20,23-25} 또는 기형을 검사¹⁵에 기초하고 있다. 그러나 이 검사는 간단하지만 주관적이고 정자 운동성 만으로는 정자의 실제 수정능력을 판단하기 어려우며 실제 수정 능력과 일치하지 않는 문제점¹²도 제시되었다.

이와 같은 주관적인 검정방법을 개선하기 위한 정자 검정의 다른 객관적인 방법으로는 computer-assisted semen analyzer 이용검정법^{1,3,22}, 정자의 운동성과 생존율의 검정을 위한 HOS (hypo osmotic swelling) 검사, 정자의 생존율

검정을 위한 CFDA/PI 염색법, sperm penetration assay³⁶ 등이 있으나 고가의 장비가 필요하거나 검사가 복잡하여 표준화가 어렵고 많은 시간이 소모되는 것이 문제점으로 제시되고 있다. 그러므로 객관적이면서 용이하고 신속하게 정자의 수정능력을 검정하는 방법으로서 Glass wool 여과법^{21,27}을 포함한 정자 여과법^{26,31,32}이 대두되었다.

Glass wool 여과법을 동물 정자 검정에 사용한 보고로서 Graham 등^{10,11}은 소와 산양 정자 검정에, Fayemi 등⁹은 동결 돼지 정자 검정에, Heuer 등¹⁴은 물소 정자의 검정에, Samper 등^{27-30,33}은 말 정자 검정에 Glass wool 여과법을 이용한바 있다. 이와 유사한 적지않은 연구들^{5-7,13,16,17,19,35}에서 제시된 결론은 손상된 침체나 정자막을 가진 정자는 Glass wool filter에 걸려진다는 것이었으며 이는 객관적이면서 신속한 검정법으로 간주되었다.

따라서 이 연구의 목적은 Glass wool 여과법을 개 정자 검정에 사용할 수 있는지를 알아보고 Glass wool filter를 여과한 정자의 운동성과 생존성을 알아보고자 하였다. 그 결과 Glass wool을 여과한 정자를 개 인공수정에 사용할 수 있는지를 검토하고자 하였다.

¹Corresponding author.
E-mail : yjk@chonbuk.ac.kr

재료 및 방법

실험동물

실험에 이용된 개는 과거 번식력이 증명되었고 임상 검사상 건강하다고 판단되는 말티스 2두와 잡종견 2두의 수캐들을 이용하였다. 연령은 2-4세이었고 체중은 3-5 kg이었다.

정액채취

정액의 채취는 수지법을 이용하였으며, 한 수캐에 대해 일주일에 일회의 정액을 채취하였으며 정자 농도가 높은 2분획을 중심으로 채취하였다. 채취하는 동안 낮은 온도로 인한 정자의 변화를 방지하기 위하여 정자를 채취하는 시험관은 약 37°C로 유지되도록 하였다.

원정액의 검사

원정액 검사는 정액 채취 후 실험실로 옮겨 채취한 정액 중 일부를 취하여 일반 광학현미경을 이용하여 정자 활력, 정자 수, 기형율을 조사하였다.

회석액의 조성

Glass wool 여과시 회석액 비교를 위한 실험에 사용된 회석액은 두 종류로서 PBS와 Tris buffer 이었다. PBS 회석액의 조성은 10 mM Glucose, 0.5 mg/ml Polyvinyl alcohol, 0.5 mg/ml polyvinyl pyrrolidone (PVP)을 dPBS에 용해하였으며, Tris buffer의 조성은 D.W 100 ml에 2.4 g Tris base, 1.4 g Citric acid (monohydrate), 0.8 g Glucose을 용해하여 만들었다.

이 실험에서 회석액의 사용은 회석액 간 비교 실험을 위하여 사용하였으며 이를 제외한 다른 실험들은 인공수정에 사용 가능성을 확인하기 위하여 Tris buffer 회석액을 이용하였다.

정자수의 조정

원정액을 회석액으로 희석시 3개의 실험 군별 정자 수를 각각 $30 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 하였다.

