

## 개 정액의 융해후 정자의 생존율 향상을 위한 동결 방법

지동범 · 김용준<sup>1</sup>  
전북대학교 수의과대학

### Freezing Methods of Canine Semen to Achieve Good Post-Thaw Viability of Sperm

Dong-beom Ji and Yong-jun Kim<sup>1</sup>  
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

**Abstract :** These studies were performed to investigate the freezing conditions to achieve good post-thaw viability of sperm and the practical methods of artificial insemination with frozen canine semen. Semen were collected from nine male dogs which had been proved to be fertile in the past and the semen were treated for freezing procedure. Post-thaw motility and viability of canine sperm were evaluated to investigate individual tolerance of freezing, difference among freezing extenders, difference among freezing equipments and freezing conditions, difference between fast and slow cooling rate, difference according to different glycerol concentration, effect of seeding on post-thaw viability, difference according to cutting part of straw, difference according to thawing temperatures, and difference according to media added to thawed semen. Thawed semen for insemination were added with equal volume of canine capacitation medium (CCM) and the volume of semen and the number per insemination were adjusted as 2-3 ml and  $20-30 \times 10^7$ , respectively. The semen were inseminated in vagina using balloon catheter and embryos were collected from 9 to 11 days after the second AI to determine fertilization.

**Key words :** frozen semen, thawing, viability, extender, artificial insemination

## 서 론

개에서 인공수정은 자연교배가 어려운 개체에서 번식을 가능하게 하는 점, 교배를 시키기 위해 동물을 이동시키지 않아도 되는 점, 자연 교배시의 불필요한 상황을 피할 수 있다는 점 등으로 축주들에게 많은 관심의 대상이 되고 있다.

특히, 동결정액의 이용은 우수하거나 소중한 개체의 정자를 영구적으로 보존할 수 있는 점, 그리고 장소나 시간의 제한 없이 동결정액을 이용한 번식이 가능할 수 있다는 점에서 애완견 번식산업에 지대한 기여를 할 수 있을 것으로 보인다.

개 동결정액을 이용한 세계 최초의 개의 산자 생산

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

<sup>1</sup>Corresponding author.

은 1957년 Gutierrez Nalcs<sup>13</sup>에 의하여 이루어졌으며, 국내에서는 김 등<sup>39</sup>에 의해 1994년에 최초로 산자가 생산되었다.

개정액 동결방법은 현재까지 Seager와 Fletcher<sup>28</sup> 및 여러 연구자들<sup>17,23</sup>이 사용한 dry ice 동결법, 그리고 Gill 등<sup>12</sup> 및 여러 연구자들<sup>2,5,8</sup>이 사용한 액체질소 가스동결법이 주종을 이루어 왔고 간이동결방법으로 methanol 이용 동결법<sup>37-39</sup>, 그리고 최근에는 프로그램 동결기<sup>25,32</sup>도 이용되고 있다.

그리고, 수태 성적을 높이기 위한 정액희석액의 구성<sup>1,2,17,21,23,24,35,36</sup>, 동결형태<sup>5,7,9,11,12,20,21,27-29</sup>, 등에 대한 많은 연구가 이루어졌다. 수태율에서는 Andersen<sup>2</sup>은 straw와 액체질소 gas를 이용하여 25%의 수태율, Seager와 Fletcher<sup>28,29</sup>는 pellet와 dry ice를 이용하여 46%의 수태율, 김 등<sup>39</sup>은 methanol을 이용한 간이동결법으로 42.8%의 수태율을 보고하였다.

그러나, 이러한 수태율은 동결정액의 인공수정을 실용화시키기에는 아직도 낮은 수태율인데 최근 Rota

등<sup>25,26</sup>과 Linde-Forsberg<sup>19</sup>는 80% 이상의 수태율을 보고하고 있다. 동결정액의 주입방법에서도 질내주입법<sup>30,34,39</sup>, 복벽절개후 자궁내 주입법<sup>30</sup>, 질내시경 이용 자궁내 주입법<sup>25,42</sup>이 제시되어왔는데 수태율은 다소 낮지만 질내 주입법은 가장 편리한 방법으로 알려져 있다.

따라서 이 연구에서는 개 정액 동결시 용해 후 생존성을 가장 높일 수 있는 동결조건을 알아보고자 하였다. 이를 위하여 동결배지에 따른 비교, 동결방법에 따른 비교, 동결시 급속 및 완만 동결속도 비교, 동해방지제 농도에 따른 비교, seeding처리영향, 용해온도에 따른 비교를 하기 위해서 용해후 정자의 생존율 및 운동성에 대한 조사연구가 수행되었다.

아울러 개 동결정액 인공수정의 실용화를 더욱 높이기 위해 질내 주입시 주입기를 새로이 고안하고 이를 적용하여 인공수정에 따른 수태 성적을 조사하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**실험동물** : 동결정액 제조를 위한 종모건은 과거 번식력이 입증된 바 있고, 임상검사상 건강하다고 인정되는 숫개 9두를 이용하였다. 숫개의 연령은 1.5-3세 이었고 체중은 3-45 kg 이었다. 품종은 Tosa견 1두, Shizu견 1두, Maltese 1두, Poodle 2두, Yorkshire terrier 1두, Pointer 1두, 잡종견 2두 이었다.

동결정액 주입을 위한 암개는 잡종개 6두가 이용되었다.

**정액의 채취** : 정액은 개체당 주 1회 오전 8-9시 사이에 채취하였고, 정자 농도가 높은 2분획을 중심으로 채취하여 그 원정액의 일부를 취하여 김 등<sup>39</sup>의 방법에서와 같이 정자의 활력, 정자수, 기형율을 검사하였다.

**동결정액 희석액의 제조** : 정액동결을 위한 희석액은 별도의 지시가 없는 한 Sweden 배지<sup>25</sup>의 조성에 따라 제조하였으며, glycerol은 최종 농도가 5%가 되도록 첨가하였다.

**정액의 희석 및 냉각** : 정액검사를 한 후 산정된 정자수에 따라 ml당  $1 \times 10^8$ 이 되도록 원정액과 희석액의 비율을 1:2 이상이 되도록 하여 전체 희석액의 양을 조정하였다. 1차 희석은 원정액이 들어있는 시험관에 37°C로 가온된 희석액을 소량씩 분주하여 실시하였고, 이 시험관을 37°C의 물이 들어 있는 500 ml 비이커에 넣어 5°C 냉장고에서 2시간 동안 서서히 냉각하였다. 2차 희석은 1차 희석액이 5°C로 유지된 후 이미 5°C에서 유지시킨 glycerol첨가 2차 희석액을 1

시간 동안 6-10회 분할 분주하여 희석하였다.

