

풍산개 정자의 동결보존에 있어서 Glycerol 농도, 동결 및 용해속도가 정자성상에 미치는 영향

지달영* · 윤태중** · 노정래* · 조상래*** · 김창근**** · 방명걸**** · 김보숙*
서울대공원동물원*, 고려대학교 생명자원연구소**, 농촌진흥청 축산과학원***,
중앙대학교 동물자원과학과****

Effect of Glycerol Concentration, Freezing Rate and Thawing Rate on Semen Characteristics in PoongSan-dog

D. Y. Ji*, T. C. Yoon**, J. R. Rho*, S. R. Cho***, C. K. Kim****, M. G. Pang**** and B. S. Kim*
Seoul Grand Park Zoo*, Korea University Institute of life Science and Natural Resources**,
National Institute of Animal Science, RDA***,
Department of Animal Science & Technology, Chung-Ang University****

ABSTRACT

This research was carried out in order to establish the production technique for Poong-san dog's frozen semen, by examining the semen characteristic and the volume of glycerol added to the dilution solution, thawing temperature and sperm motility and viability as well as the motility using CASA according to time variation.

Average semen volume was 5.9 ml, sperm concentration 116.3×10^6 sperm/ml, total sperm number 789.3×10^6 sperm, motility $88.7 \pm 1.7\%$ and viability $87.6 \pm 7.8\%$. When it was cryopreservation and thawed at different glycerol concentrated extender, it showed 52.7% motility and $57.7 \pm 10.3\%$ viability at 7% glycerol, compared to other treatments. For semen cryogeny, at conditions of 5, 7 cm and a height of 10 cm for pre-cryogeny and maintaining the semen at 7 cm from the surface of liquid nitrogen resulted in profitable motility and viability.

(Key words : PoongSan-dog, Semen characteristic, Glycerol, Freezing, Thawing)

I. 서 론

개에서 정액의 동결에 관한 연구는 1962년 Harrop가 처음으로 동결용해 한 정자의 생존율을 45~50%를 보고한 이후로 동결보존에 관한 많은 연구가 시작되었다. 개의 동결정액은 액상정액과 저온보존정액에 비해 낮은 운동성과 생존율을 저하 등과 같은 문제점을 가지기 때문에 대체적으로 개의 동결정액의 사용은 아직도

많이 이루어지고 있지 않은 실정이다. 그리고 동결정액에 관한 연구는 다른 축종에 비해 연구가 많이 이루어지고 있지는 않으나 원하는 시기에 편리하게 이용할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 정액의 동결보존에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. Seager(1969)의 개 정액을 동결보존하여 최초로 임신에 성공한 보고 후 여러 연구자들(Gill 등, 1960; Silva와 Versteegen, 1995; Rota 등, 1995; Petunkina 등,

Corresponding author : Bo-Sook Kim, DVM, PhD, Seoul Grand Park Zoo, Gwacheon-city, Gyeonggi-do 427-080 Korea. Tel : 02-500-7710, E-mail : kbs6666@hanmail.net

2005)에 의해서 정액의 동결방법이 다양하게 실시되어 왔다. 이 등(2003)은 개 정자의 동결 용해 후 운동성과 생존율은 희석액의 종류, 희석농도, 동결속도, 동결보호제, 평행시간, 동결 보관, 용해온도 등의 여러 가지 요인에 영향을 받는다고 하였다. 동결보호제의 종류에 대해서는 분자량이 적어서 세포내로 침투되는 투과성 동해보호제와 세포내로 침투되지 않는 비투과성 동해보호제로 구분되어지며, 투과성 또는 비투과성 동해보호제의 첨가방법 및 첨가수준은 연구자들마다 다소 차이가 있으나, 일반적으로 동결보호제로서는 glycerol이 가장 널리 이용되고 있다(이와 김, 1999). 그러나, ethylene glycol (EG, Voelkel와 Hu, 1992)과 propylene glycol (Kasai, 1991) 등도 많이 이용되고 있다. 정액 동결시 첨가하는 glycerol의 농도 역시도 연구자들에 따라서 다양하게 이루어져왔다. Rota 등(1995)은 최종농도가 5%, Tsutsui 등(2000)은 7%로 되도록 각각 첨가하여 용해 후 생존율의 효과를 보고하였으며, Morton와 Bruce (1989)는 Tris-Egg-Yolk에 동결보호제로 8% glycerol을 첨가하였을 때 정자의 운동성과 생존율이 향상되었다고 보고하였다.

