

액상 보존액 내 동결 보호제가 4°C에 보관된 액상 돼지 정액의 운동성과 생존성에 미치는 효과

전유별^a, 박광우^a, 광성성, 정승아, 윤준철, 현상환^{*}
충북대학교 수의과대학

The Effects of Cryoprotectants on Motility and Viability Kinetics of Liquid Boar Semen at 4°C

Yubyeol Jeon^a, Kwang-Woo Park^a, Seong-Sung Kwak, Seung-A Jeong, Jun-Chul Yoon and Sang-Hwan Hyun^{*}

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the motility and kinematics of boar sperm that while stored at 4°C. The samples of fresh boar semen were placed into an extender, Androhep, and stored at 4°C. In three of these samples, cryoprotectants were added. The sperm's motilities and kinematics were evaluated by using microscope (×400) and the viability status was evaluated by using with eosin staining method. The 5 sample groups are; Group A: Androhep (extender), stored at 17°C. Group B: Androhep (extender), stored at 4°C. Group C: Androhep (extender), + 3% glycerol (cryoprotectant), stored at 4°C. Group D: Androhep (extender), + 3% DMSO (cryoprotectant), stored at 4°C. Group E: Androhep (extender), + 3% ethylene glycol (cryoprotectant), stored at 4°C. In group A, the sperm's motility was reduced. On day one the sperm's motility was (85.7 ± 2.3) and day 5 the motility was (43.9 ± 3.3). In group B, C and D the sperm's motility were reduced to 0 on day 5. In group E the sperm's percentage of motility decreased. On day one the sperm's motility was (42.0 ± 0.5) and day 5 the motility was (2.3 ± 0.3). When comparing cryoprotectant in samples of boar sperm there is a slight improvement in the results when the use of Androhep Lite (extender), + 3% ethylene glycol (cryoprotectant), stored at 4°C are used. Based on these results, ethylene glycol can protect sperm from heat shock at 4°C, but not satisfactory level. However, it showed the possibilities of liquid semen preservation at 4°C by using cryoprotectant.

(Key words : 4°C, boar semen, storage time, cryoprotectant, heat shock)

서론

지난 수년간 돼지 액상 정액(liquid semen)의 보급율은 크게 향상되어 왔으며, 양돈 산업과 돈육 생산의 상업적, 경제적 인 가치가 증가하면서 인공수정 시 사용되는 정액의 중요성이 점차 강조되고 있다. 동결 정액은 경제 형질이 우수한 계통의 개량과 보존에 이용될 수 있으며, 보존성이 짧은 액상 정액의 문제점을 보완할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 현재 동결 정액을 이용한 인공수정은 액상 정액과 비교하여 수태율과 산자수에 있어서 만족할 수준에 미치지 못하고 있다(김과 송, 2005). Taurine 등 항산화제를 이용한 정액 동결법(김 등, 2005)이 보고된 바 있으나, 아직 많은 양돈 농가에

서는 인공수정을 위한 액상 정액을 사용하여, 다양한 액상 정액용 희석액이 개발되고 있다. 한 등(1992)은 돼지 정액 보존을 위한 다양한 Egg Yolk/Glucose, IVT, BL-1, Zorlesce 및 Reading 희석액 개발 개요 설명 및 액상 정액의 정자 농도에 따른 수정 능력에 관한 보고를 한 바 있으며, 최근에는 Beltsville Thawing Solution(BTS) 및 Androhep 등이 널리 사용되고 있다(박 등, 2010).

