

개의 인공수정 기술

노 규 진

경상대학교 수의과대학 · 동물의학연구소

I. 서 론

14,000년 이전부터 회색의 늑대로부터 유래된 개는 인간에 있어서 동반역으로서, 보호역 그리고 사냥개로서 유용한 자연적 습성을 유지해왔다. 몇 세기 지나서, 모양새와 행동에 따라서 아주 많은 다양성을 지니게 되었다. 현재 전 세계적으로 약 400종의 품종이 있으며, 유전적 또는 형질적 품질 보존에 많은 노력을 경주하고 있다.

현재 우리나라의 가축을 번식하고 개량하는데 있어서 가장 중요한 관건은 우량 유전인자를 확보하는데 있으며, 이러한 유전 인자를 확보하여 활용하는 방법은 첨단과학인 생명 공학적인 방법으로 체내 또는 체외수정, 핵 이식 및 세포질 내 정자 주입법 등을 이용한 형질전환 및 복제동물의 생산이 가능하게 되었다. 그러나 이러한 방법들은 일반화되지 못하고 몇 몇 종(소, 염소, 돼지 등)에 있어서 진행되고 있으며, 개는 수정란생산, 발정동기화 및 수정란이식이 용이하지 않아서 대체로 자연교미에 의존하고 있다. Spallanzani(1776)가 개에게 인공수정을 실시하여 처음으로 산자를 보고한 이후, 1954년 Roswson에 의해 개 인공수정에 대한 연구가 재 시도되면서, 1960년대에 개의 번식생리에 관한 포괄적인 연구가 많이 진행되어 (Martin, 1963; Foote, 1964; Rathore 등, 1966) 짧은 기간동안 정자보존에 관한 연구와 인공수정 기술이 발달하였다. 인공수정에 이용되는 정액의 종류에는 신선정액 (fresh semen), 저온보존정액 (chilling semen), 동결정액 (frozen semen) 등이 있으며, 정액의 보존방법으로 온도가 낮으면 정자의 대사활동이 가역적으로 감소한다(spallanzani, 1776)는 것을 기초로 하여 정자의 저온보존에 관한 연구가 이루어지기 시작되었으나, 금세기에 와서야 동결 용해된 정자를 이용해서 인공수정 시킨 후 산자를 생산하게 되었다 (Fasttard, 1996). 그러나 산자수나 수태율이 아직까지도 저조하므로 실용화되기까지는 많은 연구가 진행되어야 한다.

정자가 난자와 수정을 이루기 위해서는 형태적 또는 기능적 역할이 중요하게 작용되며, 특히, 정자의 운동성은 동결 전 후의 정자 생존 판정에 매우 중요한 요인으로 작용된다. 정자가 난관에서 난자와 결합하기 위해서는 강한 운

동성을 전제로 한다. 정자의 운동성이 미약하게 되면 정자는 난관의 수정부위까지 진입뿐만 아니라 설령 난관까지 도달된다 하더라도 난자의 투명대를 관통하지 못해서 수정에 실패하고 만다. 정자의 운동성을 조사하기 위해서 phase contrast microscope 을 이용하는 방법이 널리 이용되지만 개개인에 따라서 그 판정등급이 다르게 평가되므로 Computer-assisted analysis (CASAs) 와 같은 방법이 유용하게 이용되고 있다.

