

## Methanol을 이용한 개 정액 동결시 융해후 양호한 활력 및 생존율을 나타내는 정액 처리 조건

김용준 · 박영재 · 김병진 · 유일정

전북대학교 수의과대학

### Semen Treatment to Maintain Good Quality of Post-thaw Motility and Viability of Canine Spermatozoa Frozen Using Methanol

Yong-jun Kim, Young-jae Park, Byeong-jin Kim, Il-jeoung Yu

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju, 520-756

#### Abstract

This experiment was carried out to investigate the conditions to maintain good post-thaw motility and viability of canine spermatozoa when the semen was frozen using methanol.

The semen from two male dogs which had been proven to be fertile in the previous one year was treated with different compositions of semen diluent and was frozen at different freezing temperatures. When canine semen was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-60^{\circ}\text{C}$ , or  $-80^{\circ}\text{C}$ , the spermatozoa frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  showed very low post-thaw motility and viability from day 2 to 7 and showed no viability since day 15 after freezing.

The spermatozoa frozen and stored at  $-60^{\circ}\text{C}$  or  $-80^{\circ}\text{C}$  showed higher post-thaw motility and viability on day 2, 7, 15 and 30 after freezing than that frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0.01$ ), with no difference between two groups. Among different composition groups of the semen diluents of control (tris + egg yolk + glycerol), egg yolk-free, glycerol-free, and tris-free, prior to freezing, the egg yolk-free diluent showed significantly lower motility and viability than the other diluents ( $p < 0.05$ ). On each thawing day (from day 2 to 15 after freezing), control group showed considerably higher motility and viability than the other groups ( $p < 0.01$ ).

The canine spermatozoa frozen and stored at  $-60^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  showed gradual decrease of motility from day 2 to 30 after freezing and the spermatozoa of these two groups thawed on day 30 showed considerably lower motility than those thawed on day 2 after freezing, respectively ( $p < 0.01$ ).

These results indicate that the freezing temperature of either  $-60^{\circ}\text{C}$  or  $-80^{\circ}\text{C}$  can be applicable to

---

이 논문은 전북대학교 생체안전성 연구소 일부 연구비에 의해 연구되었음.

the freezing method using methanol and also all of the components of the semen diluent including cryoprotectant, buffer and cold-shock buffer are very important to maintain motility and viability of canine spermatozoa in the freezing and thawing procedure.

## 서 론

Gutierrez Nales<sup>13</sup>에 의해 동결정액을 이용한 개에서의 수태성공사례가 최초로 보고된 이래, 수태성적을 높이기 위한 정액희석액의 구성<sup>1,4,7,14,18,19,25</sup>, 동결형태<sup>1,4-6,10,12-14,21,22</sup> 및 동결방법<sup>12,21</sup>에 대한 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 이러한 연구에도 불구하고 높은 수태율을 보장할 수 있는 확실한 방법이 보고된 바 없다. 이에 저자들은 methanol을 이용한 새롭고 간단한 동결방법을 시도하였다. 이 동결방법에서 수태력의 향상과 관계될 수 있는 동결정액의 융해후 양호한 활력 및 생존율을 나타낼 수 있는 정액처리 조건을 알아보고자, methanol이용 동결시 동결온도의 차이와 희석배지 조성에 따른 차이를 조사하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물** : 과거 1년간 번식력을 나타낸 바 있으며, 임상 검사상 건강하다고 인정되는 수컷 2마리를 실험에 사용하였다. 이 중 한 마리는 체중이 22Kg, 2.5세의 pointer이었고, 다른 한 마리는 16Kg, 5세의 진도견이었다.