이상의 희석액들은 모두 15~18°C에서 보존하면서 사용하도록 되어 있어 일상적으로 사용하는 4°C 냉장고 보존이나, 계절에 따른 실온 보존이 어렵다. 또한 Reading 희석액이나 Androhep을 제외한 액상 정액의 보존기한이 모두 3일 정도로 짧은 것이 문제점으로 나타났다. 액상 정액의 보존 기간은

^{*} 이 논문은 2011년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

^a Co-first authors

^{*} Correspondence : E-mail : shhyun@cbu.ac.kr

보존액에 따라 다르겠지만, 3일까지는 그 운동성의 변화가 미비하지만 3일 이후부터는 정자의 운동성과 정상 침체율이 감소하는 단점이 있다(조 등, 2006). 실제적으로 보존 기간이 진행됨에 따라 번식 능력이 저하되는 현상은 장기간 보존액을 사용한다고 하더라도 막을 수는 없다. 다만 이러한 액상 정액 및 완충제를 이용함으로써 정액성상과 번식 능력의 저하를 막는 것으로 생각된다. 보통 돼지 액상 정액을 장기간 보존(3~5일)하기 위하여 저온 충격을 받지 않는 온도인 17°C에 보존하는 것이 일반적인 방법이나 동일한 방법으로 제조된 액상 정액을 4°C에 보관하였을 때(이때 보존액에 2~3% glycerol 첨가)와 비교하여 정액성상을 비교하였을 때는 보존 온도 간에는 차이가 없었다(김 등, 2001). 따라서 현장에서 실생활에 쓰이는 냉장고를 사용하였을 때는 4°C에 보관하는 것이 가능하다면 현장에서는 보다 용이한 방법이 될 것이다. 실질적으로 동결 보호제는 동결 보존한 정액에 필요하지만, 4°C 액상 정액의 보존에도 효과가 있음이 나타났기에(김 등, 2005) 동결 보호제의 저온의 액상 정액의 보존에 대한 효과를 확인할 필요성이 있다. 동결 보호제의 종류에는 세포 내·외 침투성 및 비침투성 보호제가 있는데, 세포 내 침투성 동결 보호제로는 분자량과 독성이 적고 세포 내에 침투성이 강한 ethylene glycol이 있다. 이와 비슷한 동결 보호제로 사용되고 있는 것으로는 DMSO, glycerol이 있다. 단 ethylene glycol은 DMSO보다도 세포막을 천천히 침투하는 특성을 지니기 때문에 침투 계수가 다른데 동결 보호제의 침투 정도로 인한 정자의 생존성이 좌우되기도 할 것이다(김 등, 2005; 김 등, 2001).

이에 따라 본 연구에서는 일반적으로 많이 쓰이는 보존액인 Androhep에 다양한 동결 보호제를 처리하였을 때 4°C 냉장고에서 보존 기간에 따른 활성도 및 생존 여부를 이용한 정액성상 변화를 조사하여 어떠한 방법이 가장 효율적인지 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 정액의 채취

공시동물은 경기도 축산위생연구소에서 사육되고 있는 랜드레이스 종을 사용하였다. 채취된 정액은 정자 농도 $3.0 \times 10^9/100$ ml로 Androhep 보존액에 희석하여, 밀폐 컨테이너 박스에서 17°C로 보관하였다.

2. 액상 정액 제조 및 동결 보호제 첨가에 따른 각 시험군별 정액의 처리

액상 정액의 제조에 사용된 Androhep 보존액의 성분은 Table 1과 같다. 동결 보호제가 정자에 미치는 영향을 비교 관찰하기 위해 glycerol, DMSO, ethylene glycol을 처리하는 시험군

Table 1. Composition of Androhep

Ingredients	(g/l)
Glucose	26.00
Sodium citrate	8.00
Sodium bicarbonate	1.20
EDTA	2.10
BSA	2.50
Hepes	9.50

을 설정하였다. Androhep 보존액에 각각 glycerol, DMSO, ethylene glycol을 주입 후 혼합하였다. 다음 17°C에 맞춘 후 보관한 정액을 각각의 그룹으로 나누어 최종적으로 각각의 그룹에 3% 농도로 동결 보호제를 처리하였다. 실험 그룹은 17°C에서 보관하는 무처리 정액(Control Group), 4°C에서 보관하는 무처리 정액(Group A), 4°C에 보관하고 glycerol 3%처리한 정액(Group B), 4°C에 보관하고 DMSO 3% 처리한 정액(Group C), 4°C에 보관하고 ethylene glycol을 3% 처리한 정액(Group D)로 설정하였으며, 17°C에서 4°C로 온도 감소 시 정액을 15 ml 튜브에 넣은 후 마개를 닫고 바깥쪽에 얼음물을 채워서 2시간에 걸쳐서 서서히 4°C로 낮추어 저온 충격에 의한 손실을 최소화 하였다.