정자막의 취약성도 온도변화에 대한 손상의 부위임이 틀림이 없다. 암컷 생식기에서 생존과 수정을 위해서 뿐만 아니라, 정자 그 자체의 유전적 정보인 DNA를 보존하기 위해서 정자는 강하고 기능적인 원형질막을 형성하고 있다. 이러한 원형질막의 특성을 연구하기 위해서 몇 가지 방법을 이용할 수 있다. Eosine 이나 Trypan Blue 같은 염색액을 이용해서 정자의 생사염색을 할 수 있으며 (Barth와 Oko, 1989; Kawakami 등, 1993; Rodriguez-Gil 등, 1994), 저장액을 이용해서 기능적 원형질막이 분포하고 있는 꼬리 부분의 휘임과 swelling을 관찰함으로써 정자의 생존여부를 간접적으로 판정할 수 있다 (Jeyendran 등, 1984). 원형질막에 쉽게 침투되는 fluorescent estrate-markers 인 carboxyfluorescein diacetate와 죽은 세포의 DNA에 쉽게 결합하는 비침투성인 fluorophore인 propidium iodide나 침투성이 있는 bis-benzimide (Hoechst 33342)를 이용한 염색방법의 개발로 정자의 생사판정은 더욱 분명하게 되었다. 정자 두부의 침체는 정자가 난자와 수정할 때 난자의 투명대를 용해하여 정자가 난자로 침투되는 것을 도와준다. 침체반응은 정자와 난자가 결합하는 부위에서 일어나며, 일반적으로 정자가 큰 중에 있어서는 침체부위가 phase contrast microscope을 이용해서도 판별이 용이하지만 개와 같이 정자의 크기가 적은 종은 특별한 염색방법이나 특별한 기구를 이용하지 않으면 관찰이 용이하지 않다. 방법으로는 transmission 혹은 scanning electron microscopy를 이용하거나, fluorescence-labelled lectins, monoclonal antibody 를 이용할 수 있다. 또한 Chlortetracycline (CTC)를 이용하면 침체반응 뿐만 아니라 수정능획득 여부도 동시에 관찰할 수 있다 (Ward와 Storey, 1984).

정자의 동결보존은 수송용이, 품종보존, 개량극대화 등 여러 가지 측면에서 매우 중요하다. 그러나, 동결보존 전 단계인 신선한 정액을 이용해서 인공수정을 시도한바, 정자의 질, 암컷의 estrous cycle과 수정 부위, 그 외에 여러 가지 요인에 따라서 임신율 및 산자수가 달라진다. 일반적으로 개는 인공수정에 의해 다수의 번식을 기대하기는 어려움이 많다. 그 이유는 발정주기가 길고 또한 계절번식을 하기 때문이다. 따라서 정확한 배란일을 결정하는 것이

중요한 성공결정 요인이 될 것이다.

개 정액은 동결보호제를 첨가함으로써 냉각 (cooling, 일반적으로 4~5°C)할 수도 있고, 동결보존을 할 수도 있다. 1954년 Harrop는 Greyhound의 정액을 4°C에서 100시간 보존한 다음 암컷과 인공수정시킨 결과 두 마리의 산자를 생산한 바 있다. 냉각은 정자의 대사를 억제시켜 생존시간을 늘려 준다. 다수의 종에 있어서 정자의 저온 보존은 생존성에 매우 감수성이 있는 것으로 알려져 있다. 이는 흔히 'cold shock'의 결과라고 한다. 정액에 대한 cold shock의 감수성을 줄이기 위해서 적당한 배양액 (동결보호제)과 적절 비율로 희석하는 것이 정자의 생존성에 중요한 요인이 된다. 난황(egg yolk)은 cold shock에 대한 감수성을 보호하기 위해 필요한 phospholipids나 lipoproteins을 함유하고 있기 때문에 정액의 동결보호제로써 널리 이용되고 있다. 개 정액 동결 후 생존성을 향상시키기 위해서 동결보호제의 효과에 대한 많은 연구가 진행되었으며, 주로 임상목적으로 Tris-, milk- 혹은 cream-based 동결보호제가 이용되고 있다.

요즈음, 개 정자의 동결보호제로써는 glycerol이 가장 많이 사용되고 있으나, dimethylsulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulphate (SDS), glycine betadine, proline 그리고, methylxanthines 등도 일부 이용되고 있다. 이러한 모든 동결보호제는 냉각 및 동결된 정자의 융해율(thawing rate)에 따라서 세포의 생존율은 달라진다 (Mazur, 1984).

따라서 본 강좌에 있어서 개 인공수정의 실용화를 위해서 몇 가지 측면, 즉 정자의 동결과 보존 그리고 발정적기 조건을 확립하여 임상에 쉽게 응용하고자 한다.

II. 정액 및 정자의 일반적 검사

1. 정액채취

여러가지 방법이 소개되고 있지만, 가장 보편적으로 masturbation과 pressure를 이용해서 마사지함으로써 채정하게 된다. 정액사출은 세 분획 (fraction)으로 나타난다. 그 중 두 번째 분획이 정자가 함유된 부분이고, 세 번째 분획은 주로 전립선액이므로 전립선액이 정자에 영향을 주는 각종 인자를 줄이기 위해서 다른 용기를 이용해서 보관한다(정자가 함유될 가능성이 있으므로).