**정액의 채취** : 정액은 개체당 주 1회 오전 8-9시 사이에 채취되었고, 정자 농도가 높은 2분획 중심으로 채취된 원정액의 일부를 취하여 정자의 활력, 정자수, 기형율을 검사하였다.

**동결정액 희석액의 제조** : 정액 동결을 위한 희석액은 Foote<sup>10</sup>의 조성에 준하였으며, glycerol은 5%가 되도록 첨가하였다.

**정액의 희석 및 냉각** : 정액 검사를 한 후 산정된 정자수에 따라 원정액과 희석액의 비율이 1 대 1 - 2이상 되도록 하여 전체 희석액의 양을 조정하였다. 1차 희석은 원정액이 들어있는 시험관에 37℃로 가온된 희석액을 소량씩 분주하여 실시하였고 이 시험관을 37℃로 가온된 물이 들어있는 500ml 비이커에 넣어 5℃ 냉장고에

서 2시간에 걸쳐 서서히 냉각하였다. 2차 희석은 5℃로 유지시킨 1차 희석액과 동량인 glycerol 첨가 2차 희석액을 1시간에 걸쳐 6-10회 분할 희석하였다.

**Glycerol 평형** : 2차 희석을 마친 정액의 glycerol 평형은 5℃ 냉장고에서 2시간에 걸쳐 실시하였다.

**동결방법** : Methanol을 이용한 동결을 위하여 plastic 상자(15x10x5cm)안에 100% methanol 200ml를 넣고 5℃에서 냉장보관 하였다.

Glycerol로 평형시킨 희석정액을 0.5ml straw에 충전하여 5℃의 methanol이 들어 있는 plastic 상자에 넣은 다음 -20℃의 일반냉장고 또는 -60℃, 또는 -80℃ deep freezer내에서 동결하였다.

**동결정액의 보존** : 동결된 정액은 사용시까지 -20℃, -60℃, 또는 -80℃ 에서 계속 보존하였다.

**동결정액의 융해** : 동결된 straw를 37℃ 물이 들어 있는 비이커에 넣어 30초 동안 융해하였다.

### 실험처리

**실험 I** : Methanol이용 동결시 동결온도에 따른 정자의 활력 및 생존율을 알아보고자 2마리의 개정액을 -20℃, -60℃, -80℃에서 각각 동결하여 동일온도에서 각각 보존하였고, 동결후 각각 2, 7, 15, 30일에 융해하여 정자의 활력 및 생존율을 조사하였다. 동일한 실험을 10회 반복하여 수행하였으며, 또한 각 동결온도군에서의 융해일에 따른 정자활력의 변화를 조사하였다.

**실험 II** : 희석배지 조성이 정액의 동결 융해 후 정자의 활력 및 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 과거에 번식력을 보인 2마리의 개 정액을 이용하였으며, 실험군은 대조군으로 tris+glycerol(5%)+egg yolk(20%)군, 대조군에서 egg yolk만을 제거한 군(egg yolk-free군), 대조군에서 glycerol만을 제거한 군(glycerol-free군), 대조군에서 tris를 빼고 증류수 대신 saline을 첨가한 군(tris - free군)의 4군으로 구별하였다.

개 정액은 -80℃ deep freezer에서 동결하여 동일한 온도에서 보존하였으며, glycerol 평형후 동

결전 및 동결후 음해일에 따른 정자 활력의 변화도 조사하였다. 동일한 실험을 6회 반복하였다.

정자의 활력 및 생존율의 판정 : 정자의 활력 및 생존율은 광학 현미경 하에서 400배로 경검하여 한 슬라이드에서 5개 시야의 평균을 구하였다. 활력은 정자의 전진운동의 최고치를 100%로 하였을 때 이와 비교된 전진운동의 평균 백분율을 구하였으며, 생존율은 살아서 움직이는 정자의 평균 백분율을 구하였다.

결과 분석 : 실험에서 얻은 성적을 ANOVA로 통계처리 하였으며 DUNCAN 다중검정에 의해 실험군간 유의차를 구하였다.

## 결 과

개 정액을 서로 다른 온도에서 동결한 후 2, 7, 15, 30일에 각각 음해하여 정자의 활력 및 생존율을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

동결 정자의 활력 및 생존율에서 -60℃ 및 -80℃에서 동결된 군들은 2, 7, 15, 30일의 각 음해일에서 상호간에는 차이없이 -20℃에서 동결된 군보다 각각 현저히 높은 활력 및 생존율을 나타내었다( $p<0.01$ ).

-20℃에서 동결된 군은 동결후 15일부터는 정자의 활력 및 생존율이 전혀 인정되지 않았다.