3. 정액의 평가

1) 운동성 평가

처리된 정액들은 1 ml 튜브에 200 μ l씩 넣고 39°C의 PBS (phosphate buffered saline) 200 μ l를 첨가한 후 39°C의 water-bath에 1분간 침지시켰다. 그 후 39°C로 가온된 슬라이드 글라스에 정액 10 μ l를 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮어 정자활성도를 400배 광학현미경에서 육안으로 관찰하였다. 각 실험군별로 100개의 정자를 세어서 평가하였다. 그리고 운동의 정도에 따라 5단계로 나누어 평가하였다(+++: 매우 활발한 전진 운동, ++: 활발한 전진 운동, +: 완만한 전진 운동, +/-: 선회 또는 진자 운동, -: 운동하지 않는다.). 여기에 각 부호별로 일정한 계수를 부여하여 정자의 생존지수를 계산하였다. 이렇게 계산된 생존 지수는 정액의 정자의 생존율과 생존지수의 활력의 정도를 동시에 나타내고 있다.

2) 염색에 의한 평가

Eosin에 의한 염색은 김 등(2000)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, semen sample 100 μ l와 0.5% eosin 100 μ l를 섞은 뒤 약 30초 후에 5 μ l를 취하여 미리 세척해 둔 슬라이드 글

라스에 smearing 하였다. 또한 이 smearing 과정 중에는 정자가 사멸하여 염색되는 것을 방지하기 위하여 통풍을 가하여 빨리 건조시켰다. 각 실험군별로 100개의 정자를 세어서 평가하였다. 또한 염색에 의한 평가 시 Eosin으로 염색한 경우에는 정자두부가 Eosin 특유의 붉은 빛을 나타내는 것을 사멸 정자로 산정하였다(Fig. 1).

4. 통계 분석

통계 분석은 통계 분석 프로그램(SPSS Version 14.0, USA)을 이용하였으며, 일원 분산 분석을 실시하여 보존 기간 동안 희석액에 따른 정자의 변화를 비교 분석하였다. $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

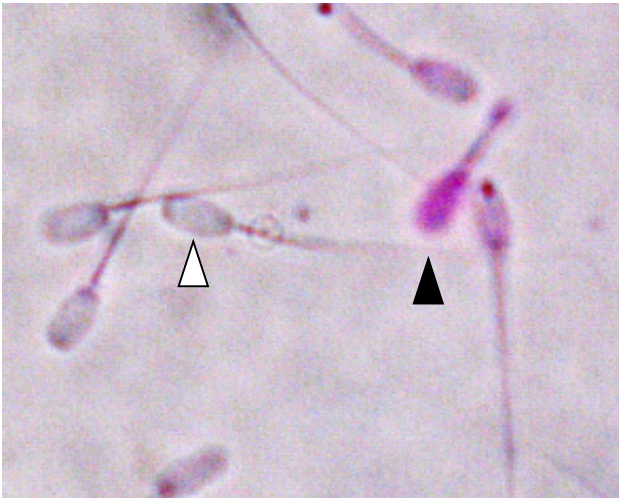


Fig. 1. Differentially stained sperm by eosin staining. clear sperm head(△) : alive sperm, stained pink sperm head(▲) : dead sperm.