정액 채취 전에 생식기 주위를 항생제가 함유된 생리식염수로 깨끗이 닦은 후, 음경 마사지법으로서 음경의 발기를 유도하여 구선 부위를 잡고 압박하여

사정시키고, 사정된 정액의 온도 변화를 줄이기 위하여 정액채취에 사용된 기구는 37℃에서 미리 warming하였으며, 저온 및 동결보존을 위해서는 3단계 사출정액 중 정자가 가장 많은 2단계 (sperm-rich fraction) 채취정액만을 사용한다.

일반적으로 간 분획마다 10-20초의 간격이 있거나 개체에 따라서 첫째 분획과 둘째 분획의 간격이 짧아서 구별되지 않을 때가 있다. 채정 후 photometer 혹은 hematocytometer를 이용해서 정자의 농도를 계산하고, 700 ×g, 6분 동안 원심시켜 상층액은 제거하고, 정자 pellet만을 회수하여 마지막 정자의 농도가 ml 당 30 - 100 × 10⁶ 이 되도록 보존액과 희석한다. 이렇게 희석된 정액은 냉장 보관함으로써 약 6일간 인공수정에 이용될 수 있다(본 연구진의 결과).

2. 정액 및 정자의 성상

정액의 외관은 첫째 분획은 투명하고, 둘째 분획은 정자함유분획으로서 유백색을 나타내며 점조성이 강하고, 셋째 분획은 약간 파란색의 투명성을 띠고 있다. 사출량은 개체에 따라서 차이가 있거나 일반적으로 0.5~30 ml 정도이고, 첫째 분획은 0.1~2.0 ml, 둘째 분획은 0.1~4.0 ml, 셋째 분획은 1.0~25 ml 정도이다.

사출정액의 pH는 일반적으로 약 산성인 6.4의 범위에 있고, pH meter를 이용해서 쉽게 측정할 수 있다. 정자는 산도 5~10까지 생존할 수 있으며, 정자함유분획인 둘째 분획의 전해질은 Na⁺, Cl⁻ 이 주를 이룬다. 그 외에 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, K⁺ 가 소량 첨가되어 있다.

숫개의 춘기발정은 보통 6~12개월에 나타난다. 그러나 정액의 사출시기는 약 235일 (약 8개월) 정도에 가능하며, 성숙의 나이가 들수록 정자의 질적 양적 향상을 볼 수 있다. 정자 발생기간은 52~70일 정도 소요되며, 성숙된 정자가 정소상체 미부에 이송은 약 14일이 소요된다.

성숙된 정자의 총 길이는 61.4±0.3 μm, 두부의 길이와 넓이는 각각 6.1±0.04 μm과 3.8±0.2 μm, midpiece는 10.1±0.7 μm 그리고 꼬리길이는 50 μm이다. 두부는 DNA로 구성되어 있고, 두부의 전방은 acrosome(첨체)에 의해서 쌓여 있다. 이 첨체에는 난자와 수정시 투명대를 관통하는데 도움을 주는 다수의 효소를 함유하고 있다. Midpiece에는 다수의 mitochondria가 있어서 산소대사를 통해서 정자가 운동성을 갖게 된다.

3. 정자 검사

채취한 정액은 빛을 차단하기 위해서 호일로 싸서 37°C 항온 수조 안에 보관하고, 보관된 정액을 보존할지 여부를 확인하기 위하여 정자의 농도, 운동성, 생존율 및 침체 반응 등을 검사한다.

1) 정자의 농도 및 운동성

정자 농도측정은 정자수계산판 (Makler counting chamber, Sefi medical Instruments, U.S.A.)을 이용하였으며, 운동성은 Seager 등 (1969)의 방법에 준하여 정자 200마리의 운동성을 확인하여 Table 1과 같이 6등급으로 나누어 평가하였다.