**Glycerol평형조건** : 2차 희석을 마친 정액의 glycerol 평형은 5°C 냉장고내에서 2시간 동안 실시하였다.

**정액 스트로 충전** : 정액은 0.5 ml straw내 충전하였으며 정자수는  $50 \times 10^6$ /straw가 되도록 조정하였다.

**동결방법** : 동결방법은 별도의 지시가 없는 한 polystyrene 상자내 액체질소 가스에 의해 동결하였다. 즉, polystyrene 상자내 액체질소를 분주한 후 액체질소 수면위 2 cm가 되도록 철제 rack를 상자내 설치하였다. Glycerol 평형을 마친 정액 스트로는 rack위에 올려 놓아 뚜껑을 덮고 15분 동안 동결하였다.

**동결정액의 보존** : 동결된 정액 스트로는 액체 질소내 넣어 보존하였다. 보존 기간은 1개월 내지 1년이었다.

**동결정액의 용해** : 동결정액은 37°C로 조정된 수조내 넣어 30초간 용해하였다.

### 실험처리

**개체 정액 동결시 내동성 비교** : 숫개 개체마다의 동결시 내동성을 알아보기 위하여 원정액의 생존율과 기형율을 조사한 후 동결용해한 정액에 대하여 동일 개체의 생존율과 정자의 운동성을 비교하였다.

**동결 희석 배지에 따른 용해후 정자의 성상 및 hyposmotic swelling(HOS) 검사** : 정액을 Sweden, Foote, Hannover의 세가지 동결 희석배지로 희석하여 동결한 후 용해하여 정자생존율, 정자운동성(최대운동성과 평균운동성) 및 Kumi-Diaka<sup>16</sup>방법에 준한 HOS 검사를 실시하여 그 수치를 희석배지에 따라 비교하였다.

희석배지의 조성은 Table 1과 같다.

동결 희석 방법은 전술한 내용과 동일하며, 용해는 37°C에서 30초간에 걸쳐 실시하였다.

**동결방법에 따른 용해후 정자의 성상 및 HOS 검사** :

**Table 1.** Composition of semen extender

| Component           | Extender |        |                      |
|---------------------|----------|--------|----------------------|
|                     | Foote    | Sweden | Hannover             |
| Tris base           | 3.03 g   | 2.4 g  | Tris citrate 3.028 g |
| Citric acid         | 1.69 g   | 1.4 g  | Citric acid 1.78 g   |
| Glucose             | 1.25 g   | 0.8 g  | Fructose 1.25 g      |
| Na-benzilpenicillin | 0.0119 g | 0.06 g |                      |
| Streptomycin        | 0.1 g    | 0.1 g  |                      |
| Egg-yolk(powder)    | 20 g     | 20 g   | 20 g                 |
| Glycerin            | 5%       | 5%     | 6%                   |
| D.W                 | 100 ml   | 100 ml | 100 ml               |

개의 정액 동결시 융해후 생존성을 높일 수 있는 동결방법을 알아보기 위하여 다음과 같이 세 그룹으로 구별하여 동결 보존한 후 융해하여 정자의 생존을 및 정자의 운동성, 그리고 HOS 수치를 비교하였다. 이때 희석액은 Sweden 희석배지를 이용하였고 glycerol은 5%가 되도록 조성하였다. 융해는 37°C에서 30초간 실시하였다.

#### 1) Program freezer 이용 동결법

- Glycerol평형을 마친 스트로를 동결기(Minicool 40 PC, Air Liquid, France) chamber에 넣은 후 동결속도를 설정하여 동결하였다. 동결속도는 5°C부터 -25°C까지 10°C/min로 강하한 후 -25°C부터 -125°C까지 25°C/min로 동결하였다. -125°C에 도달한 후 스트로는 액체질소내 넣어 보존하였다.

#### 2) Polystyrene freezer 이용 동결법

- 전술한 Polystyrene 상자내 철제 rack를 넣고 액체질소를 상자내 부었다. rack의 상단이 액체질소 수면 위 2cm가 되도록하여 rack위에 스트로를 넣고 15분간 동결하였다. 그 후 액체질소내 넣어 보존하였다.

#### 3) Methanol 이용 동결법

- 스트로를 5°C로 유지된 methanol이 들어있는 플라스크 병에 넣은 후 -80°C의 deep freezer에서 40분간 동결하였다. 동결된 스트로는 그 후 액체질소내 넣어 보존하였다.

**급속동결과 완만동결 속도에 따른 융해후 정자의 성상 및 HOS 검사 :** 프로그램 동결기와 polystyrene동결기에서 동결시 급속동결속도와 완만동결 속도를 구분하여 동결 보존한 후 융해하여 정자의 생존을, 최대운동성, 평균운동성, 활력 및 HOS 수치를 비교하였다. 동결배지, glycerol % 및 융해방법은 전술한 방법과 같다.

**1 그룹:** 프로그램 동결기 급속동결 군으로서 상기 program 동결의 동결속도와 같다.

**2 그룹:** 프로그램 동결기 완만동결 군으로서 5°C부터 -25°C까지 5°C/min로 강하한 후 -25°C부터 -100°C까지 10°C/min로 동결하였다.

**3 그룹:** Polystyrene 동결기 급속동결군으로서 상기 polystyrene 동결속도와 같다.

**4 그룹:** Polystyrene 동결기 완만동결군으로서 철제 rack 상단이 액체질소 수면 위 5cm에 있도록 설치한 후 스트로를 상단에 넣고 30분간 동결하였다.

**Glycerol 농도에 따른 융해후 정자의 성상 및 HOS 검사 :** Glycerol 농도에 따라 동결 융해 후 정자의 생존을, 정자의 최대운동성, 평균운동성 및 HOS 수치를

비교하기 위하여 Glycerol 농도를 3%, 5%, 7%로 서로 다르게 조성하여 동결하였다. 동결배지는 Sweden 배지를 사용하였다. 융해방법은 앞에서와 동일하였다.

**Seeding 처리가 급속동결과 완만동결시 융해후 정자의 성상 및 HOS 검사에 미치는 영향 :** Polystyrene 동결기를 이용하여 급속동결과 완만동결시 seeding 처리가 융해후 정자의 생존을, 정자의 운동성 및 HOS 수치에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동결과정중 seeding처리를 하였으며, 희석배지는 5% glycerol 조성, Sweden 배지를 이용하여 동결하였다.

급속 및 완만 동결속도는 급속동결과 완만동결 속도 실험에서의 3그룹 및 4그룹과 각각 동일 하였다. 각 동결속도마다 seeding 비처리 스트로를 함께 놓아 control군으로 하여 전체 4개군으로 구분하였다.