결 과

1. 4°C 냉장 보존 시 동결 보호제 첨가에 따른 정자의 운동성 변화

보존 기간 5일 동안 매일 정자의 운동성 변화를 비교 측정하였다. 정자의 운동성 변화 양상은 Table 2와 같다. 정자의 운동성은 첨가된 동결 보호제의 종류와 보존 온도에 따라 유의적인 차이가 발생하였다. 전체 보존 기간 동안 동결 보호제 첨가 없이 17°C에서 Androhep 보존액에 보존(Control group)한 정자가 동결 보호제를 첨가하여 4°C 냉장 보존한 정자들에 비해 운동성이 높았다. 동결 보호제를 첨가하여 4°C 냉장 보존한 정자들간에도 차이가 나타났는데, 1일째부터 3일째까지 ethylene glycol을 3% 첨가한 액상 정액(Group D)의 정자 운동성은 42.0%에서 21.7% 감소하였지만, 25.0%에서 10.7%로 감소한 동결 보호제를 첨가하지 않고 4°C 냉장 보존한 액상 정액(Group A)의 운동성보다 유의적으로 높게 관찰되었다. 반면, 다른 동결 보호제를 첨가한 액상 정액의 정자 운동성은 3% glycerol을 첨가한 정액(Group B)에서 25.0%에서 7.7%로 감소, 3% DMSO를 첨가한 정액(group C)에서 23.0%에서 12.0%로 감소하는 양상을 나타내어 동결 보호제를 첨가하지 않고 4°C 냉장 보존한 액상 정액(Group A)의 운동성과 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

2. 4°C 냉장 보존 시 동결 보호제 첨가에 따른 정자의 생존율 변화

보존 기간 5일 동안 매일 정자의 생존율 변화를 비교 측정하였다. 정자의 생존율 변화 양상은 Table 3과 같다. 정자의 생존율은 첨가된 동결 보호제의 종류와 보존 온도에 따라 유의적인 차이가 발생하였다. 전체 보존 기간 동안 동결 보호제 첨가 없이 17°C에서 Androhep 보존액에 보존(Control group)

Table 2. Effect of cryoprotectants on motility in liquid boar semen

Group	Duration of preservation (Day)						
	0	1	2	3	4	5	
Control	90	85.7 ± 2.3 ^a	68.0 ± 2.1 ^a	52.3 ± 0.9 ^a	42.3 ± 0.9 ^a	40.3 ± 0.3 ^a	
Motility (mean ± SE %)	A	90	25.0 ± 1.7 ^c	11.0 ± 0.6 ^c	10.7 ± 1.2 ^c	5.0 ± 0.6 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
	B	90	25.0 ± 0.6 ^c	8.7 ± 0.9 ^c	7.7 ± 1.2 ^c	3.3 ± 0.9 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
	C	90	23.0 ± 1.5 ^c	22.7 ± 0.9 ^c	12.0 ± 0.6 ^c	5.7 ± 0.7 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
	D	90	42.0 ± 0.6 ^b	32.0 ± 0.6 ^b	21.7 ± 0.3 ^b	10.3 ± 0.3 ^b	2.3 ± 0.3 ^b

Three replicates.

Within the same column, values with different superscripts letters (a~c) were different ($p < 0.05$).

Control: Androhep only (17°C), A: Androhep only (4°C), B: Androhep + 3% glycerol (4°C), C: Androhep + 3% DMSO (4°C), D: Androhep + 3% ethylene glycol (4°C).

Table 3. Effect of cryoprotectants on viability in liquid boar semen

	Group	Duration of preservation (Day)					
		0	1	2	3	4	5
Motility (mean \pm SE %)	Control	90	89.3 \pm 1.2 ^a	76.7 \pm 1.7 ^a	65.0 \pm 2.9 ^a	46.0 \pm 1.5 ^a	37.3 \pm 1.5 ^a
	A	90	35.7 \pm 1.8 ^c	19.3 \pm 0.7 ^c	17.7 \pm 1.5 ^c	10.3 \pm 0.3 ^c	0.0 \pm 0.0 ^b
	B	90	35.0 \pm 1.0 ^c	17.3 \pm 0.3 ^c	14.3 \pm 1.3 ^c	8.3 \pm 0.9 ^c	0.0 \pm 0.0 ^b
	C	90	28.3 \pm 1.7 ^c	14.0 \pm 1.5 ^c	12.0 \pm 1.5 ^c	9.3 \pm 0.9 ^c	0.0 \pm 0.0 ^b
	D	90	43.3 \pm 0.9 ^b	33.0 \pm 0.6 ^b	25.3 \pm 1.5 ^b	16.0 \pm 1.5 ^b	8.0 \pm 0.6 ^b

Three replicates.