Table 1. Classification on motility of canine spermatozoa by its motility

Ranges	Characteristic
5	Very rapid and vigorous forward motion
4	Rapid progressive motion
3	Steady progressive motion
2	Slow progression, including stop and start motion
1	Weak undulation or oscillatory motion
0	No discernable motility

2) 정자의 생사염색

정자의 생사염색은 Fert/Light™ (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) 염색액을 이용하였으며, 10 µg/ml의 propidium iodide (PI, Sigma)로 대조염색을 하고, Zeiss 형광현미경 (excitation filter, 365 nm; barrier filter, 397 nm)하에서 정자의 생사를 확인한다. 정자의 두부가 초록색으로 염색된 것을 생존 정자로 간주하고, 반면 빨강계 염색된 것을 죽은 정자로 간주하여 전체 200개의 관찰된 정자에 대한 생존정자의 백분율로 표기한다.

3) 정자의 침체 검사

정자의 침체 검사는 Fluorescein conjugated Lectin Pisum Savitum Agglutinin (FITC/PSA, Sigma)을 기본 염색 액으로 하고, 10 µg/ml의 PI를

대조염색액으로 염색한다. 슬라이드 위에 10 μ l의 정액을 도말 하여 건조 시킨 후 -20 $^{\circ}$ C methanol에 2분간 고정하였다. 고정된 슬라이드를 건조 시킨 후 암실에서 FITC/PSA와 대조염색 액을 떨어 뜨린 후 Para-film을 덮어둔 채 15분간 염색한다. Zeiss 형광현미경 (excitation filter, 365 nm; barrier filter, 397 nm)하에서 침체의 손상여부를 조사하여, intact acrosome, reacting acrosome, reacted acrosome으로 분류하였으며, 관찰된 정자에 대한 백분율로 각각 표기한다.

4. 완충액 및 동결보호제의 조성

완충액은 Tris buffer를 주로 이용하며 (20 mM Tris, 5 mM glucose, 6 mM citric acid, 20% egg yolk, 1 mg/ml penicillin + streptomycin), 동결보호제는 4% glycerol을 이용한다.

5. 정자의 저온 보존

채정된 정자를 Tris-Egg Yolk buffer로 ml당 8 \times 10⁷마리가 되도록 희석하여 5 ml tube에 넣고 이 tube를 37 $^{\circ}$ C의 물이 채워진 50 ml tube에 넣어서 4 $^{\circ}$ C의 저온 냉장고에 넣어 정자를 보존한다. 정자를 4 $^{\circ}$ C에서 저온보존하면서 2시간

Table 2. Survivability, motility and acrosome integrity of sperm following different preserve time in a 4 $^{\circ}$ C refrigerator*

Preserve time	Survivability (%)	Motility (%)	Acrosome integrity as an intact (%)
control	100	100	100
2 h	89.7 \pm 0.3 ^a	88.0 \pm 0.8 ^a	51.3 \pm 0.4 ^a
12 h	71.8 \pm 0.5 ^b	69.1 \pm 0.4 ^b	33.9 \pm 0.5 ^b
1 d	79.4 \pm 0.2 ^b	67.0 \pm 0.6 ^b	32.6 \pm 0.5 ^b
2 d	78.3 \pm 0.5 ^b	65.0 \pm 0.5 ^b	32.0 \pm 0.8 ^b
6 d	64.7 \pm 0.8 ^c	59.4 \pm 0.3 ^b	32.8 \pm 0.9 ^b
7 d	63.3 \pm 0.5 ^c	25.7 \pm 0.4 ^c	33.0 \pm 0.7 ^b
9 d	62.3 \pm 0.5 ^c	18.7 \pm 0.2 ^c	21.5 \pm 0.5 ^c
10 d	48.9 \pm 0.8 ^d	8.0 \pm 0.4 ^d	16.8 \pm 0.1 ^c

a, b, c. Different superscripts in a column differ significant ($P < 0.05$).

control, ejaculated sperm

*Relative percentages as consider to ejaculate

간격으로 6회 (12시간까지), 계속해서 다음날(Day 1)부터는 하루에 한번씩 24 시간 간격으로 10일 동안 정자의 보존시간에 따른 정자의 운동성과 생존을 및 침체반응 상태를 조사한바 다음과 같은 결과를 얻었다 (Table 2, 정정란 등, 2001).

개의 신선정액 (fresh semen)의 평균 정액량 및 정자농도는 각각 0.9 ml 및 ml당 3억 4천 6백만 마리로 정상범주 이였으며, 정자는 저온보존 직후부터 10 분까지는 급격한 온도의 감소를 보였으나, 이후에는 완만한 온도의 감소를 보였으며, 4℃로 평형을 이루게 되는 시간까지의 평균 cooling rate는 분당 0.6℃ 였다.