동결보존 기간에 따른 각 동결 온도군의 정자 활력 및 생존율 비교에서 -20℃에서 동결된 정액의 경우, 동결후 7일에 음해한 정자의 활력 및 생존율은 2일에 음해한 정자의 활력 및 생존율보다 유의성 있게 감소되었고( $p<0.05$ ), 동결후 15일 이후는 활력 및 생존율이 전혀 인정되지 않았다.

-60℃에서 동결된 정액의 경우, 동결후 7, 15, 30일에 음해된 정자의 활력은 2일에 음해한 정자의 활력보다 현저히 감소되었고( $p<0.01$ ), 동결후 7일과 15일간, 그리고 15일과 30일간에서는 유의성 있는 차이는 없었으나 점차 감소된 수치를 나타내었으며, 동결후 30일의 활력은 7일의 활력에 비해 현저히 감소된 차이를 나타내어( $p<0.01$ ) 동결후 보존기간이 진행될 수록 정자의 활력이 점차 감소되는 경향을 나타내었다.

정자의 생존율은 동결후 2, 7, 15, 30일에 음해시 음해일이 진행될수록 각각 현저히 감소되었다( $p<0.01$ ).

-80℃에서 동결된 정액의 경우, 동결후 15일과 30일에 음해된 정자의 활력 및 생존율은 2일에 음해된 정자의 활력 및 생존율보다 현저히 감소되었고( $p<0.01$ ), -60℃에서 동결된 정액과 같이 동결후 보존기간이 진행될 수록 정자의 활력 및 생존율이 점차 감소되는 경향을 나타내었다.

정액 희석배지의 조성을 서로 다르게 하여 개

Table 1. Influence of freezing temperatures on post-thaw motility and viability of frozen canine spermatozoa(Mean  $\pm$  SD, n=10)

Freezing Temperature	Post-thaw index							
	Motility (%)				Viability (%)			
	Thawing-day				Thawing-day			
	2nd	7th	15th	30th	2nd	7th	15th	30th
-20℃	6.50 $\pm$ 10.01 <sup>a,A</sup>	0.20 $\pm$ 0.65 <sup>a,B</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a,B</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a,B</sup>	3.70 $\pm$ 6.60 <sup>a,A</sup>	0.20 $\pm$ 0.63 <sup>a,B</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a,B</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a,B</sup>
-60℃	64.00 $\pm$ 7.38 <sup>b,C</sup>	55.50 $\pm$ 10.29 <sup>b,D</sup>	49.00 $\pm$ 7.38 <sup>b,D,E</sup>	43.00 $\pm$ 6.75 <sup>b,E</sup>	44.00 $\pm$ 4.60 <sup>b,C</sup>	38.00 $\pm$ 5.38 <sup>b,D</sup>	32.00 $\pm$ 5.38 <sup>b,E</sup>	25.00 $\pm$ 4.71 <sup>b,F</sup>
-80℃	68.00 $\pm$ 10.59 <sup>b,C</sup>	58.50 $\pm$ 10.81 <sup>b,C,D</sup>	49.50 $\pm$ 12.12 <sup>b,D,E</sup>	45.00 $\pm$ 11.08 <sup>b,E</sup>	39.00 $\pm$ 6.58 <sup>b,C</sup>	36.50 $\pm$ 4.74 <sup>b,C,D</sup>	32.50 $\pm$ 4.86 <sup>b,D,E</sup>	28.00 $\pm$ 4.83 <sup>b,E</sup>

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

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

C, D, E, F: Different superscripts denote significant differences within rows( $p<0.01$ ).