본 연구에서는 풍산개의 동결정액 제조를 위해서 우선적으로 그 품종의 정액특성과 성상 등에 관하여 조사를 실시한 후, 이러한 기초 자료를 토대로 동결정액을 제조하기 위한 희석액 농도, 정자 농도 그리고 동결방법에 따라서 동결·용해 후 정자의 운동성과 생존율에 미치는 영향을 조사하고자 본 실험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험에 사용된 풍산견은 24개월 이상의 연령으로서 북한으로부터 교환받은 2두와 서울 대공원에서 번식된 1두를 비롯하여 총 수컷 3두를 공시하였다. 각각의 개체는 충분히 운동할 수 있는 쾌적한 사육장에서 개별 사육을 하였으며, 사료는 하루에 2회 급여 하였고 물은 자유급수를 실시하였다.

2. 정액채취 및 검사

정액채취는 2005년 1~3월에 주당 1~2회씩 수압법을 이용하여 18회 채취하였으며, 정액을 채취하기에 앞서 음경 주위의 이물질 제거하고 발기를 유도한 후 구선부위(bulbus glandis)에 압력을 가하여 사정을 유도 하였다. 정액은 사정 분획의 구분 없이 채취하였고 채취 직후 실험실로 운반하여 정액량, 정자농도 및 활력 등의 정액성상을 검사하였다.

3. 동결정액의 제조 및 용해

(1) 동결희석액의 조성

동결보존액인 EYT(Egg-yolk tris extender)는 Rota 등(1997)의 방법에 준하여 제조하였고 (Table 1), 정액 희석을 위해서 신선 난에서 난황을 분리하여 동결희석액에 20%(v/v) 농도로 첨가하였다. EYT I 동결희석액은 1200 × g에서 30분간 원심 분리하여 표면의 지질층을 제거하고 난황괴를 제외한 상층액을 취하여 사용하였다.

EYT II에 OEP(Equex STM, NOVA Chemical, USA) 0.5%를 첨가하였고, glycerol(Sigma, USA)은 최종농도가 각각 3, 5 및 7%가 되도록 하였다.

Table 1. Composition of freezing extenders

Components	Extender I	Extender II
Tris	2.4 g	2.4 g
Citric acid, monohydrate	1.4 g	1.4 g
Glucose	0.8 g	0.8 g
Streptomycin sulphate	0.1 g	0.1 g
Egg yolk	20 ml	20 ml
Glycerol	—	3, 5, 7 %
Equex STM paste	—	0.5 %
Distilled water	to 100 ml	to 100 ml
pH	6.53	6.48
Osmolarity	280 mOsm/kg	1.370 mOsm/kg

(2) 정액 동결과 융해

채취된 정액의 정자를 회수하기 위해서 원심 분리기에서 700×g에서 3분간 원심 분리를 하여 상층액을 제거한 후 정자의 펠렛을 회수하여 사용하였다. 미리 준비한 EYT I 으로 1차 희석하여 4℃까지 냉각시킨 후 동일온도에서 EYT II로 다시 희석하였다. 그리고 glycerol과 희석된 정액을 혼합하여 5℃에서 약 20분간 평형시킨 후 0.25ml straw당 총 정자수는 20~50×10⁶ 되게 충전하였다. 충전된 스트로우는 액체질소 표면 5, 7 및 10cm 위에서 10분간 예비 동결을 시킨 후 액체질소에 침지하여 동결보존하였다. 동결정액의 융해방법은 38℃-20초, 47℃-15초 및 57℃-10초간 융해하여 정액의 검사를 실시하였다.