Glass wool 여과의 준비

Glass wool 여과를 위해 길이 7.5 cm, 폭 1 cm인 시험관을 사용하였으며, 실험에 사용된 glass wool의 두께는 0.5 cm와 1 cm가 되도록 하여 두 군으로 구별하였다. Glass wool은 시험관 선단으로부터 3 cm 아래에 치밀하게 채웠으며 시험관의 밑 부분은 잘라내어 정액이 흐를 수 있도록 하였다. Glass wool에 의한 정자의 물리적인 손상을 최소화하기 위해 정자 여과 전 시험관에 채워진 Glass wool을 회석액으로 2-3회 세척하였다. Glass wool을 통과한 정액은 Glass wool filter 아래에 시험관을 설치하여 회수하였다.

Glass wool 여과법

개 정액의 여과는 37°C가 유지되는 항온수조에서 실시하였으며, 시험관으로부터 동일한 높이에서 동일한 양의 정액

을 동일한 속도로 시험관의 벽에 흘러보내 여과하였다. 대조군은 여과에 사용된 동일한 시험관의 벽에 정액을 흐르게 한 후 정액을 회수하였다.

여과 후 정액의 검사

이 실험에서 사용된 개 정액 검사는 광학현미경을 이용한 정자 활력검사, HOS 검사 및 CFDA/PI 형광 염색법을 이용하여 정자의 생존율을 검사하였다.

정자의 활력검사

여과후 정액의 활력검사는 일반 광학현미경을 이용하였으며 여과된 정액의 일부를 슬라이드에 떨어뜨리고 200배율에서 검사하였다.

HOS Test

Glass wool filtration 후 정자에 대한 HOS 검사는 60 mOsm fructose 용액을 이용하였으며 정액 0.1 ml를 취하여 1 ml fructose 용액에 혼합한 후 37°C에서 45분간 배양하였다. 배양 후 정액의 일부를 슬라이드에 떨어뜨리고 위상차현미경을 이용하여 400배에서 200개의 정자를 검사하여 curled - swollen 정자의 백분율을 구하였다.

CFDA/PI 형광염색 검사

CFDA/PI의 형광염색을 이용한 정자 생존율 검사는 각 실험군의 정자수를 5×10^6 개로 조정된 후 정액을 CFDA/PI 용액과 1:3으로 혼합하였다. 혼합된 용액을 37°C에서 20분간 배양하였으며 이 중 한 방울을 슬라이드에 올려놓아 형광현미경으로 400배에서 200개의 정자를 검사하여 초록색으로 염색되는, 살아 있는 정자의 백분율을 구하였다.

실험처리

1) Glass wool 여과시 회석액간 비교

개 정자의 Glass wool 여과시 회석액간 차이를 비교하기 위하여 PBS+PVP와 Tris buffer의 2가지 회석액으로 정액을 희석하였으며 여과 후 대조군 및 회석액간 정액의 운동성을 분석 비교하였다.

2) 개 정자의 Glass wool 여과 후 시간 경과에 따른 정자 활력 비교

Glass wool filtration 후 시간 경과에 대한 정자 활력 검사는 여과 직후, 30분 후, 2시간 후에 실시하였다.

3) 개 정자의 Glass wool 여과 후 HOS 검사

Glass wool filtration 후 세 실험군에 대한 HOS 검사를 실시하였다.

4) 개 정자의 Glass wool 여과후 생존율 검사

Glass wool filtration 후 세 실험군에 대한 CFDA/PI 형광염색법을 이용한 생존율 검사를 실시하였다.

통계 분석

이 실험에서 얻어진 결과는 ANOVA로 통계 처리하였으며

ANOVA 통계 처리 후 유의성이 인정되는 경우는 Turkey-Kramer Multiple Comparison Test로 실험군간 유의차를 구하였다.

결 과

Glass wool 여과 후 정자의 활력을 희석액에 따라 조사한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서와 같이 PBS와 Tris buffer 모두에서 대조군은 여과군보다 높은 활력을 나타내었고($p < 0.01$), 0.5 cm 여과군은 1 cm 여과군보다 더 높은 활력을 나타내었다($p < 0.01$).

동일 실험군 비교에서 PBS군은 Tris buffer 군보다 더 높은 활력을 나타내었다($p < 0.05$).

개 정자를 glass wool 여과 후 경과 시간에 따른 활력은 Table 2와 같다.