Table 2. Effects of different composition of semen diluent on post-thaw motility and viability of frozen canine spermatozoa(Mean±SD; n=6)

Composition *	Post-thaw index							
	Motility (%)				Viability (%)			
	Thawing-day				Thawing-day			
	BF	2nd	7th	15th	BF	2nd	7th	15th
1	88.33±4.08 <sup>d,A</sup>	70.83±17.44 <sup>a,A</sup>	65.00±17.61 <sup>a,A,B</sup>	52.67±26.39 <sup>a,B</sup>	86.68±5.16 <sup>d,A</sup>	50.00±12.65 <sup>a,B</sup>	38.33±9.83 <sup>a,B,C</sup>	25.00±12.25 <sup>a,C</sup>
2	68.00±21.73 <sup>c,A</sup>	51.67±31.89 <sup>a,A,B</sup>	36.67±30.77 <sup>b,A,B</sup>	18.83±27.32 <sup>b,B</sup>	65.00±12.25 <sup>c,A</sup>	26.67±15.06 <sup>b,B</sup>	19.18±13.57 <sup>b,B</sup>	9.50±11.29 <sup>b,B</sup>
3	93.50±3.99 <sup>d,A</sup>	0.00±0.00 <sup>b,B</sup>	0.00±0.00 <sup>c,B</sup>	0.00±0.00 <sup>c,B</sup>	89.00±7.75 <sup>d,A</sup>	0.00±0.00 <sup>c,B</sup>	0.00±0.00 <sup>b,c,B</sup>	0.00±0.00 <sup>b,B</sup>
4	86.67±13.29 <sup>d,A</sup>	28.33±24.83 <sup>b,B</sup>	26.67±25.03 <sup>b,B</sup>	12.50±17.82 <sup>b,B</sup>	85.83±9.17 <sup>d,A</sup>	6.67±5.16 <sup>c,B</sup>	5.00±4.47 <sup>c,B</sup>	2.18±2.48 <sup>b,B</sup>

BF: Before Freezing

\* : 1. Tris+glycerol+egg yolk, 2. Egg yolk-free, 3. Glycerol-free, 4. Tris-free

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

d,e: Different superscripts denote significant differences within columns(p<0.05).

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

정액을 -80℃에서 동결한 후 동결전 및 동결후 2, 7, 15일에 음해하여 정자의 활력 및 생존율을 조사한 결과는 Table 2 와 같다.

정액의 동결전, 정자의 활력 검사에서 희석 배지의 모든 조성이 갖추어진 대조군, glycerol-free군(대조군에서 glycerol을 제거한 군), tris-free군(대조군에서 tris를 제거하고 증류수 대신 saline을 첨가한 군)은 각각 egg yolk-free군(대조군에서 egg yolk를 제거한 군)보다 유의성 있게 높은 활력을 나타내었으며(p<0.05), 3군간 상호간에는 차이가 인정되지 않았다.

동결후 2일에 음해된 정자의 활력은 대조군과 egg yolk-free군은 상호간에는 차이없이, glycerol-free군 및 tris-free군 보다 각각 현저히 높은 활력을 나타내었다(p<0.01) Tris-free군은 glycerol-free군 보다 높은 수치를 보였으나 상호간 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

동결후 7일 및 15일 모두에서 대조군은 다른 모든 실험군보다 현저히 높은 활력을 나타내었으며(p<0.01), egg yolk-free군과 tris-free군은 상호간에 차이없이 glycerol-free군보다 각각 현저히 높은 활력을 나타내었다(p<0.01).

정자의 생존율검사에서, 정자의 동결전 각 군

간 비교 결과는 정자의 동결전 활력검사와 동일한 유의성 있는 차이가 실험군간 인정되었다(p<0.05).

동결후 2일 및 7일 모두에서 대조군은 다른 모든 실험군보다 현저히 높은 생존율을 나타내었다(p<0.01). 또한, egg yolk-free군은 동결후 2일에서는 대조군을 제외한 나머지 두 군보다, 7일에서는 glycerol-free군보다 각각 현저히 높은 생존율을 나타내었다(p<0.01). 동결후 2일, 7일 모두에서 tris-free군은 glycerol-free군보다 생존율에서 더 높은 수치를 나타내었으나 상호간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

동결후 15일에서 대조군은 다른 모든 실험군보다 현저히 높은 생존율을 나타내었다(p<0.01)

또한, egg yolk-free군은 tris-free군 및 glycerol-free군 보다, tris-free군은 glycerol-free군보다 생존율에서 더 높은 수치를 나타내었으나 상호간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

동결보존 기간에 따른 각 조성배지군의 정자 활력 및 생존율 비교에서 희석배지의 조성 성분이 모두 포함된 대조군인 배지 1의 경우, 동결전의 정자활력이 동결후 2, 7일까지 점차 감소되는 수치를 보였으나 유의성 있는 차이는 인정되지

않았다. 한편, 동결후 15일의 정자 활력은 동결 전 및 음해 2일에 비해 유의성 있게 감소된 차이를 나타내었다( $p < 0.05$ )

정자의 생존율은 동결후 각 음해일에서 동결 전보다 유의성 있는 감소를 나타내었고( $p < 0.05$ ), 동결후 15일의 정자생존율은 동결후 2일에 비해 감소된 차이를 나타내었다( $p < 0.05$ ).