(3) 정자의 생사염색

정자의 생사염색은 Tsutsui 등(2002)의 방법에 준한 Eosin-nigrosin staining 이용하여 실시하였다. 각각 융해온도에 따라 정액을 융해하여 washing media을 이용하여 600×g에서 5분간 2회 원심 분리하여 정자펠렛을 회수한 후 검사에 적합한 농도로 생사염색을 실시하였다.

(4) 동결정액의 CASA 분석

정액의 운동성분석은 CASA(Computer Assisted Sperm Analysis ; SAIS plus version 10.1, Medical Supply, Korea)로 조사하였다. 동결 후 융해한 정자는 washing media로 처리 후 정액 10 μl를 미리 38℃로 가온 된 Maker Counting Chamber (Sefi medical instrument, Israel) 위에 떨어뜨린 후 Takagi 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 조사항목은 운동성(motility, %), 곡선운동속도(Curve Linear Velocity: VCL, μm/sec), 직선운동속도(straight line velocity: VLS, μm/sec), 평균 경로속도(average-path velocity: VAP, μm/sec) 곡선경로 선형도(linearity: LIN)를 평가하였다.

(5) 통계처리

본 실험에 의해 얻어진 정자의 동결·융해 후 정자의 검사 결과에 대한 유의성 (P<0.01) 검정은 SAS program의 Duncan's multiple range

test로 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 풍산개의 정액 성상

풍산개의 정액성상을 조사하기 위하여 정액 채취를 시도하여 원정액의 성상과 운동성 및 생존율을 검사한 결과는 Table 2와 같다. 정액량은 평균 5.9 ml, 정액농도는 ml당 116.3×10⁶ sperm/ml, 총정자수는 489.3×10⁶ sperm, 원정액의 운동성은 88.7±7.2%였으며, 생존율은 87.6±7.8%였다.

이와 같은 정액량의 결과는 Pena 등(1999)이 중형견의 실험에서 보고한 3.4ml과 김 등(2002)의 진도개에서 보고한 3.8ml 보다 정액량은 많았다. 정액농도에서는 Pena 등(1999)은 ml당 정자수는 260.8×10⁶ sperm/ml과 김 등(2002)의 진도개에서는 145.6×10⁶ sperm/ml의 농도를 보였으나 본 연구에서는 116.3×10⁶ sperm/ml 였다. 한편 본 연구에서 총정자수는 489.3×10⁶ sperm로서 진도개의 결과인 396.2×10⁶ sperm 보다는 높은 결과였으나, Rota 등(1995)이 보고한 916×10⁶ sperm 보다는 낮은 결과를 나타내었다. 그리고 정자의 운동성 조사보고에 의하면 김 등(2002)은 진도개에서는 직진하는 정자의 운동성은 79.7%였으며, Rota 등(1997)은 82.1%의 결과를 보고하였다. 이러한 결과와 본 실험 결과 88.7%와 비교하면 본 실험의 연구결과에서 높은 정자의 운동성을 알 수 있었다. 생존율에서도 이와 비슷한 결과를 보였다. 채취된 정액량과

Table 2. Characteristics of fresh semen in Poong-san dog(n=18)

Characteristics	Mean ± SD
Volume (ml)	5.9 ± 3.7
Concentration (×10 ⁶ /ml)	116.3 ± 125.7
Total sperm (×10 ⁶)	489.3 ± 63.6
Motility (%)	88.7 ± 7.2
Viability (%)	87.6 ± 7.8

정자수에 있어서 연구자들간의 다소 차이가 있는 것은 공시된 개의 품종 또는 연령 등의 변이성과 채취된 정액의 명확한 분획별 구분의 정확이 없었기 때문인 것으로 사료된다.