Within the same column, values with different superscripts letters (a~c) were different ($p < 0.05$).

Control: Androhep only (17°C), A: Androhep only (4°C), B: Androhep + 3% glycerol (4°C), C: Androhep + 3% DMSO (4°C), D: Androhep + 3% ethylene glycol (4°C).

한 정자가 동결 보호제를 첨가하여 4°C 냉장 보존한 정자들에 비해 생존율이 높았다. 동결 보호제를 첨가하여 4°C 냉장 보존한 정자들간에도 차이가 나타났는데, 1일째부터 3일째까지 ethylene glycol을 3% 첨가한 액상 정액(Group D)의 정자 생존율은 43.3%에서 25.3% 감소하였지만, 35.7%에서 17.7%로 감소한 동결 보호제를 첨가하지 않고 4°C 냉장 보존한 액상 정액(Group A)의 운동성보다 유의적으로 높게 관찰되었다. 반면, 다른 동결 보호제를 첨가한 액상 정액의 정자 운동성은 3% glycerol을 첨가한 정액(Group B)에서 35.0%에서 14.3%로 감소, 3% DMSO를 첨가한 정액(Group C)에서 28.3%에서 12.0%로 감소하는 양상을 나타내어 동결 보호제를 첨가하지 않고 4°C 냉장 보존한 액상 정액(Group A)의 운동성과 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

고찰

인공수정은 동물을 생산하는 중요 기술로 오랜 역사를 가지고 있다(Vishwanath, 2003). 세계적으로 약 1천 9백만 양돈농가 중 99% 이상이 액상 정액을 사용하며(Johnson 등, 2000), 이러한 액상 정액은 주로 15°C 및 18°C에 냉장 온도하 조건에서 인공수정을 위하여 수일 동안 보관이 가능하다(김 등, 2001). 하지만 이런 특정한 온도에서 돼지 액상 정액을 보관하기 위해서는 온도를 유지할 수 있는 특별한 보관용기가 별도로 필요하다. 만약, 일반적인 가정용 냉장고에서 유지할 수 있는 온도인 4°C에서 돼지 액상 정액을 효율적으로 보관할 수 있는 방법이 개발된다면 실제 양돈 농가에서 액상 정액 보존의 어려움이 줄어들 것이다. 본 연구에서 기존의 냉장정액 보관 온도의 적정성을 분석하기 위해 온도별 정자의 운동성을 분석하였다. 채취된 정액을 4°C와 17°C에서 다르게 보관한 결과 기존의 17°C에서 보관한 정자의 운동성이 좋은 결과를 나

타내었으며, 5일 동안의 운동성의 유지되는 정도도 가장 좋은 것으로 나타났다(Table 2. Control). 4°C 보관 처리군 중 동결 보호제를 처리하지 않은 군(Table 2. Group A)과 4°C 보관 및 3% glycerol 처리 군(Table 2. Group B) 및 3% DMSO 처리 군(Table 2. Group C)에서는 1일차에서부터 운동성이 급격하게 감소하여 5일차에는 운동성을 거의 나타내지 않아 효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 4°C 보관 시 3% ethylene glycol을 사용한 군(Table 2. Group D)에서는 1일차에는 다른 군과 차별화되어 눈에 띄게 운동성이 좋았으나, 역시 5일차에서는 운동성이 거의 없는 것으로 나타났다.