Table 2에서와 같이 filtration 직후, 30분 후, 2시간 후에 서 모두 대조군의 활력은 여과군들 보다 높았고($p < 0.05$), 0.5 cm 여과군은 2시간 후를 제외한 시간에서 모두 1 cm 여과군보다 높은 활력을 나타냈다($p < 0.05$). 대조군은 시간 경과에 따른 활력감소가 인정되지 않았으나, 여과군은 각각 시간이 경과 할수록 활력이 현저히 감소하였다($p < 0.01$).

Glass wool 여과 후 정자에 대한 HOS 검사결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서와 같이 실험군간 HOS치에서 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

Glass wool 여과 후 CFDA/PI 염색에 의한 생존율 검사 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서와 같이 Glass wool 여과군은 대조군보다 더 높은 생존율을 나타내었고($p < 0.05$), 1 cm군은 유의적인 차이

Table 3. HOS values of canine sperm extended with Tris buffer after Glass wool filtration (n=9)

	Experimental Group		
	Non-filtered	Filtered through (depth)	
		0.5 cm	1 cm
HOS	66.11 ± 4.11	69.39 ± 6.86	64.61 ± 9.99

HOS : hypo osmotic swelling.

Table 4. Viability assessed by CFDA/PI staining of canine sperm after glass wool filtration (n=9)

	Experimental Group		
	Non-filtered	Filtered through (depth)	
		0.5 cm	1 cm
Viability	82.32 ± 6.96 ^a	87.64 ± 3.57 ^b	90.60 ± 4.35 ^b

a.b: Different superscripts denote significant differences within columns ($p < 0.05$).

없이 0.5 cm보다 더 높은 생존율의 수치를 나타내었다.

고 찰

이 연구에서 희석액이 다른 개 정자를 Glass wool을 통해 여과한 후 조사한 활력에서 PBS 희석군은 Tris buffer 희석군보다 대조군을 포함하여 3개 실험군 모두에서 더 높은 활력을 나타내었다. 이 결과를 비교할 수 있는 다른 연구자들의 자료를 접하지 못하였으나 이러한 결과가 나온 것은 여과 후 조사된 자료로서 PBS 희석이 Tris buffer 희석보다 정자에 희석충격을 덜 주기 때문인 것으로 추측된다.

한편, 실험군간 비교에서는 PBS 희석과 Tris buffer 희석

Table 1. Motility of canine sperm according to different extenders after glass wool filtration (n=7)

Extender	Experimental Group		
	Non-filtered	Filtered through (depth)	
		0.5 cm	1 cm
PBS+PVP	94.17 ± 2.04 ^{a.A}	88.24 ± 5.8 ^{b.A}	80.83 ± 3.76 ^{c.A}
Tris buffer	71.04 ± 1.07 ^{a.B}	59.29 ± 10.18 ^{b.B}	45.71 ± 12.39 ^{c.B}

a.b.c: Different superscripts denote significant differences within columns ($p < 0.01$).

A.B: Different superscripts denote significant differences within rows ($p < 0.05$).

Table 2. Motility of canine sperm* according to time elapsed after Glass wool filtration (n=8)

Time	Experimental Group		
	Non-filtered	Filtered through (depth)	
		0.5 cm	1 cm
Immediately after	69.17 ± 10.21 ^{a.A}	56.67 ± 8.17 ^{b.A}	42.50 ± 9.88 ^{c.A}
30 minutes	66.67 ± 12.11 ^{a.A}	32.50 ± 10.84 ^{b.B}	18.33 ± 6.83 ^{c.B}
2 hours	61.67 ± 14.72 ^{a.A}	12.50 ± 7.58 ^{b.C}	4.17 ± 3.76 ^{c.C}

*. Sperm extended with Tris buffer.

a.b.c: Different superscripts denote significant differences within columns ($p < 0.05$).

A.B.C: Different superscripts denote significant differences within rows ($p < 0.01$).

모두에서 대조군은 여과군보다, 그리고 여과군 중에서 0.5 cm 여과군은 1 cm 여과군보다 더 높은 활력을 나타내었다. 이 결과는 여과시 운동성이 적거나 미약한 정자는 여과를 통해 걸러지기 때문인 것으로 추측되며 이 결과는 Lodhi와 Crabo¹⁸, Crabo 등^{5,6}, Samper와 Crabo^{27,34}가 정자를 Glass wool 여과 후 제시한 결론과 일치하는 것으로서 손상된 살아있는 정자가 여과되기 때문인 것으로 보인다.