2. 4℃의 저온보존시 glycerol 농도에 따른 운동성

Egg-yolk 희석액에 glycerol 3, 5 및 7%의 농도별 평형이 완료된 4℃ 저온보존된 상태에서 6일간 운동성을 검사한 결과는 Table 3과 같다. glycerol 평형이 완료된 저온보존된 정자의 운동성은 glycerol 농도별로 83.2±4.4%, 84.7±3.9% 그리고 85.0±4.5%의 결과를 각각 나타내었다. glycerol의 농도가 5%와 7%일때 정자의 운동성이 glycerol 3% 농도의 결과보다 다소 높은 경향을 나타내었다. 이와 유사한 결과는 Yildiz 등(2000)이 보고한 내용으로서 저온보존시 평형이 완료된 후 정자의 활력이 62.1~75.7%의 결과를 나타내어 본 실험의 결과와 많은 차이를 보였으며, 저온보존 시간이 길어질수록 정자의 운동성도 떨어지는 결과를 나타내었으나, glycerol 7% 농도에서는 2, 4, 5 및 6일간의 저온 보관에서 정자의 운동성이 다른 두 처리구 3, 5% glycerol 농도와 비교할 때 유의적으로(P<0.01) 높은 결과를 얻을 수 있었다.

Rota 등(1997)은 EYT-G 희석액을 이용하여 glycerol 5% 첨가한 처리구에서 평형이 완료 후 운동성은 82.9%로 본 실험의 84.7%와 유사한 결과를 보였으며, 또한 Hewitt 등(2001)은 동결 전 저온보존된 정자의 운동성에서 glycerol 4%

처리구가 2, 6 및 8% 처리구 보다 높은 결과를 보고하였다. 본 연구에서는 4일째부터 7% glycerol 농도 처리가 3% 및 5% glycerol 처리 보다 운동성이 유의적으로 높게 관찰되었다. Tsutsui 등(2002)은 4℃에서 정액을 저온보존하여 검사한 결과 4일째 운동성은 68.3±6.6%, 그리고 생존율 92.3±0.7%의 결과를 나타내었는데 이러한 정자를 이용하여 인공수정을 실시한 결과 83.3%의 수태율을 보였으며, 7일째는 운동성과 생존율은 18.3±3.4%와 86.4±4.0%의 결과를 각각 나타내었다. 그리고 인공수정의 결과에서 정자의 운동성은 낮은 경향이었으나 수태율은 33.3%의 결과로 수태율에는 영향을 미치지 않는다고 하였다.

이상의 결과를 살펴보면 4-7일간 저온처리한 정액을 이용하여 인공수정에 이용이 가능하며, 또한 저온보존시 glycerol 처리농도에 따른 결과가 다르게 나타나는 이유는 개 품종들간 및 각 개체간의 특성의 차이가 있는 것으로 추측할 수 있다. 이러한 이유로 인하여 보다 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 보인다.

3. 예비동결 높이에 따른 정자의 운동성 및 생존율

풍산개의 정액을 동결보존하기에 앞서 각기 다른 예비동결 높이의 조건으로 실험을 실시한 결과를 보면 액체질소 표면으로부터 5, 7 및 10cm 높이에서 각각 10분간 노출시킨 후 액체질소에 완전 침지하여 일정 기간동안 액체질소에 보관된 정액을 38℃-20초, 47℃-15초 및

Table 3. Percentage of sperm motility according to different glycerol concentration in EYT-GE extender

Glycerol concentration	Sperm motility(%)						
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
3 %	83.2±4.4 ^a	75.3±5.6 ^a	68.0±6.4 ^a	62.1±7.3 ^a	55.0±7.6 ^a	46.2±9.3 ^a	35.5±9.5 ^a
5 %	84.7±3.9 ^a	76.7±5.3 ^a	70.1±7.0 ^a	63.6±6.8 ^a	56.5±7.0 ^a	48.1±8.5 ^a	38.0±8.9 ^a
7 %	85.0±4.5 ^a	78.5±5.8 ^a	73.2±5.4 ^b	67.5±5.8 ^a	60.3±6.5 ^b	52.7±8.2 ^b	42.8±8.7 ^b

^{a, b} Means with different superscripts in the same column differ significantly (p<0.01).