이때, 동결 완료시 초저온 온도계(Precision)를 사용하여 정액스트로가 위치한 부위의 온도를 측정된 결과 급속동결 완료시는 -160°C, 완만동결 완료시는 -80°C이었다. 따라서, seeding 처리는 급속동결의 경우는 동결개시 후 1분에, 완만동결의 경우는 동결개시 후 5분에 실시하였고, seeding방법은 needle holder를 액체질소에 담갔다가 스트로 상단부위를 짚는 방법으로 실시하였다. 동결 후 스트로는 액체질소내 보존하였고 융해방법은 앞에서와 동일하였다.

**융해후 정액 straw 절단 부위에 따른 정자의 성상 조사 :** Sweden 배지(5% glycerol)를 이용, polystyrene 동결기 급속동결방법으로 동결된 스트로를 융해후 절단시 절단 부위에 따른 정자의 생존을 및 정자의 운동성을 조사하였다. 조사부위는 스트로의 말단부분, 1/4부분, 1/2부분의 세부분으로 절단한 후 각 부분에 대한 정자의 성상을 조사하였으며 융해방법은 앞에서와 동일하였다.

**융해 조건에 따른 정자의 성상 조사 :** 동결된 정액을 여러가지 융해조건에서 융해할 때 정자의 생존을 및 정자의 운동성에 미치는 영향을 알아보고자 다음과 같은 세가지 조건으로 융해하였다.

1군: 75°C에서 10초

2군: 37°C에서 30초

3군: 실온(18-20°C)에서 3분

**동결정액의 인공수정 및 수정의 판정 :** 인공수정을 위한 정액의 주입은 질점액 검사 및 progesterone kit (canine ovulation timing test, Synbiotics, USA)를 이용하여 progesterone 치를 측정하였고 LH surge로 인정한 날로부터 3일과 5일 각각 2회 또는 7일(3회)에 걸쳐 주입하였으며, 정액량은 1회 주입당 2억-3억의

**Table 2.** Individual semen analysis for raw and frozen-thawed canine semen

| Individual identification | No. of collection | Raw semen    |                | Frozen-thawed semen |                     |                     |
|---------------------------|-------------------|--------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                           |                   | Viability(%) | Abnormality(%) | Viability(%)        | Maximum motility(%) | Average motility(%) |
| A                         | 11                | 89.55        | 16.00          | 48.45               | 70.00               | 45.00               |
| B                         | 6                 | 85.00        | 15.67          | 9.67                | 48.33               | 22.50               |
| C                         | 3                 | 88.00        | 15.00          | 50.70               | 70.00               | 50.00               |
| D                         | 3                 | 85.00        | 18.00          | 17.00               | 60.00               | 25.00               |
| E                         | 4                 | 88.75        | 15.50          | 40.00               | 60.00               | 30.00               |
| F                         | 3                 | 88.00        | 15.50          | 22.50               | 45.00               | 27.50               |
| G                         | 5                 | 88.75        | 10.00          | 35.00               | 50.00               | 25.00               |
| H                         | 4                 | 89.50        | 15.00          | 15.00               | 40.00               | 20.00               |
| I                         | 3                 | 90.50        | 14.00          | 25.00               | 50.00               | 35.00               |
| Mean                      | 4.7               | 88.17        | 14.96          | 29.26               | 54.81               | 31.11               |

A: Tosa(45 kg), B: Mixed(30 kg), C: Pointer(35 kg), D: Poodle(5 kg), E: Shitzu(3 kg), F: Poodle(3.5 kg), G: Maltese(3.5 kg), H: Yorkshire Terrier(3.2 kg), I: Mixed(17 kg).

정자가 주입되도록 하였다(4-6 straw). 동결정액을 용해후 Rota 동<sup>26</sup>의 방법에 준한 CCM 배지를 동량 첨가하였다.

주입시 질내주입을 실시하였으며, 주입기는 balloon catheter를 이용하였다. 주입 후 5-10분간 후구를 들어 정자가 경관내 들어가도록 하고 음핵 부위를 3-5분간에 걸쳐 마사지하였다.

수정의 판정은 2회째 정액 주입후 9-11일 사이 복벽 절개후 수정란을 회수하여 수정란의 존재여부 및 발달상황에 따라 판정하였다.

**통계분석:** 이 실험에서의 결과는 실험군에 따라 T 검정 또는 ANOVA로 통계처리하였으며 ANOVA 통계처리상의 유의성 검정은 DUNCAN 다중검정에 의해 실험군간 유의차를 구하였다.

## 결 과

종모견 9두에 대하여 개체별 원정액에 대한 정상검

사 및 동결 용해후 생존율과 정자 운동성을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서와 같이 개체별로 원정액 정상검사서 모든 개체는 85%이상의 생존율(85.00-90.50%)을 나타내었고 기형율은 20% 미만이었다(10.00-18.00%).

한편 모견 9두 정자의 평균 용해후 생존율은 29.3%이었으나, 개체에 따라 9.7%에서 50.7%의 생존율을 나타내었다.

정자의 최대 운동성은 전체 평균 54.8%이었으나 개체에 따라 40.0%에서 70.0%의 차이를 나타내었다. 평균 운동성에서도 전체 평균 31.1%이었으나 개체에 따라 20.0%에서 50.0%의 차이를 나타내었다.

정액을 Sweden, Foote, Hannover의 세가지 동결희석배지로 희석하여 동결한 후 용해하여 정자생존율, 정자운동성 및 HOS 수치를 비교한 결과는 Table 3과 같다.

용해후 정자 생존율은 각 배지 상호간에 유의성은 없었으나 Sweden 배지가 가장 높은 수치를 나타내었다.

**Table 3.** Assessment of thawed characteristics and hypoosmotic swelling(HOS) values for the canine semen frozen according to different freezing extenders(% , mean±SD)

| Sperm characteristics | HOS-v | Semen extenders          |                         |                         |
|-----------------------|-------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                       |       | Foote                    | Hannover                | Sweden                  |
| Viability             |       | 32.00±17.51              | 30.00±10.54             | 40.00±15.63             |
| Maximum motility      |       | 55.00±14.53 <sup>b</sup> | 60.50±8.64 <sup>b</sup> | 70.50±7.25 <sup>a</sup> |
| Average motility      |       | 31.80±12.03              | 37.00±7.89              | 41.50±8.83              |
|                       | HOS-v | 28.10±14.29              | 31.60±13.99             | 35.40±15.08             |

a, b: Different superscripts denote significant differences within rows(p<0.05).