4℃의 상태로 정자를 보존시키면서 시간경과에 따른 정자의 생존율, 정자의 운동성 및 침체의 변화조사에 있어서 생존율은 12시간까지 유의적 감소를 보이지 않았으나, 12시간 이후부터 2일 이내에 약 25%의 감소를 나타내었다. 60%이상의 생존성은 보존 9일까지 지속되었다. 운동성에 있어서도 생존성과 유사한 결과를 보였으나, 상대적인 비율에 있어서는 많은 감소를 보였다.

보존 12시간에 있어서는 69%, 6일째는 59% 그리고 7일에는 급격한 감소를 보여 26%의 수준을 보였다. 저온보존에 대한 가장 많은 변화를 보이는 침체의 경우 보존 2시간 만에 50%의 침체가 이미 reacted 및 reacting 상태로 되었으며, 보존 12시간부터 7일까지 30% 전후의 intact한 상태를 보였다.

이러한 결과로 보아서 개 인공수정시 동결보호제를 이용한 저온보존의 방법으로 정액을 보존하였을 때 6일까지 보존된 정액은 인공수정에 이용될 수 있다고 판단된다.

5. 정자의 동결 보존

개 정액을 동결보존 하는데 가장 큰 영향을 미치는 것은 정액의 동결속도로서, 정액의 동결속도를 결정하는 것이 가장 중요하다.

채취한 정액을 Tris-Egg yolk 으로 희석한 뒤 5 ml tube에 넣고 37℃의 물이 담긴 50 ml tube에 넣어 4℃의 냉장고에 두고서 37℃의 정액이 4℃까지 하강하는데 소요되는 시간인 58분 (저온보존의 실험의 예비실험결과)과 그후 4℃ 저온에서 1시간 평형을 합쳐 모두 1시간 58분 동안 cooling을 실시한다.

저온평형 후 4℃ 저온에서 보존되어 있던 Tris-Egg yolk glycerol (8%) buffer로 정자의 최종 농도가 ml 당 8×10^7 마리가 되도록 희석하여 희석된 정액은 0.5 ml straws에 장착하고 sealing 하여 액체질소 표면 위 17 cm에서 각각 17분 20초 동안 평형을 시키고, 시간이 되면 액체질소 안으로 넣어 동결을

완료한다 (Table 3 예비 결과 참조, 정정란 2001).

동결 후 용해는 37°C에서 2분 동안 항온수조 안에서 straw를 흔들며 용해한 후 정자의 운동성, 생사율, 첨체의 상태를 확인하고 인공수정에 이용한다.

Table 3. Survivability, motility and acrosome integrity of frozen-thawed sperm following different ramp rates and thawing rates*

Height**	Freezing rate	Survivability	Motility	Intact Acrosome
6 cm	19°C/min	54.0±4.7 ^b	47.4±4.9 ^b	12.5±7.5 ^a
10 cm	8.9°C/min	60.1±2.2 ^a	66.8±5.0 ^a	17.8±9.1 ^a
17 cm	3°C/min	69.8±3.2 ^a	68.3±4.3 ^a	23.2±8.3 ^a
20 cm	1.6°C/min	43.7±5.8 ^c	34.3±3.7 ^c	9.6±7.7 ^a

a, b, c, Different superscripts in a column differ significantly(P<0.05).

*Relative percentages as consider to control (79.2±3.2, survivability; 77.6±5.0, Motility; 76.2±9.1, Intact acrosome).

**Height from the surface of the top of LN₂.

III. 인공수정

여러 가지 요인이 인공수정의 성공에 작용하지만, 그 중 수정되는 정자의 농도와 정자의 질 및 수정부위 등이 중요한 요인이지만, 더욱 중요한 사실은 정확한 배란일을 측정하는 것이다.

수정시 정자의 농도는 150~200×10⁶개가 바람직하다. LH surge 후 1~3일 만에 난포가 배란되고 그후 2~3일 후에 수정이 가능한 제 2 감수분열 중기 (metaphase II)에 도달하게 된다. 따라서, 인공수정은 LH surge후 3-7일 동안 지속되어야 한다.