57℃-10초의 조건으로 용해하였을 때 정액의 운동성과 생존성에 대한 결과는 Table 4와 5에 나타나 있으며, 동결용해후 운동성 측정은 CASA를 이용하여 전진운동율과 운동속도를 측정 한 결과는 Table 4와 같다. 예비동결 높이에 따른 동결용해 후 정자의 운동성은 예비동결 5cm 높이, glycerol 7% 그리고 용해온도 52℃에

서 용해하였을 때 51.4±11.6%의 결과를 보였고, 7cm 처리구에서 glycerol 7%, 38℃에서 용해 시 52.7±10.6%를 나타내었으며 그리고, 10cm 처리구에서는 glycerol 7%와 용해온도 38℃에서 54.4±10.8% 일때 높은 운동성을 보였다. Okano 등(2004)은 희석액의 glycerol 최종농도를 8%로 하여 예비동결을 실시 할 경우는

Table 4. Change of sperm motion parameter among freezing rate, glycerol concentration and thawing temperature

Height (cm)	Thawing temperature (℃)	Glycerol concentration (%)	MOT (%)	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	VAP (μm/s)	LIN (%)
5	38	3	38.9± 8.2 ^a	72.9±14.5	64.1±15.9	62.1±17.4	61.9±12.3
		5	44.5±10.4 ^b	73.8±14.8	67.3±18.2	65.1±18.5	63.3±14.1
		7	49.4± 8.9 ^c	73.7±13.5	68.2±16.3	66.8±17.8	65.8±13.0
	47	3	37.9± 9.3 ^a	79.7±11.9	69.0±14.7	68.4±17.0	66.1±10.8
		5	44.8±11.7 ^b	76.8±12.4	71.5±13.8	70.8±13.9	66.2±13.5
		7	49.3±10.0 ^c	76.4±12.7	70.0±14.1	70.7±14.4	65.9±12.3
	52	3	38.6± 9.3 ^a	78.9±14.6	74.7±13.1	71.1±13.3	66.7±11.6
		5	42.0± 9.6 ^b	77.2±12.3	70.1±14.1	71.0±13.2	66.3±11.0
		7	51.4±11.6 ^c	76.6±13.5	69.1±13.7	72.3±12.8	68.9±11.3
7	38	3	39.3± 8.0 ^a	78.8±11.5	68.4±15.4	70.0±16.0	65.9±11.0
		5	48.2±13.1 ^b	77.8±13.0	71.4±14.8	72.0±15.4	68.9±14.1
		7	52.7±10.6 ^c	79.4±13.2	70.3±14.2	71.5±13.7	67.8±12.1
	47	3	37.2± 6.7 ^a	78.1±11.5	73.6±12.3	70.0±13.4	68.4±12.0
		5	45.8± 9.4 ^b	78.6±11.4	69.8±14.3	69.0±14.0	64.4±11.7
		7	50.9±11.7 ^c	76.7±12.4	69.3±16.0	66.9±15.0	68.7±13.2
	52	3	38.1± 8.2 ^a	80.0±13.6	69.6±13.3	69.4±14.1	66.1±12.1
		5	43.7± 9.0 ^b	80.2±10.8	71.6±14.5	69.4±13.4	65.5±13.2
		7	49.6±11.1 ^c	77.3±14.5	70.0±13.9	68.7±15.0	65.5±11.2
10	38	3	36.6± 8.0 ^a	79.3±12.0	69.2±15.1	68.3±14.1	66.7±11.7
		5	46.0±10.3 ^b	78.1±11.9	71.1±13.3	69.0±12.5	64.6±13.0
		7	54.4±10.8 ^c	76.9±12.9	74.6±13.8	73.3±11.9	67.0±12.6
	47	3	36.3± 5.6 ^a	79.5±11.8	64.4±15.3	67.9±12.6	69.9±11.3
		5	45.0±11.0 ^b	78.4±11.3	73.6±12.0	70.4±12.3	66.0±12.1
		7	48.6± 9.5 ^c	77.4±12.8	71.4±14.1	69.7±13.3	66.3±14.6
	52	3	34.4± 6.9 ^a	81.3±10.8	69.9±14.1	69.3±13.4	68.6±10.9
		5	42.4± 8.0 ^b	77.2±12.1	69.3±13.7	67.7±13.7	65.7±13.0
		7	51.1±11.0 ^c	75.1±14.5	70.4±14.8	71.0±14.5	68.2±12.1