대조군에서 난황을 제거한 egg yolk-free군(배지 2)의 경우, 동결전의 정자활력은 동결후 2, 7일까지 점차 감소하는 수치를 보였으나 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 한편, 동결후 15일의 정자활력은 동결전에 비해 유의성 있게 감소된 차이를 나타내었다( $p < 0.05$ ).

정자의 생존율은 동결후 각 음해일에서 동결 전보다 유의성 있게 감소된 차이를 나타내었고( $p < 0.05$ ), 동결후 2일부터 15일까지 감소하는 수치를 나타내었으나 상호간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

대조군에서 glycerol을 제거한 glycerol-free군(배지 3)의 경우, 동결후의 활력 및 생존율은 전혀 인정되지 않았으며 동결전과 유의성 있는 차이를 나타내었다( $p < 0.05$ ).

대조군에서 tris를 제거한 tris-free군(배지 4)의 경우, 동결후 각 음해일에서 활력 및 생존율은 동결전보다 유의성 있게 감소된 차이를 각각 나타내었다( $p < 0.05$ ). 동결후 2일부터 15일까지의 활력 및 생존율은 감소하는 수치를 나타내었으나 상호간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

## 고 찰

이 실험에서 개 정액을 methanol을 이용하여 서로 다른 온도에서 동결후 음해하여 정자의 활력 및 생존율을 비교한 결과,  $-60^{\circ}\text{C}$  및  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 보존된 정자는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 보존된 정자보다 현저히 높은 정자의 활력 및 생존율을 나타내었고,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결된 정자는 동결후 15일 이후는 정자의 생존성이 전혀 인정되지 않았다.

이 결과는 이와 유사한 연구 보고를 접하지 못해 비교하기 어려우나 이 실험에서 일반 냉장고

의 냉동실에서 동결된  $-20^{\circ}\text{C}$ 동결의 경우, 동결후 7일까지 매우 낮은 정자의 활력 및 생존율은 인정되었으나 인공수정에 사용할 수 있는 정도의 정자의 활력 및 생존성을 얻기는 어려운 것으로 보여진다.

한편, deep freezer를 이용한  $-60^{\circ}\text{C}$ 동결과  $80^{\circ}\text{C}$ 동결의 경우 정자의 활력 및 생존율에서 서로 차이가 인정되지 않았으므로, methanol을 이용한 동결의 경우  $-60^{\circ}\text{C}$  및  $-80^{\circ}\text{C}$ 의 어느 온도에서 동결하여도 가능할 것으로 보이며, 이 온도는 Martin<sup>15</sup> 및 여러 연구자들이  $-79^{\circ}\text{C}$ 에서 개 정자를 동결하여 수태성적을 나타낸 결과와 비교해 볼 때 상기 온도들의 이용 가능성과 관련될 수 있을 것으로 사료된다.

이 실험에서 개 정액을 서로 다른 온도에서 각각 동결한 후 음해일에 따른 정자의 활력의 변화를 조사한 결과,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결된 개 정액은 동결후 7일까지 생존정자가 인정되었으나 15일 이후부터 생존정자가 전혀 없었던 것으로 보아 개 정자의 경우,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 및 보존은 이용하기가 어려울 것으로 보인다.

$-60^{\circ}\text{C}$ 동결과  $-80^{\circ}\text{C}$ 동결의 경우, 동결후 2, 7, 15, 30일의 음해일에서 음해일이 진행될수록 정자의 활력 및 생존율이 음해일간에 점차 감소되는 차이를 나타낸 바, methanol을 이용하여 개 정액을 동결한 후 30일 이상 보존시 정자의 활력 및 생존율이 점차 감소되어갈 것으로 보이며 동결후 30일 이상의 보존은 인공수정에 적합하지 않을 것으로 사료된다.