발정주기 조사

질에서 박리된 세포의 관측으로서 estrous cycle을 결정하기 위해서 이용된다. 그러나 인공수정을 결정하기 위한 정확한 판단기준은 될 수 없다 (Table 4 참조). 또 다른 estrogenic effect의 판단기준은 질의 부종성 꼬임 (edematous vaginal folds)이 특징적이다. 흔히 'collaps'라고도 하는데 이는 estrogen 농도의 급하강으로 기인된다. 혈중 progesterone이 LH peak에 따라서 상승하기 시작한다. 따라서 배란일의 결정은 LH 혹은 progesterone 의 농도를 결정하는 것이 중요한 판정기준이 된다 (Figure 1 참조).

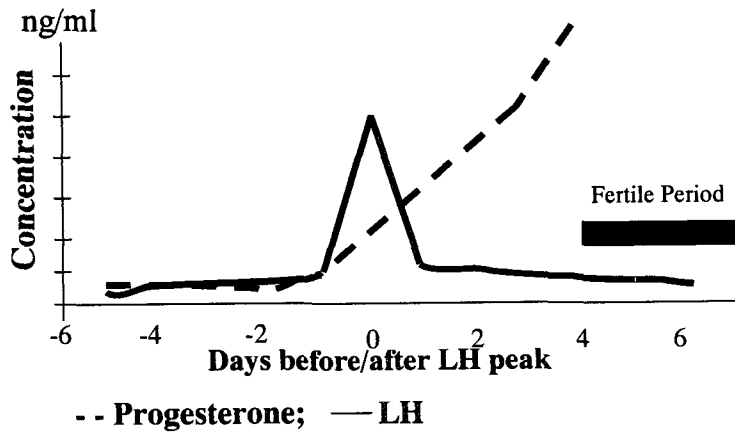


Figure 1. Hormone changes in bitch.

배란은 LH surge 후 2일째에 오며, 배란된 난자는 다른 가축과는 현저히 다른 제1감수분열 중기에 있으므로, 정자와 수정이 되기 위해서는 난관 내에서 2-3일간의 성숙과정을 요한다. 따라서 인공수정적기는 신선한 정액을 이용할 경우는 LH surge 후 2, 4, 6 혹은 3, 5일째, 저온 저장정액을 이용할 경우는 LH surge 후 3, 5 혹은 4, 6일째, 그리고 동결정액을 이용할 경우는 LH surge 후 3, 5, 7 혹은 5, 6일째에 자궁내 주입법이 권장된다.

Table 4. Pregnancy following artificial insemination of dogs.

	Vaginal smear (%)	P4 conc.	Hormone induction	No. puppies	Causes
Pungsan 1	70	7.2	yes	7	
Pungsan 2	58	7.4		0	TSH
Pungsan 3	55	10.5	yes	1	TSH
Pungsan 4	64	5.6		5	
Jindo	78	6.2		4	
Bulldog 1	75	10.2		7	
Bulldog 2	88	4.3		0	TSH
Chihuahua	95	8.2	yes	1	
Mixed 1	89	5.8	yes	2	
Mixed 2	85	6.9	yes	3	
Rott 1	89	5.9		0	Acrosome
Rott 2	52	9.5		6	

다음은 참고로 개의 각 발정주기에 따른 특징을 서술하였다.

○ **Anestrus (무발정기)**

- history : heat 2 months ago
- 수컷을 유혹하지 않음
- vulva small
- 질이 쉽게 창상을 받을 수 있고, pink, moist, 그리고 2~3 mm 정도 folded
- 질 smear시 탈락상피세포 없음

○ **Proestrus (발정전기)**

- history : 질 swelling, red 분비물
- 수컷을 유혹하나 교미는 허용하지 않음
- vulva : 점점 커져서 후기 proestrus 까지 최대의 크기가 됨, edema 때문에 약간 견고 함, 혈액 분비물이 관찰 됨, 7-12 mm 정도 folded
- 편평상피세포각화 (cornified squame epithelium cells), neutrophils이 점차 소실 됨, 다수의 red blood cells

○ Estrus (발정기)

- 교미허용
- vulva : 크지만, 후기 proestus 때 보다는 작음
- 분비물 : yellowish
- 각화된 편평상피세포, 각진 세포, 핵 농축, 무핵세포 발현, RBC 점점 감소됨