* MOT : motility, VCL : curve linear velocity, VSL : straight line velocity, VAP : average path velocity, LIN : linearity.

^{a,b,c} Means with different superscripts in the same column differ significantly (p<0.01).

Table 5. Change of sperm viability with different distance of freezing glycerol concentration and thawing temperature

Height (cm)	Glycerol concentration (%)	Thawing temperature (°C)/ Viability of sperm (%)		
		38°C	47°C	52°C
5	3	44.3± 8.5 ^a	41.3±7.3 ^a	40.3±7.3 ^a
	5	47.5± 6.0 ^b	48.4±8.2 ^b	48.5±8.4 ^b
	7	57.8± 9.8 ^c	48.8±6.8 ^b	50.3±6.2 ^b
7	3	40.3± 8.4 ^a	43.9±9.2 ^a	42.1±7.0 ^a
	5	49.3± 5.5 ^b	49.2±5.5 ^b	49.4±7.8 ^b
	7	57.7±10.3 ^c	51.3±6.6 ^b	51.7±7.0 ^b
10	3	43.6± 7.8 ^a	43.9±9.2 ^a	43.1±6.2 ^a
	5	50.0± 7.1 ^b	48.0±6.4 ^b	49.6±7.1 ^b
	7	50.2± 5.5 ^b	48.9±5.3 ^b	50.8±5.7 ^b

^{a,b,c} Means with different superscripts in the same column differ significantly (p<0.01).

액체질소 표면에서 8cm 높이에서 정액 스트로우를 노출한 후 동결보존하여 38°C에 용해한 결과 53.8 ± 5.5%의 운동성을 보고하여 본 실험과 비슷한 경향을 보였다. Ivanova-Kicheva 등 (1995)은 용해온도에 따른 정자의 운동성에서 38°C와 55°C에서 용해 하였을 때 26.1±0.6%와 29.3 ± 0.6%로서 55°C에서 용해한 것이 다소 높은 경향을 보였다.

Table 5는 각기 다른 조건으로 동결된 정액을 용해 온도를 다르게 하였을 때 용해 후의 생존율을 조사한 결과이다. 예비동결 높이를 5cm를 유지하고 glycerol 농도는 3, 5% 그리고 7%의 농도로 동결한 정액의 용해온도를 38°C 온수에서 용해한 결과는 44.3±8.5%, 47.5±6.0% 및 57.8±9.8%로 각각 결과를 보였는데 동일한 높이에서 glycerol의 농도가 7%일 때의 결과가 다른 처리구에 비하여 유의적으로(P<0.01) 높은 생존율을 보였다. 그러나 47°C와 52°C일 때는 두 처리구 5%, 7% glycerol 농도에서 생존율은 유의적인 차이는 없었으나 3% 농도 보다는 유의적으로(P<0.01) 높은 결과를 보였다. 그리고 예비동결 높이를 7cm를 유지하고 glycerol의 각각의 농도별로 동결하여 용해한 정액의 생존율은 38°C일 때 7%의 glycerol 농도에서 57.7%의 결과를 보여 다른 두 처리구에서 보다 유의적