한편, methanol을 이용하여 개 정액을 동결한 후 2일에 음해시 정자의 활력과 생존율은 양호한 편이므로 methanol이용 동결시 동결후 단시간 내에 액체질소내 보관시 활력 및 생존성은 더 오래 유지될 것으로 추측되며 이에 대한 계속적인 연구가 요망된다.

이 실험에서 개 정액 배지의 조성을 각각 다르게 하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 동결하여 배지의 조성에 따른 음해후 정자의 활력 및 생존율을 비교한 결과 정자의 동결전에는 대조군, glycerol-free군, tris-free군이 egg yolk-free군보다 각각 유의성 있게 높은 정자의 활력 및 생존율을 나타내었다.

이 결과는 동결전 정액희석 및 glycerol평형 상태에서 보다 높은 정자의 활력과 생존율을 나타

낸 3개군에 공통으로 첨가된 egg yolk가 tris의 첨가보다 정자의 활력 및 생존율에 더 좋은 영향을 준다는 사실을 나타내는 것으로 보인다. 즉, egg yolk는 동결전 저온 상태에서 정자에 대한 cold shock를 완충하는 작용을 나타낸다는 것을 시사하는 것으로 보인다.

한편, glycerol을 제거한 군이 높은 정자의 활력과 생존율을 나타낸 것은 glycerol이 글리세롤 평형을 통해 살아 있는 정자 세포내 침투하여 존재함으로써 정자의 활력 및 생존성을 감소시킬 수 있는 것으로 보인다.

이 실험에서 동결후 2일에 대조군이 glycerol-free 군과 tris-free 군보다 현저히 높은 활력을 나타낸 결과는 Concannon<sup>6</sup> 및 여러 연구자들<sup>9,11,19,26</sup>의 보고와 같이 동결시 glycerol이 동해방지제로서 효과를 나타낸 것으로 사료되며, egg yolk-free군이 대조군보다 수치는 낮으나 유의성 있는 차이는 없이 대조군과 같은 결과를 보인 것은 개 정액 동결시 tris가 egg yolk보다 정자의 활력에 더 우수한 영향을 미치는 것으로 추측된다.

또한, 동결후 7일 및 15일 모두에서 대조군이 다른 모든 실험군보다 현저히 높은 활력을 나타낸 결과는 개 정액의 동결시 tris, glycerol, egg yolk와 같은 각 주요 구성성분이 정자의 생존 및 활력에 모두 필요하다는 사실을 나타낸 것으로 보이며, 이와 함께 나머지 3군중 glycerol이 첨가된 두 군이 glycerol이 첨가되지 않은 glycerol-free군보다 현저히 높은 정자의 활력을 나타낸 것도 동결시 glycerol의 동결보호 작용 때문이라 사료된다.

개 정자의 생존율검사에서도, 동결전에는 각 군 공히 정자의 활력검사와 동일한 결과를 나타내었고, 동결후에는 검사 전 기간에 걸쳐 대조군이 다른 모든 실험군보다 현저히 높은 생존율을 나타내었는데, 이것은 Concannon<sup>6</sup> 과 여러 연구자들<sup>7,8,10,16</sup>이 보고한 바와 같이 egg yolk는 정자에 대한 cold shock를 완화시키는 작용이 있으며, glycerol은 정자의 동결 손상을 방지하는 작용이 있다고 한 것과 또한 Foote<sup>10</sup> 및 Gill et al<sup>12</sup> 그리고 여러 연구자들<sup>28</sup>이 tris는 완충제 및 생리적 배지로서 작용된다고 한 보고들을 비추어 볼 때 이러한 조성들이 정자의 동결시 정자세포의 생존을 유지시키는데 각각 중요한 효과를 나타내

는 것으로 보인다.