HOS-v: HOS-values

**Table 4.** Assessment of thawed sperm characteristics and HOS values for the canine semen frozen according to different freezing methods(% , mean±SD)

| Sperm characteristics | HOS-v | Freezing methods         |                          |                             |
|-----------------------|-------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
|                       |       | Programmable freezer     | polystyrene freezer      | Deep freezer using methanol |
| Viability             |       | 46.00±10.04 <sup>a</sup> | 43.25±9.88 <sup>a</sup>  | 12.88±11.73 <sup>b</sup>    |
| Maximum motility      |       | 70.00±8.02 <sup>a</sup>  | 68.13±5.94 <sup>a</sup>  | 58.13±13.08 <sup>b</sup>    |
| Average motility      |       | 41.25±6.94 <sup>a</sup>  | 40.63±8.21 <sup>a</sup>  | 25.63±7.29 <sup>b</sup>     |
|                       | HOS-v | 47.38±16.33 <sup>a</sup> | 43.75±16.66 <sup>a</sup> | 21.13±7.86 <sup>b</sup>     |

a, b: Different superscripts denote significant differences within rows(p<0.05).

HOS-v: HOS-values

정자의 최대운동성은 Sweden 배지가 다른 두 배지에 비해 더 높은 운동성을 나타내었다(p<0.05). 평균 운동성과 HOS 수치는 배지 상호간 유의성 있는 차이는 없었으나, Sweden배지에서 가장 높은 수치를 나타내었다.

개 정자를 세가지 동결기로 동결한 후 융해하여 동결방법에 따라 정자생존율, 정자의 최대 운동성, 평균 운동성 및 HOS 수치를 비교한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서와 같이 정자의 생존율은 프로그램 동결 정자와 polystyrene 동결 정자는 상호간에 유의성 있는 차이없이 methanol을 이용한 deep freezer 동결 정자 보다 유의성 있게 더 높은 생존율을 나타내었다(p<0.05).

최대 운동성과 평균 운동성에서도 프로그램 동결정자와 polystyrene 동결정자는 deep freezer 동결정자 보다 유의성 있게 더 높은 운동성을 나타내었다(p<0.05).

한편, 프로그램 동결 정자와 polystyrene 동결 정자는 모든 항목에서 상호간에 유의성 있는 차이는 없었으나

**Table 5.** Comparisons of thawed sperm viability and HOS values between fast and slow cooling rate(% , mean±SD)

| Sperm characteristics | HOS-v | Freezing methods        |                         |                         |                          |
|-----------------------|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                       |       | Programmable freezer    |                         | Polystyrene freezer     |                          |
|                       |       | Fast                    | Slow                    | Fast                    | Slow                     |
| Viability             |       | 53.33±7.53 <sup>a</sup> | 38.33±6.06 <sup>b</sup> | 50.00±6.32 <sup>a</sup> | 48.33±8.76 <sup>b</sup>  |
| Maximum motility      |       | 76.67±4.08 <sup>a</sup> | 67.50±2.74 <sup>b</sup> | 75.83±4.92 <sup>a</sup> | 74.17±4.92 <sup>a</sup>  |
| Average motility      |       | 53.33±7.53 <sup>a</sup> | 37.50±5.24 <sup>b</sup> | 51.67±7.53 <sup>a</sup> | 50.83±11.58 <sup>a</sup> |
|                       | HOS-v | 58.00±9.27              | 48.83±9.24              | 60.67±8.14              | 55.17±13.67              |

a, b: Different superscripts denote significant differences within rows(p<0.05).

Fast: Fast cooling rate

Slow: Slow cooling rate

HOS-v: HOS-values

**Table 6.** Thawed sperm characteristics and HOS values of the semen frozen with different concentration of glycerol in semen extender(% , mean±SD)

| Sperm characteristics | HOS-v | % of Glycerol in semen extender |                          |                          |
|-----------------------|-------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       |       | 3%                              | 5%                       | 7%                       |
| Viability             |       | 7.67±6.65 <sup>a</sup>          | 23.89±15.57 <sup>b</sup> | 23.44±15.80 <sup>a</sup> |
| Maximum motility      |       | 46.67±24.87                     | 65.56±11.02              | 61.11±11.93              |
| Average motility      |       | 20.00±11.99                     | 32.22±11.76              | 28.89±10.54              |
|                       | HOS-v | 30.56±15.34                     | 46.11±15.04              | 40.78±14.64              |

\*Semen extender: Sweden extender

a, b: Different superscripts denote significant differences within rows(p<0.05).

HOS-v: HOS-values

**Table 7.** Effect of seeding on sperm characteristics and HOS values after thawing between fast and slow cooling rate(% , mean±SD)

| Sperm characteristics | HOS-v | Cooling rate             |                          |                          |                          |
|-----------------------|-------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       |       | Fast                     |                          | Slow                     |                          |
|                       |       | Seeding                  | Non-seeding              | Seeding                  | Non-seeding              |
| Viability             |       | 44.67±16.81              | 42.50±16.96              | 42.17±17.03              | 38.86±18.77              |
| Maxmum motility       |       | 70.83±5.85               | 66.67±12.11              | 65.83±15.94 <sup>a</sup> | 55.50±17.25 <sup>b</sup> |
| Average motility      |       | 49.17±14.63 <sup>a</sup> | 44.17±14.63 <sup>b</sup> | 39.67±16.57              | 38.83±15.75              |
|                       | HOS-v | 50.00±15.74              | 48.50±15.22              | 50.17±18.86 <sup>a</sup> | 44.50±16.42              |

a, b: Different superscripts denote significant differences within rows(p<0.05) by each cooling rate.

Freezing equipment: polystyrene freezer

HOS-v: HOS-values

프로그램 동결 정자가 더 높은 수치를 나타내었다.

프로그램 동결기와 polystyrene 동결기에서 정액을 동결시 급속동결 방법과 완만동결 방법으로 구분하여 용해후 정자의 생존율, 정자의 최대운동성, 평균운동성 및 HOS 수치를 비교한 결과는 Table 5와 같다.

정자의 생존율에서 프로그램 동결기 급속동결 방법 및 polystyrene 급속동결 방법은 각각 양 동결기의 완만동결 방법에서 보다 더 높은 생존율을 나타내었다(p<0.05).

정자의 최대운동성 및 평균운동성은 프로그램 동결기 완만동결 방법에서 다른 세 군보다 더 낮은 운동성을 각각 보였다(p<0.05).

프로그램 동결기 완만동결방법을 제외한 나머지 세 군간에는 유의성 있는 차이는 없었으나 프로그램동결기 급속동결 방법에서 가장 높은수치를 나타내었다.

HOS 수치에서는 polystyrene 동결기 급속동결 방법에서 가장 높은 수치를 나타내었으나 4 그룹간 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

Glycerol 농도를 3%, 5%, 7%로 다르게 조성하여 동결한 후 용해하여 정자의 생존율, 정자의 최대 운동성, 평균운동성 및 HOS 수치를 비교한 결과는 Table 6과 같다.

Table 6에서와 같이 정자의 용해후 생존율에서 5%

glycerol과 7% glycerol 농도로 동결된 정자는 3% glycerol로 동결된 정자 보다 각각 더 높은 생존율을 나타내었다(p<0.05).