으로(P<0.01) 높은 생존율을 보였으며, 47°C와 52°C에서 용해한 결과는 5%와 7% glycerol 농도에서 3% glycerol 농도보다 유의적으로(P<0.01) 높은 결과를 나타내었다. 그러나 5% 7% 두 처리구 간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 예비동결 높이 10cm, 그리고 glycerol 농도를 3, 5% 그리고 7%로 하여 동결·용해 후 생존율의 결과는 용해온도 38°C, 47°C 및 52°C에서 용해 하였을 때 생존율은 3%보다 5%, 7%의 glycerol 농도에서 유의적으로(P<0.01) 높은 경향을 보였다. 그러나 5%와 7% glycerol 농도와 용해온도 간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 Tsutsui 등(2000)이 보고한 동결희석액 내에 glycerol 농도가 7%일 때 동결용해 후 정자의 생존율이 60.3±3.5%의 결과를 나타내었는데 이러한 결과는 본 실험에서 예비동결 높이에 따라서 각각의 3종류의 glycerol 농도를 사용하였고, 또한 3가지 방법의 용해 조건으로 용해 하였을 때 생존율에서도 glycerol의 농도가 7%일 때가 상대적으로 높은 결과를 나타내어 Tsutsui 등(2000)이 보고한 것과 비슷한 결과를 나타내었다. 한편 이 등(2003)은 정액 용해 온도를 37°C에서 용해하였을 때 다른 처리구인 27°C, 47°C 및 57°C에 비하여 생존율이 높다고 보고하였다.

이러한 연구결과를 살펴보면 개 정액의 동결을 위해서 사용되는 동결보호제 glycerol의 농도는 7%가 적당하며 정액의 용해 온도는 38°C에서 개 동결정액을 용해하였을 때 생존성이 비슷한 결과를 나타냈다.

IV. 요약

본 연구는 풍산개 동결정액 제조기술을 정립하기 위하여 정액성상과 정액 동결 시 희석액에 첨가되는 Glycerol 농도, 동결속도, 용해온도와 시간에 따라 정액의 운동성과 생존율 및 CASA를 이용한 운동성 등에 대하여 조사하여 최적의 동결조건을 확립하기 위해 실시하였다.

1. 풍산개의 평균 정액량 5.9ml, 정액농도 116.3 × 10⁶ sperm/ml 총정자수 789.3 × 10⁶ sperm, 운동성 88.7 ± 1.77% 및 생존율 87.6 ± 1.85% 였다.

2. 1차 희석액을 상온에서 희석 후 상온에서 4°C까지 하강시킨 후 glycerol 농도가 3%, 5% 및 7% 첨가된 2차 희석액을 희석 후 6일간 운동성을 측정된 결과 5일째 3%일 때 46.2 ± 9.3%, 5% glycerol에서는 48.1 ± 8.5% 및 7%일 때 52.7 ± 8.2%로 glycerol 7%가 유의적으로 높은 운동성을 나타냈다.

3. 각기 다른 glycerol 농도를 함유한 동결보존액에서 동결보존 후 용해하였을 때 7%의 glycerol 농도에서 각각 52.7%와 57.7 ± 10.3%로서 다른 처리구에 비해 유의적인(P<0.01) 운동성 및 생존율을 나타냈다.

4. 정액을 동결함에 있어 예비동결시 5·7 및 10cm의 높이에서 정치시킨 후 동결을 실시하였을 때 액체질소의 표면 7cm의 높이에서 동결을 실시한 처리구에서 전체적으로 유의한 운동성과 생존율을 나타냈다.