한편, 동결후 2일 및 7일에서 tris는 첨가되었으나 egg yolk가 제거된 군(egg yolk-free 군)이 tris가 제거된 군(tris-free 군)보다 현저히 높은 생존율을 나타낸 것으로 보아 개의 정액동결시 tris가 egg yolk보다 정자 생존율에 더 좋은 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한, glycerol이 제거된 군은 동결후 전 기간에서 생존성이 전혀 인정되지 않았는데 이 결과로 볼 때 개 정액 동결시 glycerol과 같은 동해방지제의 첨가가 무엇보다도 필요한 것으로 보인다.

이 실험에서 개 정액 희석배지의 조성을 다르게 하여 -80℃에서 동결한 후 동결전 및 동결후 융해일에 따른 정자의 활력변화를 조사한 결과, 대조군(조성 1)의 결과는 동결후 시간이 경과될수록 정자의 활력이 점차 감소된 것으로 보아 -80℃동결군과 유사한 결과인 것으로 생각된다.

Egg yolk-free군(조성 2)의 결과는 대조군보다 수치는 적으나 매우 유사한 변화를 보여 이 군에 첨가된 tris의 작용을 추측할 수 있으며, 이와 동시에 tris가 제거된 tris-free군(조성 3)의 경우 동결후 각 융해일에서 정자의 활력이 동결전보다 현저히 감소됨으로써 tris가 개정액의 동결시 매우 중요한 성분임을 추측할 수 있다.

한편, glycerol-free군(조성 4)의 경우는 동결후 정자의 활력 및 생존율이 전혀 인정되지 않음으로써 정자의 동결시 동해방지제가 절대적으로 필요한 것이 명백히 인정된다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, methanol을 이용하여 개 정액 동결시 동결온도는 -60℃ 또는 -80℃가 사용될 수 있으며, 동결후 정자의 활력 및 생존율이 점차 감소되어 동결후 30일에 동결후 2일에 비해 현저히 감소되어 장기보존이 어려울 것이라는 점, 그리고 희석배지의 조성을 달리하여 개 정액 동결시 glycerol, egg yolk, tris의 모든 성분이 동결전 및 동결후 모두 필요하며, 특히 glycerol과 tris가 동결후 정자의 생존 및 활력에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

## 결 론

Methanol을 이용하여 개 정액을 동결시 개 정

자의 활력 및 생존율을 유지시킬 수 있는 동결조건을 알아보고자, 과거 번식력을 보인 수캐 2마리의 정액을 이용하여 동결온도의 차이 및 정액 희석배지 조성의 차이에 따른 융해후 정자의 활력 및 생존율을 조사하였고, 동결후 융해일에 따른 정자의 활력 변화를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. -60℃ 및 -80℃에서 동결 보존된 개 정자는 동결후 2, 7, 15, 30일에 -20℃에서 동결 보존된 개 정자보다 현저히 높은 활력 및 생존율을 나타내었으나( $p<0.01$ ), 상호간에는 차이가 인정되지 않았다.

2. -20℃에서 동결 보존된 개 정자는 동결후 2-7일까지 매우 낮은 활력 및 생존율을 나타내었고, 동결후 15일부터 생존정자는 인정되지 않았다.

3. -60℃ 및 -80℃에서 동결된 개 정자의 활력 및 생존율은 동결후 30일까지 점차 감소되었고, 동결후 2일에 비해 현저히 감소된 정자의 활력 및 생존율을 나타내었다( $p<0.01$ ).

4. 정액배지 조성의 차이에서 정액의 동결전, 대조군, glycerol-free군, tris-free군은 egg yolk-free군보다 각각 유의성 있게 높은 활력 및 생존율을 나타내었다( $p<0.05$ ).

5. 동결후 7일 및 15일에서 대조군은 다른 모든 실험군보다 현저히 높은 활력 및 생존율을 나타내었고( $p<0.01$ ), egg yolk-free군과 tris-free군은 glycerol-free군보다 현저히 높은 활력을 나타내었다( $p<0.01$ ).

6. 동결후 2일 및 7일에서 tris가 첨가된 egg yolk-free군이 tris-free군보다 현저히 높은 생존율을 나타내었다( $p<0.01$ ).