○ Diestrus (발정휴지기)

- 약 2 개월
- 분비물 : 흰색
- 호중구 상승 (약 3주간)

III. 결 론

4℃의 상태로 정자를 보존시키면서 시간경과에 따른 정자의 생존율, 정자의 운동성 및 침체의 변화조사에 있어서 생존율은 12시간까지 유의적 감소를 보이지 않았으나, 12시간 이후부터 2일 이내에 약 25%의 감소를 나타내었다. 60%이상의 생존성은 보존 9일까지 지속되었다. 운동성에 있어서도 생존성과 유사한 결과를 보였으나, 상대적인 비율에 있어서는 많은 감소를 보였다. 보존 12시간에 있어서는 69%, 6일째는 59% 그리고 7일에는 급격한 감소를 보여 26%의 수준을 보였다. 저온보존에 대한 가장 많은 변화를 보이는 침체의 경우 보존 2시간 만에 50%의 침체가 이미 reacted 및 reacting 상태로 되었으며, 보존 12시간부터 7일까지 30% 전후의 intact한 상태를 보였다. 이러한 결과로 보아서 약 6일 까지 저온 보존된 개 정자를 이용해서 인공수정에 이용될 수 있는 것으로 판단된다.

동결의 방법에 있어서는 액체질소의 표면으로부터 17 cm 높이에서 동결하는 분당 -3℃의 동결속도에서 동결하여 37℃에서 2분간 융해하는 방법이 가장 좋은 결과를 보였으며, 이러한 방법으로 동결보존된 정자를 이용해서 인공수정을 실시한 바 약 90%의 임신율을 보여, 향후 개 인공수정은 현실화 될 것으로 판단된다.

그러나 개 인공수정의 현실화를 위해서는 정확한 발정정기를 추정하는 것이 가장 중요한 관건임에 틀림없다.

VI. 참고문헌

- Farstad W 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, 42: 251-260.
- Foote RH 1964. The effects of electrolytes, sugars, glycerol, and catalase on survival of dog sperm in buffered yolk medium. *American Journal of Veterinary Research*, 25: 32-36.
- Ivanova-Kicheva MG, Subev, MS, Bobodov ND, Dacheva DP and Rouseva IA 1995. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 563-569.
- Martin ICA 1963. The deep-freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim-milk. *Res Vet Sci*, 4:315-325.
- Milovanov VK 1951. Methods of storage of semen of ruminants. In 'News in the Biology of Reproduction of Farm Animals', 139-65.
- Morton DB 1988. Artificial insemination with frozen semen in the dog: principles of DNA fingerprinting. In *Reproductive Clinical Problems in the Dog*, 2nd eds, 169-186.
- Oettle EE 1982. Preliminary report: a pregnancy from frozen centrifuged dog semen. *Journal of the South African Veterinary Association*, 53: 269-270.
- Oettle EE 1986. Changes in Acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen.
- Rathore AK and Mukherjee DP 1966. Cyto-morphological changes in ram spermatozoa due to preservation in egg yolk citrate and egg yolk glycine dilutors. *Indian Vet J.*, 43: 237-241

Rota, A, Strom B and Linde-Forsberg C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4C. *Theriogenology* 44:885-900.

Rota A, Pena AI, Linde-Forberge C and Rodriguez-Martinez H. 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Ani Reprod Sci*, 57:199-215

Seager SWJ 1969. Successful pregnancies using frozen semen in the dog. *A.A. Digest*, 12:6-7.

Spallanzani L. 1776. *Opuscoli di fiscal animale e vegetabile. Opuscolo II. Osservazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermaici dell homo e degli animali.* Modena

Watson A and Prawochenski R. 1936. An experiment in eutelegensis. *J. Hered*, 27: 341-344

Watson PF 1990. Artificial Insemination and the Preservation of Semen. In *Marshalls Physiology of Reproduction*, 4th edn, Vol. 2,. 747-869.

정정란 2001. 개 정자의 보존처리에 따른 정자의 성상 변화 조사. 경상대학교 석사학위논문.

정정란, 유재규, 양성렬, 여현진, 박종식, 예은하, 노규진, 최상용. 2001. 개 정자의 보존방법에 따른 침체 및 생존성의 변화. I. 저온보존에 따른 효과. 한국수정란이식학회지 (게재중).