정자의 최대운동성, 평균운동성 및 HOS 수치에서 5% glycerol로 동결된 정자는 세 군 중에서 용해후 가장 높은 수치를 보였으나 실험군간 유의성있는 차이는 인정되지 않았다.

간이동결 방법인 polystyrene 동결기 이용 급속동결과 완만동결 방법 각각에서 seeding 처리가 용해후 정자의 생존율, 정자의 최대 운동성, 평균 운동성 및 HOS 수치에 미치는 영향을 알아본 결과는 Table 7과 같다.

Table 7에서와 같이 급속동결 방법에서 seeding 처리군은 정자의 평균 운동성에서 비처리군 보다 더 높은 운동성을 나타내었다(p<0.05). 정자의 생존율, 최대 운동성 및 HOS 수치에서는 seeding 처리군이 비처리군 보다 더 높은 수치를 나타내기는 하였으나 상호간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 완만동결 방법에서는 정자의 최대 운동성과 HOS 수치에서 seeding 처리군은 비처리군 보다 더 높은 운동성과 수치를 각각 나타내었다(p<0.05). 정자의 생존율과 평균 운동성에서도 seeding 처리군은 비처리군 보다 더 높은 수치를 나타내기는 하였으나 유의성 있는 차이는

**Table 8.** Assessment of thawed sperm characteristics according to different cutting part of straw(% , mean±SD)

| Sperm characteristics | Cutting part of straw  |                          |                          |
|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       | Tip                    | 1/4                      | 1/2                      |
| Viability             | 8.44±3.28 <sup>c</sup> | 24.56±13.63 <sup>b</sup> | 35.60±15.10 <sup>a</sup> |
| Maxmum motility       | 52.22±12.28            | 61.67±17.68              | 67.80±12.30              |
| Average motility      | 32.22±17.46            | 39.44±10.74              | 40.00±10.90              |

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

**Table 9.** Canine sperm characteristics thawed according to different thawing temperatures(% , mean±SD)

| Time after thawing | Thawing temperature | Sperm characteristics |                          |                  |
|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|------------------|
|                    |                     | Viability             | Maximum motility         | Average motility |
| Immediately        | 75 °C, 10 ses       | 44.67±12.59           | 70.83±6.65 <sup>A</sup>  | 47.50±12.94      |
|                    | 30-35 °C, 30 sec    | 38.83±13.04           | 65.83±4.92 <sup>A</sup>  | 41.67±11.69      |
|                    | 18-20 °C, 3 min     | 25.16±15.51           | 55.00±10.49 <sup>B</sup> | 32.50±16.05      |
| After 1 hour       | 75 °C, 10 ses       | 41.67±15.38           | 69.17±10.21 <sup>a</sup> | 45.00±13.78      |
|                    | 30-35 °C, 30 sec    | 35.00±15.17           | 61.66±8.16 <sup>a</sup>  | 40.00±13.04      |
|                    | 18-20 °C, 3 min     | 24.17±16.86           | 50.83±11.14 <sup>b</sup> | 33.33±12.52      |

A, B: Different superscripts denote significant superscripts within columns(p<0.01).

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

**Table 10.** Result of fertilization by artificial insemination\* with canine frozen-thawde semen

| Semen Analysis at AI(mean %) |      |      | No. of sperm/Insem. | No. of AI (times) | Individual female | Embryos collected after AI |        |        |        |             | Result     |           |
|------------------------------|------|------|---------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|--------|--------|--------|-------------|------------|-----------|
| Viability                    | MM   | AM   |                     |                   |                   | 2 cell                     | 4 cell | 8 cell | Morula | Degenerated |            | Total     |
| 20.0                         | 60.0 | 30.0 | 30×10 <sup>7</sup>  | 2                 | 1                 |                            | 2      | 1      |        |             | 3          | Fert.     |
| 22.5                         | 65.0 | 32.5 | 20×10 <sup>7</sup>  | 2                 | 2                 | 1                          | 1      | 1      |        | 1           | 4          | Fert.     |
| 22.7                         | 63.3 | 35.0 | 20×10 <sup>7</sup>  | 3                 | 3                 | 4                          |        |        |        |             | 4          | Fert.     |
| 46.7                         | 72.0 | 36.7 | 25×10 <sup>7</sup>  | 3                 | 4                 | 2                          |        |        | 1      |             | 3          | Fert.     |
| 36.7                         | 60.0 | 28.3 | 20×10 <sup>7</sup>  | 3                 | 5                 | 1                          |        |        |        |             | 1          | Fert.     |
| 35.5                         | 62.5 | 33.6 | 20×10 <sup>7</sup>  | 2                 | 6                 |                            |        |        |        |             | -          | Non-Fert. |
| Mean                         | 30.7 | 63.8 | 32.7                |                   |                   |                            |        |        |        |             | 15         |           |
| Rate of fertilization        |      |      |                     |                   |                   |                            |        |        |        |             | 5/6(83.3%) |           |

MM: Maximum motility AM: Average motility Fert: Fertilization

\*: Insemination was done by in-vagina infusion method.

없었다.

동결된 스트로를 용해후 절단시 절단부위에 따른 정자의 생존율, 최대 운동성 및 평균 운동성은 Table 8과 같다.

Table 8에서와 같이 정자의 생존율에서 1/2 절단부위는 1/4 절단 부위 보다, 1/4 절단부위는 말단 부위 보다 각각 더 높은 정자 생존율을 나타내었다(p<0.05).

또한, 정자의 최대 운동성 및 평균 운동성에서 1/2 절단 부위는 다른 두 부위 보다 더 높은 수치를 나타내었으나, 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

동결된 정액을 75°C에서 10초, 30-35°C에서 30초, 18-20°C에서 3분에 용해하여 정자의 생존율, 정자의 최대 운동성 및 평균 운동성을 비교한 결과는 Table 9와 같다.

Table 9에서와 같이 서로 다른 용해온도 및 용해조건에 따라 용해하였을 때 용해후 정자의 생존율 및

정자의 평균운동성에서 75°C군은 가장 높은 수치를 나타내었으나 각 용해군 간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 75°C군과 30-35°C군은 18-20°C군 보다 용해 즉시에는 현저히 높은 운동성을(p<0.01), 용해후 1시간에는 유의성있게 높은 운동성을 나타내었다(p<0.05).

정자의 최대 운동성에서도 75°C군은 30-35°C군 보다 높은 수치를 나타내기는 하였으나 상호간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

동결된 정액을 발정기에 있는 암개에 주입후 수정란을 확인하는 방법으로 수정 결과를 판정한 결과는 Table 10과 같다.