이 연구에서 개 정자를 Glass wool에 여과 후 활력을 평가하기 위해 여과직 후, 30분 후, 2시간 후에 활력을 평가했을 때 각 시간 모두에서 여과군은 대조군에 비하여 낮은 활력을 나타내었다. 이 결과는 말 정액을 가지고 여과 실험을 실시한 Samper³⁰의 결과와 유사하며 여과군간 비교에서 filter가 1 cm일때 각 시간 모두에서 더 낮은 활력을 나타낸 것으로 보아 filter의 두께가 클수록 정자가 filter에 정체되는 수가 많아지기 때문인 것으로, 즉 여과시 정자의 생존율이 떨어지는 것으로 생각된다.

이 연구에서 Glass wool 여과 후 정자의 활력을 평가하기 위한 HOS 검사를 실시한 바, 대조군과 여과군 모두에서 유의적인 차이를 얻지 못하였다. 이 결과는 손상된 침체나 정자막을 가진 정자는 Glass wool에 걸러지기 때문에 여과군에서 더 높은 HOS 수치를 나타낼 것으로 예측한 것과 다른 결과이었다. 이와같이 대조군과 여과군에서 차이가 인정되지 않은 것은 HOS검사를 위한 45분간의 배양시간 동안 사멸 정자가 증가되었기 때문으로 판단된다.

또한 이 연구에서 여과한 정자의 생존률을 판단하기 위해 CFDA/PI 염색을 실시하여 초록색으로 염색되는 살아있는 정자를 검사하였다. 검사결과는 여과군이 대조군에 비하여 유의적으로 높은 결과를 얻었으며 여과군 중 1 cm 여과군이 0.5 cm 여과군보다 높은 수치를 나타내었다. 이는 여과 동안 정자에 나쁜 영향을 주는 정자의 세포들과 손상된 정자들이 Glass wool에 의해 걸러진 결과로 보이며 앞에서 서술된 HOS 검사 결과와 상이하게 여과군에서 더 높은 생존율을 나타낸 것은 형광염색 시 여과 후 즉시 염색되기 때문인 것으로 판단된다. 그리고 이 결과는 실제 수정을 실시하였을 때 정자의 Glass wool 여과가 운동성보다 생존성에서 더 높은 상관관계를 보고한 Samper³⁰에 의해서도 증명된다고 볼 수 있다.

Engel 등⁸은 정액을 Glass wool에 여과 후 여과한 Glass wool을 전자현미경으로 관찰하여 Glass wool filter의 상단부에 정자 세포들과 비세포성 물질인 많은 찌꺼기들이 걸려져 있는 사진을 제시한 바 있는데 Glass wool 여과를 이용하여 손상된 정자를 걸러낸다는 것을 전자현미경적으로 입증한 자료라고 생각된다.

그러나 이 연구에서 Glass wool 여과된 정자의 활력이 대조군에 비해 전체적으로 낮았고, 특히 시간이 경과될수록 생존 정자율이 낮아진 점에 대해서는 생존성을 높일 수 있는 연구가 더 수행되어야 할 것으로 보이며, 이런 점 때문에 Glass wool 정자를 인공 수정에 사용시는 여과 후 가능한 신속히 사용해야 할 것으로 판단된다.

이상의 결과, 개 정자의 Glass wool 여과는 여과의 물리적인 특징상 정체시간의 연장으로 인하여 활력은 다소 떨어지지만 상대적으로 높은 생존율을 가진 정자를 얻을 수 있는 방법임을 알 수 있었다. 생존율은 활력보다 실제 수정에 있어서 높은 상관관계를 보여 Glass wool 여과를 통한 정자는 인공수정에 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

결 론

인공수정 시 수태율을 높이기 위한 건강한 정자의 선별을 위해 Glass wool filtration을 개 정액을 가지고 실시하였다. 과거 번식력이 있고 임상검사상 건강하다고 판단되는 수컷 4두로부터 정액을 채취하여 Tris buffer를 이용하여 희석한 후 Glass wool에 여과하였다.

여과 후 정자의 활력과 생존성 검사의 객관성을 위해 HOS 검사와 CFDA/PI 염색을 실시하였다.