V. 인용 문헌

1. Gill, H. P., Kaufman, C. F., Foote, R. H. and Kirk, R. W. 1960. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored and frozen semen. *Am. J. Vet. Res.* 31:1807-1813.
2. Harrop, A. E. 1962. Artificial insemination in the

- dog. In: *The semen of animals and artificial insemination.* J. P. Maule, ed. Commonwealth Agri. Bureaux, Farnham Royal, England. 186-189.
3. Hewitt, D. A., Leahy, R., Shwldon, I. M. and England, G. C. W. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci* 67:101-111.
4. Ivanova-Kicheva, M. G., Subev, M. S., Bobadov, N. D., Dacheva, D. P. and Rouseva, L. A. 1995. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology* 44:563-569.
5. Morton, D. B. and Bruce, S. G. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dog. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 39:311-316.
6. Nothlig, J. O. and Shuttleworth, R. 2005. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology* 15;63:1469-80.
7. Okano, T., Murase, T., Asano, M. and Tsubota, T. 2004. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J. Vet. Med. Sci.* 66:1359-1364.
8. Petrunkina, A. M., Gropper, B., Topfer-Petersen, E. and Gunzel-Apel, A. P. 2005. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology* 15;63: 1390-406.
9. Pena, A., Johannisson, A. and Linde-Forsberg, C. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52:965-960.
10. Platz, C. C. and Seager, S. W. 1977. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab. Anim. Sci.* 27:1013-1016.
11. Rota, A., Frishling, A., Vannozi, I., Camillo, F. and Romagnoli, S. 2001. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J.*

- Reprod. Fertil(Suppl.) 57:377-381.
12. Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. 1997. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. Theriogenology 47:1093-1101.
 13. Rota, A., Strom, B. and Linde-Forsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored 4°C. Theriogenology 44:885-900.
 14. Seager, S. W. 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. AI Digest. 17:6-7.
 15. Silva, L. D. M. and Versteegen, J. P. 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. Theriogenology 44:571-579.
 16. Takagi, H., Kurihara, A., Inoue, T., Nakamura, I. and Kimura, M. 2001. Investigation of usefulness of sperm analyses in dog for male fertility study. Toxicological Sci. 25:313-321.
 17. Tsutsui, T., Hase, M., Tanaka, A., Fujimura, N., Hori, T. and Kawakami, E. 2000. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of Orvus ES Paste-supplemented egg yolk tris-fructose citrate. J. Vet. Med. Sci. 62(6):603-6006.
 18. Tsutsui, T., Tezuka, T., Mikasa, Y., Sugisawa, H., Kiriara, N., Hori, T. and Kawakami, E. 2003. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. J. Vet. Med. Sci. 65(3): 307-312.
 19. Voelkel, S. A. and Hu, Y. X. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. Theriogenology 37: 687-697.
 20. Yildiz, C., Kaya, A., Akoy, M. and Tekeli, T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of spermatozoa during freezing. Theriogenology 54:579-585.
 21. 이영락, 이성립, 강태영, 최상용. 2003. 개 정자의 동결융해 후 생존성 및 침체의 변화. 한국수정란 이식학회지. 18:151-159.
 22. 이장희, 김인철. 1999. 돼지정자의 동결융해 후 활력 및 생존성에 대한 보존액, 동해보호제, 예비동결 및 동결처리시간의 영향. 한국동물번식학회지. 23:165-174.
 23. 이제첩, 박향, 박흥대, 김재명. 2003. 개 정자의 동결보존에 있어서 Glycerol 농도, 동결 및 융해 속도가 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지. 18:195-201.
 24. 김홍률, 이계웅, 공일근. 2002. 진도개 동결정액 제조를 위한 정액성상과 동결정액의 운동성에 관한 연구. 한국동물번식학회지. 26:253-261.
- (접수일자 : 2007. 2. 5. / 채택일자 : 2007. 9. 10.)