Table 10에서와 같이 동결정액의 용해후 주입시 생존율은 평균 30.7%(20.0-46.7%)이었으며, 정자의 최대 운동성은 평균 63.8%(60-72%), 평균 운동성은 32.7%(28.3-36.7%) 이었다. 2-3회 수정후 9-10일에

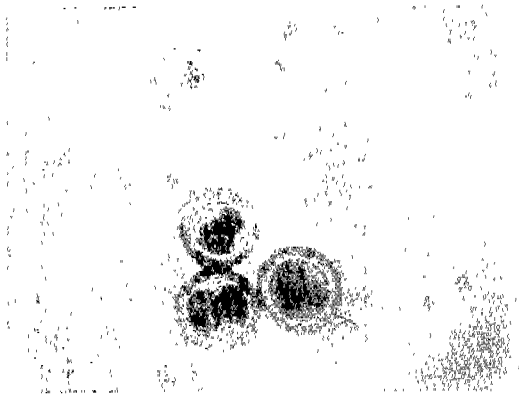


Fig 1. Four two-cell canine embryos collected from a bitch on day 9 after artificial insemination with frozen-thawed semen.

Fig. 1에서와 같이 수정란을 회수하였으며 총 15개의 수정란이 회수되었고, 6마리중 5마리에서 수정란이 회수되어 83.3%의 수정율을 나타내었다.

## 고 찰

이 실험에서 종모견 9두는 원정액 상태에서 서로 유사한 생존율을 보였고 기형율에서도 20% 미만으로서 서로 유사한 수치를 나타내었다. 그러나, 용해후 생존율에서는 개체간 많은 차이를 보여 개체에 따른 생존율은 가장 낮은 개체에서 9.7%, 가장 높은 개체에서는 50.7%의 생존율을 나타내었다. 또한, 정자의 최대 운동성은 40.0-70.0%, 평균 운동성은 20.0-50.0%의 개체간 범위를 나타내어 개체간의 차이가 적지 않게 확인 되었다. 이 결과를 볼 때, 개 정액은 동결시 개체에 따라 내동성에서 많은 개체적인 차이가 있음을 인정할 수 있었다.

이용하여 개 정액을 동결하고 있다는 것도 관심을 가질 수 있는 점으로 판단된다.

이 실험에서 용해후 정자의 생존성을 높이기 위한 정액 배지를 알아보기 위하여 기존의 Foote<sup>10,11</sup>, Hannover<sup>37</sup>, Sweden<sup>26,32</sup> 배지에 정액을 각각 회석후 동결하여 용해후 정자의 성상 검사 및 HOS 수치를 조사한 결과, 모든 정액 성상 및 HOS 수치에서 Sweden 배지는 유의성 있는 차이는 아니었으나 더 양호한 수치를 나타내었다. 정자의 최대 운동성에서는 Sweden 배지가 다른 두 배지에 비해 유의성 있게 더 높은 운동성을 나타내었다. Sweden 배지는 다른 두

배지 보다 tris, citric acid, glucose가 다소 낮은 함량으로 조성되는데 이 조건이 개 정자 생존성에 더 적합했던 것으로 보이며 Sweden 배지를 이용한 Rota 등<sup>26</sup>의 연구에서 80%이상의 높은 수태율을 올릴 수 있었던 것도 배지가 개 정자의 생존성을 높였던 하나의 조건이 될 수 있을 것으로 보여진다.

이 실험에서 정자를 세가지 동결기로 동결한 후 용해하여 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치를 조사한 결과, 프로그램 동결 정자와 polystyrene 동결기 동결 정자는 methanol 이용 deep freezer 동결정자 보다 더 높은 생존율 및 운동성을 나타내었다. 이것은 김 등<sup>37-39</sup>의 결과에서 methanol 이용 동결시 보존기간이 지날수록 정자의 생존율이 현저히 감소하는 결과와 유사한 경향으로 비교할 수 있는 점이라고 보겠다.

한편, 프로그램 동결은 polystyrene 동결기보다 유의성 있는 차이는 아니었으나 모든 항목에서 더 양호한 수치를 나타내었는데, Rota 등<sup>26</sup>이 프로그램 동결기를 이용해서 더 높은 생존율을 보인 결과와는 다소의 차이는 있으나 유사한 경향을 보인 것으로 생각된다. 개 정액 동결시 보다 간이하고 실용적인 방법을 추구하는 관점에서 보면 과거 김 등<sup>37,38</sup>이 이용한 methanol 이용 방법 보다는 polystyrene box 동결 방법은 이 실험에서 대체적으로 양호한 용해후 성적을 나타내었으므로 추천할 수 있는 방법으로 생각되며, 아직도 많은 연구자들이 이 방법을 이용하여 개 정액을 동결하고 있다는 것도 관심을 가질 수 있는 점으로 판단된다.

이 실험에서 프로그램 동결기와 polystyrene 동결기에서 개 정액을 동결시 급속동결 방법과 완만동결 방법의 동결속도를 설정하여 동결후 용해하여 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치를 비교한 결과 양 동결기 모두에서 급속동결시 완만동결보다 더 높은 생존율을 보였고, 정자 운동성에서도 더 양호한 경향을 보였다.

수정란의 세포는 정자보다 훨씬 더 크기 때문에 완만동결법이 추천되고 있으나<sup>3,14,15</sup>, 정자에서는 완만동결시 정자의 수분이 더 많이 유출됨으로써 삼투압 충격이 발생하는 것으로 보여 정자의 경우 정자세포내 결빙 또는 삼투압이 발생되지 않는 일정한 동결속도에서 급속동결속도가 더 선택된다고 보여진다.

이 실험에서 glycerol 농도를 서로 다르게 하여 동일한 Sweden 배지로 동결한 후 용해하여 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치를 비교한 결과 5%와 7% glycerol 조성시의 정자는 3%의 경우보다 용해후 더 높은 생존율을 나타내었다. 이것은 대부분의 연구자들



이 개정액 동결시 5% 또는 7% glycerol 조성을 사용한 것과 유사한 결과로 사료되며, 이 실험에서 5% glycerol의 경우 7% glycerol 보다 유의성 있는 차이는 없었으나 더 양호한 수치를 보였으므로, glycerol이 한편 살아있는 세포에 대한 불리한 점을 감안할 때 5%로 조성하는 것이 더 바람직하다고 판단된다.

이 실험에서 polystyrene 동결기를 사용하여 동결시 급속동결과 완만동결 방법 각각에서 seeding 처리군은 비처리군보다 더 높은 운동성 또는 HOS 수치를 나타내는 경향을 나타내었다.

생체세포의 동결시 seeding 처리의 필요성은 Leibo<sup>18</sup>의 보고에서 잘 알려져 있는데, 이 실험에서의 결과는 김 등<sup>41</sup>의 결과와 유사한 결과이며, seeding은 정자세포내 latent heat를 제거하는 것으로 보인다. 이 실험에서 seeding 온도는 대체로 -5--6°C에서 이루어졌는데 이 결과는 Leibo<sup>18</sup>의 과냉각상태가 소 수정란에 유해한 영향을 미치는 것을 피하기 위하여 -6--7°C에서 seeding하는 것이 필요하다는 결과에 근접한 온도 범위이며, 김 등<sup>41</sup>에서도 개에서는 -5°C 또는 -5-10°C 사이를 선택하는 것이 필요하다고 한 보고와 동일한 결과로 판단된다.