1. Glass wool filtration 후 희석액에 따른 개 정자의 활력은 PBS와 Tris buffer 모두에서 대조군은 여과군보다 높은 활력을 나타내었고($p < 0.01$), 0.5 cm 여과군은 1 cm보다 더 높은 활력을 나타내었다($p < 0.01$). 동일 실험군 비교에서 PBS군은 Tris buffer군보다 더 높은 활력을 나타내었다($p < 0.05$).

2. Glass wool filtration 후 경과 시간에 따른 개 정자의 활력에서 대조군의 활력은 2시간 후까지 유의적인 감소가 인정되지 않았으나, Glass wool 여과군은 2시간 후까지 시간이 경과할수록 활력이 현저히 감소하였다($p < 0.01$). Glass wool filtration 후 즉시, 30분 후, 2시간에 대조군의 활력은 여과군보다 더 높게 나타났었다($p < 0.05$). 0.5 cm 여과군은 여과 직후와 30분후에 1 cm 여과군보다 더 높은 활력을 나타내었으나($p < 0.05$), 2시간 후에는 차이가 인정되지 않았다.

3. Glass wool filtration 이후 실험군간 HOS 치의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

4. Glass wool filtration 후 1 cm 여과군은 0.5 cm 여과군보다 유의적인 차이 없이 더 높은 생존율의 수치를 나타내었고, 여과군들은 모두 대조군보다 더 높은 생존율을 나타내었다($p < 0.05$).

이 결과를 통하여 개 정액을 Glass wool filtration 하면 생존율이 더 높은 정자를 얻을 수 있으며 생존율이 높음으로 인공수정에 이용할 수 있으나 여과 후 가능한 신속히 사용해야 한다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Amann RP. Computerized evaluation of stallion spermatozoa. Proc 33rd Ann Conv Am Ass Equine Pract 1987; 453-473.
2. Anderson EW, Cranwell JE, Pickett BW, Voss JL. The relationship of motility to fertility of frozen stallion spermatozoa. Proc 9th Int Congr Anim Reprod AI, Madrid. 1980; 5: 335-338.
3. Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships

- between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 1988; 9: 41-54.
4. Clay CM, Slade NP, Amann RP, Squires EL. Effects of extender, storage temperature and centrifugation on stallion spermatozoal motility and fertility. *Proc 10th Int Congr Anim Reprod & AI, Urbana*. 1984; 4: 186-189.
 5. Crabo BG, Pavelko MK, Kosco MS, Lohdi IA, Loseth KJ. Evaluation of frozen boar semen by surgical insemination, sperm motility, acrosome damage and Sephadex filtration. *Proc 10th Int Congr Anim Reprod AI 1984*; 2: No. 59.
 6. Crabo BG, Loseth KJ, Weidel L. Trapping of morphological types of bull spermatozoa by Sephadex/glass wool filter. *Proc 12th Int Congr Anim Reprod AI, The Hague*. 1992; 1: 423-425.
 7. Deibel GC, Smith JE, Crabo BG, Graham EF. Evaluation of six assays of sperm quality by means of their accuracy, precision and sensitivity in separating known levels of damage. *Proc 8th Int Congr Anim Reprod AI 1976*; 4: 888-891.
 8. Engel S, Weber H, Petzoldt R, Seidle B, Wiehe W, Splerl J. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. *Andrologia* 2001; 33: 223-230.
 9. Fayemi EO, Crabo BG, Graham EF. Assay of frozen boar semen with Sephadex filtration. *Theriogenology* 1979; 12: 13-17.
 10. Graham EF, Vasquez IA, Schmehl MK, Evensen BK. An assay of semen quality by use of Sephadex filtration. *Proc 8th Int Congr Anim Reprod & AI, Cracow*. 1976; 4: 896-899.
 11. Graham EF, Schmehl MK, Evensen BK. An Overview of column separation of spermatozoa. *Proc 7th Techn Conf NAAB Reprod AI 1978*: 69-73.
 12. Graham EF, Schmehl MK, Nelson DS. Problems with laboratory assays. *Proc 8th Tech Conf NAAB Reprod AI 1980*: 59-66.
 13. Heuer C. Versuche Zur Tiefgefrierkonservierung von Wasserb?ffelsperma unter Anwendung des Filtrertests zur Samenbeurteilung. *Inaug Diss Vet Med Hannover*. 1980.
 14. Heuer C, Tahir-Nazir M, Crabo BG, Bader H, Shah M, Saji MA. Simple method for the assay of water buffalo semen by filtration through sephadex. *Pakistan Vet J* 1983; 3: 157-161.
 15. Jasko DJ, Lein DL, Foote RH. Determination of the relationship between morphologic classifications and fertility in stallion: 66 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assn* 1990; 197: 389-394.
 16. Kissinger CH, Skinner MK, Griswold MD. Analysis of Sertoli cell-secreted proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Biol Reprod* 1982; 27: 233-240.
 17. Landa CA, Almquist JO, Amman RP. Factors influencing Sephadex separation of bovine and ovine spermatozoa. *J Dairy Sci* 1980; 63: 277-282.
 18. Lodhi LA, Crabo BG. Filtration of bull spermatozoa through Sephadex, polyacrylamide, silica gel and glass wool in the presence and absence of two sugars. *Proc 10th Int Congr Anim Reprod & AI, Urbana*. 1984; 2: 59-61.
 19. Loseth KJ, Wolff K, Hamilton DW, Crabo BG. Trapping of in vitro capacitated boar spermatozoa in Sephadex and glass wool filters. *Proc 12th Int Congr Anim Reprod AI, The Hague*. 1992; 3: 1575-1577.
 20. M?ller Z. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J Reprod Fert Suppl* 1987; 35: 121-125.
 21. Obonyo M, Loseth KJ, Crabo BG. Relation between the fertility of frozen boar semen and semen quality measured as sperm motility and with glass wool/Sephadex filters. *Proc 12th Int Congr Anim Reprod AI, The Hague*. 1992; 1: 505-507.
 22. O'Connor MT, Amann RP, Saacke RG. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *J Anim Sci* 1981; 53: 1368-1376.
 23. Pickett BW, Sullivan JJ, Byers WW, Pace MM, Remmenga EE. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil Steril* 1975; 26: 167-174.
 24. Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics*. Ed B Rosner Duxbury Press Boston MA. 1982: 225-452.
 25. Saacke RC, White JM. Semen quality and their relationship to fertility. *Proc 4th Tech Conf NAAB AI Reprod* 1972: 22-27.
 26. Samper JC, Crabo BG, Behnke EJ, Byers AP, Hunter AG. In vitro capacitation of stallion semen and its filterability through filters containing Sephadex. *Proc Conf Res Wor Anim Dis, Chicago*. 1986: 236(Abstr).
 27. Samper JC, Crabo BG. Filtration of capacitated stallion spermatozoa through filters containing glass wool and/or Sephadex. *Proc 11th Int Congr Anim Reprod & AI, Dublin*. 1988; 3: 295.
 28. Samper JC, Loseth KJ, Crabo BG. Evaluation of horse spermatozoa with Sephadex filtration using three extenders and three dilutions. *Proc 11th Int Congr Anim Reprod AI, Dublin*. 1988; 3: 294.
 29. Samper JC, Behnke EJ, Byers AP, Hunter AG, Brabo BG. In Vitro capacitation of stallion spermatozoa in calcium-free medium and penetration of zona free hamster eggs. *Theriogenology* 1989; 31: 875-884.
 30. Samper JC. Evaluation of Membrane Integrity of Preserved Stallion Spermatozoa. PhD Dissertaion, University of Minnesota. 1990.
 31. Samper JC, Crabo BG, Hamilton DW. A clusterin-like protein in stallion sperm and reproductive fluids binds to Sephadex. *J Androl Suppl* 1990; 11: 26-P.
 32. Samper JC, Hamilton DW, Crabo BG. A clusterin-like protein in stallion sperm and reproductive fluids binds to Sephadex. *Proc 15th Ann Mtg American Society of Andrology* 1990: 26.
 33. Samper JC, Hellander JC, Crabo BG. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J Reprod Fert Suppl* 1991; 44: 107-114.
 34. Samper JC, Crabo BG. Assay of capacitated, freeze-damaged and extended stallion spermatozoa by filtration. *Theriogenology* 1993; 39: 1209-1220.
 35. Samper JC, Hamilton DW, Pryor JL, Loseth KJ, Troedsson MHT, Crabo BG. Mechanism of Sephadex Trapping of Capacitated Stallion Spermatozoa. *Biol Reprod Mono* 1995; 1: 729-737.
 36. Yanagimachi R. Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res* 1984; 5: 323-344.