돼지 정자 운동성과 전진 운동성에 관한 연구에서 8°C에 보관한 경우 12시간부터 48시간까지는 Androhep의 희석액군이 다른 희석액군에 비하여 양호한 결과를 나타내었으며(김 등, 2001), 이를 인용해 본 실험에서도 Androhep 희석액에서 실험을 실시하였다. 8°C에서 Androhep만을 사용하여 나타난 결과는 72시간까지 57.6% 이상의 운동성을 보였으나(김 등, 2001), 본 실험에서는 그보다 낮은 결과를 보였으며, 이는 4°C에 보관함에 있어 열충격에 의한 손실이 더 큰 결과로 보인다. 또한 72시간 이후에는 급격하게 운동성이 낮아졌다. 염색에 의한 정자의 생존율 평가 결과, 생존 정자는 30초 내에 염색되지 않아 투명한 상태였고, 사멸 정자는 정자 머리 내부까지 붉은 색으로 염색되었다. 생존율 평가에서도 역시 기존의 17°C에서 보관한 정자(Table 3. Control)가 가장 높은 생존율을 5일차까지 유지하고 있었으나, 3일차부터는 급격하게 감소하여 72시간 이후에 정자 운동성, 형태학적 특성이 현저하게 달라진다는 연구와 일치함을 나타내었다(김 등, 2001). 생존율 평가는 운동성 평가보다는 다소 높게 측정되었으나, 4°C에서 보관할 때 glycerol과 DMSO는 큰 역할을 하지 못하는 것으로 나타났다(Table 3. Group A, B, C), 3%의 ethylene glycol을 첨가하여 4°C에서 보관한 군(Table 3. Group D)에서는 1일차 생존

율이 다른 4℃ 보관군에 비해 다소 높게 측정되었으며, 5일차에서의 결과 또한 다른 4℃ 보관군에 비해 높게 측정되었다.

결론적으로, 17℃에서 보관한 정자에 비해 4℃에 보관한 정자들은 운동성 및 생존율이 1일차부터 급격하게 낮아졌으며, 5일차에는 거의 모두 사멸하는 정도였으나, 그 중 4℃에 보관 시 3%의 ethylene glycol을 첨가한 군에서는 다른 군에 비해 운동성 및 생존율이 높게 측정되었다.

돼지 정액에 동결 보호제 처리를 하지 않은 후, 각기 다른 온도에서 보관한 실험에서 4℃에 정액을 보관할 경우, 48시간에 운동성이 12%, 생존율이 30% 정도를 나타내었는데(Zou와 Yang, 2000), 본 실험에서는 운동성이 11%, 생존율이 19%로 생존율이 다소 낮은 결과를 나타내었으며(Group A), ethylene glycol을 처리한 군에서는 48시간에 운동성이 32%, 생존율이 33%로써 유의성을 가지는 결과가 나와(Group D), ethylene glycol의 효과가 다소 있음을 알 수 있었다. 그러나 48시간 이후에는 운동성과 생존율이 급격하게 감소하여 5일 이후에는 17℃에 보관한 돼지정자의 운동성이 40%, 생존율이 37%를 나타내었는데 반해, ethylene glycol을 처리후 4℃에 보관한 경우 운동성이 2.33%, 생존율이 8%의 결과를 나타내어 실질적으로 농가에서 인공수정에 사용하기는 어려운 결과를 나타내었다.