이 실험에서 개 정액을 동결하여 융해시 절단부위에 따른 정자의 생존을 및 정자의 운동성을 조사한 바, 정자의 운동성에서는 절단부위에 따른 유의성 있는 차이는 인정이 되지 않았으나 정자 생존율에서는 중간 부위의 정자가 1/4 부위 또는 말단부위 보다 더 높은 생존율을 나타내었다. 이 결과는 정액 스트로를 동결시 말단 부위의 정자의 사멸율이 높다는 것을 시사하며, 동결정액의 융해후 검사시에는 중간 부위를 선택하여 절단할 것을 권장할 수 있다.

이 실험에서 동결된 개 정자를 서로 다른 융해온도 및 융해 조건에 따라 융해하였을 때 융해후 정자의 생존을 및 정자의 평균 운동성에서 75°C군과 30-35°C군은 18-20°C군 보다 융해 즉시 및 융해후 1시간에 더 높은 정자 운동성을 나타내었다. 이 실험에서 75°C군과 30-35°C군간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았으나 75°C군이 모든 항목에서 더 양호한 수치를 나타내었다. 이것은 Rota 등<sup>26</sup> 및 여러 연구자<sup>22,31</sup>들이 75°C에서 동결정액을 융해할 때 정자의 운동성이 더 높다고 한 결과와 비슷한 경향이라고 생각된다. 따라서 개 정액을 동결하여 융해시 75°C 또는 30-35°C 온도가 적정 온도로 판단되며, 75°C에서 융해하는 것이 더 선호될 수 있다고 사료된다.

이 실험에서 동결정액을 융해하여 암캐에 주입후

수정결과를 수정란 회수여부로 판정하였는데 암캐 6두중 5두에서 수정란이 회수되어 83.3%의 수정율을 나타내었다.

이 수정율은 김 등<sup>37,39</sup>, 및 여러 연구자들<sup>5,8,12,23,27</sup>의 보고와 비교할 때 질내 주입 방법으로는 상당히 높은 성적이다. 그러나 Rota 등<sup>26</sup>의 연구에서는 5두에 대한 질내 주입으로 75%의 수태율을 보고한 바 있다.

이 실험에서 수정율이 높게 나타난 것은 실험 동물의 숫자가 적은 것도(6두) 이유가 될 수 있겠으나, 질점액 검사<sup>40</sup>, progesterone 역가측정<sup>4,6,33</sup> 및 일부 개에 이용한 암캐의 숫캐허용 반응 등 여러 부분에서 발정기 개시시기 판정이 치밀하게 이루어진 점, 정자를 최소 1회 수정당  $20 \times 10^7$  이상을 주입했다는 점, 그리고 정자주입을 위해 특별히 balloon catheter를 이용했다는 점이 관련되는 것으로 보여진다. 아울러 앞에서 고찰한 바와 같이 인공수정시 마다 CCM 배지를 정액에 첨가했던 점도 고려될 수 있는 요건이 될 수 있을 것으로 보인다.

이상의 결과 개 정액 동결시 용해한 정자의 생존율을 높이기 위해서는 내동성이 강한 우수한 종모견을 사용해야 한다는 것, 동결기로서는 프로그램 동결기 또는 polystyrene 동결기를 사용할 수 있으며 실용성에 따라 선택할 수 있다는 것, 동결속도로서는 급속동결이 더 우수하다는 것, 동결 회석 배지내 glycerol 농도는 5% 또는 7%가 적당하다는 것, polystyrene 동결기 사용시 seeding 처리는 정자 운동성을 높일 수 있다는 것, 동결된 스트로를 융해하여 절단시 스트로 중간부위 정자를 선택해야 한다는 것, 동결후 융해시 융해온도는 75°C 또는 30-35°C가 바람직 하다는 것, 동결정액의 인공수정시 수정시기 판정, 주입기의 선택, 수정능획득 배지의 첨가, 적정수의 정자의 주입이 필요하다는 사실을 알게 되었다.

## 결론

개 동결 정액을 이용한 인공수정에서 수태율을 높일 수 있는 동결 조건 및 개 인공수정의 실용적인 방법을 알아보기 위하여 과거 번식 경험이 있는 牡犬 9두로 부터 정액을 채취하여 정액동결시 개체별 정자의 내동성, 동결시 융해후 정자 생존을 및 정자 운동성을 높일 수 있는 동결정액 배지 비교, 정액 동결기 비교, 급속 및 완만 동결 속도 비교, 동해방지제(glycerol) 조성 농도 비교, seeding 처리 영향, 융해후 스트로 절단시 절단부위에 따른 정자 생존을 및 정자

운동성, 동결 정액 용해시 용해온도 및 용해 조건 비교, 용해후 정자 수정능획득을 높일 수 있는 첨가 배지 비교, 동결정액 용해후 발정 빈견에 정액 인공수정 방법에 관한 실험을 실시하였다. 또한 정액을 질내주입후 수정란을 외과적으로 회수하여 수태율을 알아보았다.

1. 9두의 모견의 원정액의 생존율은 85.0-90.5%, 기형율은 10.0-18.0%로 개체간 유사하였으나, 동결 용해 후 생존율은 9.7-50.7%, 최대운동성은 40.0-70.0%, 평균운동성은 20.0-50.0%의 개체간의 차이를 나타내었다.

2. 동결희석배지로서는 Foote, Hannover, Sweden 배지중 Sweden 배지에서 가장 높은 정자운동성이 인정되었다( $p < 0.05$ ).

3. 동결기중 프로그램 동결기와 polystyrene동결기는 상호간에는 차이없이 methanol 이용 deep freezer 보다 더 높은 용해 후 정자생존율, 정자 운동성, HOS 수치를 나타내었다( $p < 0.05$ ).

4. 프로그램 동결기와 polystyrene 동결기 이용 개 정액동결시 급속동결 속도로 동결된 정자는 완만동결 속도로 동결된 정자보다 더 높은 생존율과 정자운동성을 보였다( $p < 0.05$ ).

5. 동해방지제(glycerol)의 조성을 서로 다르게 하여 동결한 결과 5% 또는 7% glycerol 농도로 동결된 정자는 3% glycerol로 동결된 정자보다 용해 후 더 높은 정자 생존율을 보였다( $p < 0.05$ ).

6. 동결과정중 seeding 처리는 비처리보다 더 높은 운동성과 HOS 수치를 나타내었다( $p < 0.05$ ).