7. 정액 희석배지의 조성을 달리하여 동결시 각 조성군은 동결후 15일까지 정자의 활력이 감소되는 경향을 나타내었고, 정자의 생존율은 동결후 동결전보다 유의성 있게 감소되었다( $p<0.05$ ).

이상의 결과 methanol을 이용한 개 정액 동결시 -60℃ 또는 -80℃가 사용될 수 있으며, 개 정액 동결시 glycerol, egg yolk, tris와 같은 구성 성분들이 모두 필요하며 특히 glycerol과 tris가 필요하다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한, methanol 이용 동결시 동결후 동결보존기간이

진행될수록 정자의 활력 및 생존율이 감소된다는 사실을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Andersen K. Fertility of frozen dog semen. In: Proc 7th Int Congr Anim Reprod AI, Munich, 1972; 1703-1706.
2. Battista M, Parks J, and Concannon P. Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, tris or TEST extenders. In: Proc 11th Int Congr Anim Reprod AI, Dublin, 1988; 3: 229.
3. Bouchard GF, Moris JK, Sikers JD, and Youngquist RS. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 1990; 34: 147-157.
4. Bowen RA, Amann RP, Frome DP. Artificial insemination with frozen semen in the dog. In: *Dog World*, 1984; 69: 66-67.
5. Christiansen J. Artificial breeding and embryo transfer. In: Christiansen J(ed.); *Reproduction in The Dog and Cat*. London: Bailliere Tindall, 1984; 115-123.
6. Concannon PW, and Battista M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW.(ed.); *Current Veterinary Therapy X, Small Animal Practice*, W B Saunders Co. 1989; 1247-1259.
7. Cristanelli MJ, Amann RP, Squires EI, et al. Effects of egg yolk glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1985; 24: 681
8. Davis IS, Bratton RW, and Foote RH. Livability of bovine spermatozoa at 5, -25 and -85℃ in tris-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders. *J Dairy Sci* 1963; 46: 333.

9. Foote RH. Artificial insemination of dogs. In: Kirk RW.(ed.); *Current Veterinary Therapy*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1968; 686-689.
10. Foote RH. Extenders for freezing dog semen. *Am J Vet Res* 1964; 25: 37.
11. Foote RH. The effects of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog sperm stored in buffered-yolk mediums. *Am J Vet Res* 1964; 25: 32.
12. Gill HP, Kaufman CF, Foote RH. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen semen. *Am J Vet Res* 1970; 31: 1807-1813
13. Gutierrez Nales NN. The dilution and storage of canine semen. *Reo Patron Biol Anim(Madr)* 1957; 3: 189.
14. Lees GE, and Castleberry MW. The use of frozen semen of artificial insemination of German Shepherd dogs. *JAAHA* 1977; 13: 382-386
15. Martin ICA. The freezing of dog spermatozoa to -79 °C. *Res Vet Sci* 1963a; 4: 304.
16. Morton DB. Artificial insemination with frozen semen in the dog. In: James E.(ed.): *Reproductive clinical problems in the dog*, 2nd ed. London: Butterworths. 1988; 254-267.
17. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. Influence of extender, Cryoperservative and Seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* 1989; 31(2): 451-461.
18. Platz CC, Seager SWJ. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab Anim Sci* 1977; 17: 1013-1016.
19. Province CA, Amann RP, Pickett BW, et al. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5 °C. *Theriogenology* 1984; 22: 409.
20. Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest* 1969; 17: 6.
21. Seager SWJ, Fletcher WS. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet Rec* 1973; 92: 6.
22. Seager SWJ, Platz CC, Fletcher WS. Conception rates and related data using frozen dog semen. *J Reprod Fertil* 1975; 45: 189.
23. Smith FO. Update on freezing canine semen. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the Society of Theriogenology*, Denver. 1984; 61-73.
24. Takeishi M, Mikami T, Kodama Y. Studies on reproduction in the dog, VIII. Artificial insemination using frozen semen. *Jpn J Anim Reprod* 1976; 22: 28.
25. Weidel I, Prims GS. Cryosurvival of human spermatozoa frozen eight different buffer systems. *J Andol* 1987; 8: 41.
26. Yubi AG, Ferguson JM, Renton JP. Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. *J Small Anim Pract* 1987; 28: 753.