이번 실험의 결과에서 실험실에서 흔히 사용되는 동결 보호제가 4℃에서 돼지정자의 열충격을 보호하는데 효과는 미비한 것으로 나타났지만, 3% ethylene glycol 처리 시 동결 보호제를 처리하지 않은 경우보다는 향상된 결과를 보여, 4℃에서 액상 정액을 보존하는 방법의 가능성을 보여주었다. 그리고, 돼지정액을 BF5 보존액 등으로 동결하였을 때, 난황이 열충격을 완화시켜주는 것처럼 다른 동결 보호제 등이 4℃에서 돼지정액을 보존할 때 열충격을 완화시켜 줄 가능성도 있다고 사료된다(Bamba과 Adams, 1990). 최근에는 돼지 정액에서 추출된 단백질 결합성 Zn 이온이 열충격에 효과적으로 작용하여 정자의 침체 반응에 효과적이었다는 실험결과도 보고되고 있다(Mogielnicka-Brzozowska 등, 2011). 따라서 이와 같은 연구를 바탕으로 4℃에서 정액을 보관함에 있어 효과적인 동결 보호제 관련 연구를 지속적으로 수행되어 효과적인 동결 보호제 개발이 가능할 경우, 실제 양돈 농가에서 액상 정액을 보다 수월하게 보관하게 되고, 이를 통해 보다 효과적인 인공수정과 산자 생산이 가능해질 것이다.

결 론

본 실험에서는 돼지정액을 Androhep 보존액을 이용하여 4℃에 보관함에 있어서 동결 보호제의 효과를 알아보고자 glycerol, DMSO, ethylene glycol을 이용하여 정자의 운동성, 생존율을 평가한 결과, ethylene glycol이 다른 동결 보호제에 비하여 유의적으로 좋은 결과를 나타내었다. 처리 후 48시간에서

는 운동성이 32%, 생존율이 33%를 나타내었으며, 5일에는 운동성이 2.33%, 생존율이 8%를 나타내었다. 따라서 ethylene glycol이 4℃에서 돼지 정액을 보관함에 있어서 48시간까지는 효과적이었으나, 보존 기간이 증가할수록 그 효과는 급격하게 감소하며, 5일 이후에는 17℃에서 보관한 돼지 정자에 비해 운동성 및 생존율이 크게 낮은 결과를 나타내어, 만족할만한 보호 효과를 나타내지는 않았다.

참고문헌

- Bamba K and Adams CE. 1990. Freezing rabbit semen by the use of BF5 diluent. *Lab. Anim.* 24: 172-175.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WM. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172.
- Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzerek J and Kordan W. 2011. Zinc-binding proteins from boar seminal plasma isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4 degrees C. *Acta. Biochim. Pol.* 58: 171-177.
- Vishwanath R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 59: 571-584.
- Zou Chun-Xia and Yang Zeng-Ming. 2000. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. *Theriogenology* 53:1477-1488.
- 김계성, 이병천, 황우석. 2000. 소 정자의 생존율 및 침체반응 검사를 위한 간단한 염색법. *한국수정란이식학회지* 15:103-108.
- 김광식, 송해범. 2005. 돼지정액의 동결에 관한 연구, 동결한 돼지의 체내, 체외 수정능력. *한국수정란이식학회지* 20:1-8.
- 김용준, 김명철, 조정근, 이수진, 이재일, 김인철, 손동수. 2001. 돼지 액상 정액을 위한 희석액 및 저온보존에 관한 연구. *한국임상수의학회지* 18:345-349.
- 김창근, 신현아, 정영채, 방명걸. 2005. 돼지 정액의 동결시 Taurine과 a-Tocopherol 첨가가 동결, 용해 정자의 정상과 기능에 미치는 영향. *한국동물번식학회지* 29:155-162.
- 박유진, 김연희, 윤성재, 권우성, 김상현, 방명걸. 2010. BTS와 Androhep이 보존 기간 동안 액상 정액의 운동역학 및 수정능 획득에 미치는 영향. *한국동물번식학회지*. 34:241-246.
- 조상래, 김현중, 최창용, 진현주, 손동수, 최선호. 2006. 소 체외수정란의 slow freezing을 위해서 ethylene glycol 동결 보호제에 sucrose 첨가농도에 의한 동결효율. *한국동물자원과학회지* 48: 797-804.
- 한성욱, 박창식, 소중섭, 김덕임, 정흥기, 류창구. 1992. 5 ml 스트로에 보존한 돼지 액상 정액의 정자농도에 따른 수정능력에 관한 연구. *한국동물자원과학회지* 34:97-100.