7. 동결정액의 용해시 75°C, 10초 용해와 30-35°C, 30초 용해는 18-20°C, 3분간 용해보다 더 높은 정자 운동성을 나타내었다( $p < 0.05$ ).

8. 동결정액을 용해하여 빈견 6두에 질내 주입한 결과 5두에서 수정란이 회수되어 83.3%의 수정율을 나타내었다.

이상의 결과, 개 정액의 동결에서 용해후 정자의 양호한 생존율 및 운동성을 얻기 위해서는 동결희석액, 동결방법, 동결속도, 글리세롤 농도, seeding 처리, 용해온도를 고려해야 한다는 점과 용해후 정자의 수정능획득을 얻기 위해서는 CCM 배지가 유용하다는 점을 알게 되었다.

그리고 동결 정액의 질내주입에서도 적절한 수정적기, 정액량 및 정자수를 선정하고, 그리고 적절한 주입기를 사용할 때 양호한 수정율이 나타남을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Anderson K. Artificial insemination and storage for canine semen In: Morrow, Current Therapy in Theriogenology. 1st ed. Philadelphia. W. B. Saunders Co. 1980; 661-665.
2. Anderson K. Fertility of frozen dog semen. Proc 7th Int Cong Anim Repro AI, Munich, 1972; 1703-1706.
3. Archbald LF, Baker BA, Cloony LL, Godke RA. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotrophin. Vet Med/Sm Anim Cli, 1980; 228-238.
4. Badinand F, Fontbonne A, Maurel M.C, Siliart B. Determination of the period of fertilization in bitches using hormonal assays and A.I. with frozen semen. Theriogenology 1992; 38: 1755-1757.
5. Bowen RA, Amann RP, Fromen DP. Artificial insemination with frozen semen in the dog. Dog world. 1984; 69: 66-67.
6. Cinone M, Ghneim A, Cairra M. Collection and maturation of oocytes in the bitch. Theriogenology 1996; 46: 1767-1769.
7. Concannon PW, Battista M. Canine semen freezing and Artificial insemination. Current Veterinary Therapy X. Small Animal Practice. W.B. Saunders Co, 1989; 1247-1259.
8. Farstad W, Andersen Berg K. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. J Repro Fert Suppl 1989; 39: 289-292.
9. Foote RH. Artificial insemination of dogs. In: Current Veterinary therapy by Kirk, R.W. 3rd ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1968; 686-689.
10. 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: 32-36.
11. Foote RH. Extender for freezing dog semen. Am J Vet Res 1964; 25: 37-40.
12. Gill HP, Kaufman CF, Foote RH, Kirk RW. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen semen. Am J V 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. Harrop AE. The semen of animals and artificial insemination. J.P. Maule ed. Commom Wealth Agr. Bur. Farrhan Royal. 1962; 72-102.
15. Kinney GM, Pennycook JW, Schriver MD, Templeton JW, Kraemer DC. Surgical collection and transfer of canine embryos. Biol Reprod Suppl 1979; 1: 20.96A.

16. Kumi-Diaka J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 1993; 39: 1279-1289.
17. Lees GE, Castleberry MW. The use of semen for artificial insemination of German Shepherd dogs. *JAAHA* 1977; 13: 382-386.
18. Leibo SP. A one-step method for direct non surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1994; 21: 767-790.
19. Linde-Forsberg C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin No Am: Am Anim Prac* 1991; 21: 467-485.
20. Martin ICA. The freezing of dog spermatozoa to -79°C. *Rec Vet Sce* 1963; 4: 304.
21. Morton DB. Artificial insemination with frozen semen in the dog. In: James E.(ed.): *Reprductive clinical problems in the dog*, 2nd ed. London: Butterworths. 1988; 254-267.
22. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. Influence of extender, Cryopreservative and seminal processing procedures on post thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* 1989; 31(2): 451-459.
23. Platz CC, Seager SWJ. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab Anim Sci* 1977; 17: 1013-1016.
24. Province CA, Amann RP, Pickett BW, Squires EL. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 1984; 22: 409.
25. Rota A, Stram B, Linde-Forsberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 1995; 44: 885-900.
26. Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, H Rodriguez-Martinez. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. *Theriogenology* 1997; 47: 1093-1101.
27. Seager SWJ, Platz CC, Fletcher WS. Conception rates and related data using frozen dog semen. *J Reprod Fertil* 1975; 45: 189.
28. Seager SWJ, Fletcher WS. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet Rec* 1973; 92: 6.
29. Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest* 1969; 17: 6.
30. Silva LDM, Onclin K, Lejeune B, Versteegen JP. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec* 1996; 138: 154-157.
31. Smith FO. Update on freezing canine semen. In: Kirk RW, ed. *Current Veterinary Therapy 9th*. W B Saunders Co, Philadelphia. 1986; 1240-1248.
32. Strom B, Rota A, Linde-Forsberg C. *In-vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 1997; 48: 247-256.
33. Takeishi M, Akai R, Tsunekane T, Iwaki T, Nakanowatari K. Studies on the reproduction in the dog. A trial of ova transplantaion in dogs. *Jpn J Anim Reprod* 1980; 26: 151-153.
34. Tsutsui T, Tezuka T, Shimizu T, Murau I, Kawakami E, Ogasa A. Artificial insemination with fresh semen in Beagle bitches. *Jpn J Vet Sci* 1988; 50: 193-198.
35. Weidel, Prims GS. Cryosurvival of human spermatozoa frozen eight different buffer systems. *J Andol* 1987; 8: 41.
36. Yubi AG, Ferguson JM, Renton JP. Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. *J Small Anim Pract* 1987; 28: 753.
37. 김병진, 김용준. Methanol 이용동결후 액체질소내 보존된 犬精液의 人工授精에 관한 연구. *한국임상수의학회지*. 1995; 12(2): 207-214.
38. 김용준, 박영재, 김병진, 유일정. Methanol을 이용한 개정액 동결의 용해후 양호한 활력 및 생존력을 나타내는 정액 처리 조건. *한국임상수의학회지* 1994; 11(2): 207-214.
39. 김용준, 박영재, 김병진, 유일정. 개에서 동결정액을 이용한 인공수정-Methanol을 이용한 간이 동결방법-대한 수의학회지 1994; 34(4): 851-855.
40. 김용준. 자연 발정견 및 인공 발정 유도견에서 수정란 이식. *대한 수의학회지* 1994; 34(2): 395-406.
41. 김종호, 이필든, 유일정, 김용준. 犬精液 동결시 seeding 처리가 용해후 정자의 활력 및 생존율에 미치는 효과. *한국가축위생학회지* 1995; 19(1): 1-12.
42. 신남식, 문유식, 정몽희, 김용준. 개에서 내시경을 이용한 동결정액의 인공수정. *한국임상수의학회지* 1997; 14(2): 297-300.