

진도개 정액 동결 시 단당류 및 동결 속도가 생존율에 미치는 영향

최선호^{1,*}, 김성재¹, 조상래¹, 최창용¹, 손준규¹, 김종석², 오석일², 박병진², 김상현²
¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²진도개사업소

Factors Affecting the Survival Rates of Frozen-Thawed Spermatozoa in Jindo Dog by Monosaccharides and Freezing Rate

Sun-Ho Choi^{1,*}, Sung-Jae Kim¹, Sang-Rae Cho¹, Chang-Yong Choe¹, Jun-Kyu Son¹, Jong-Suk Kim², Suk-Il Oh², Byung-Jin Park² and Sang-Hyun Kim²

¹National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

²Korean Jindo Dog Center, Jindo 539-803, Korea

ABSTRACT

This studies were conducted to investigate the survival rate of frozen-thawed spermatozoa of Jindo Dog by mono-saccharide and freezing rates. Experimental animals were prepared 12 males within 1~8 year's old and collected once in a couple of weeks by digital manipulation methods. Collected semen was diluted 1:1 with Tris-egg yolk extender and added 4, 6 or 8% of glycerol and none, 4 mM glucose or 4 mM fructose as cryoprotectant and was equilibrated for 2 hrs in 4°C. In monosaccharide groups, the freezing rate was 5 cm-5 min. above LN₂. The survival rates without monosaccharide were 50.7±19.0%, 58.6±18.0%, 40.0±10.0% in 4, 6 or 8% glycerol, respectively. In addition of glucose, the survival rates were 43.1±14.7%, 38.1±16.5%, 33.3±4.0% in 4, 6 or 8% glycerol, respectively and in fructose, were 47.9±21.1%, 61.3±6.2%, 34.3±12.6% in 4, 6 or 8% glycerol, respectively. There showed significantly different between glycerol groups and monosaccharides groups (*p*<0.05). The survival rates of freezing rate in 5 cm-5 min. group was 64.5±15.8%, 51.9±27.6%, 29.7±24.8% and in 10 cm-10 min. group was 62.5±20.3%, 64.9±23.6%, 34.5±27.4% in 4, 6 or 8% glycerol, respectively. There were significantly different between freezing rates (*p*<0.05). These results suggest that the addition of fructose with 6%-glycerol and slow freezing improve the survival of frozen-thawed sperm in Jindo Dog.

(Key words : Jindo Dog, spermatozoa, freezing, monosaccharides, survival)

서 론

국민 소득의 향상과 함께 사람들이 핵가족화되어가면서 개는 애완동물에서 반려동물로 가치를 인정받기 시작하였으며, 이로 인해 개 산업이 더욱 활성화되어 국내에도 무려 1조원 규모의 시장을 형성하게 되었다. 개의 번식에 관련된 연구는 유럽 등에서 활발히 연구되어 왔으나(Iguer-Ouada와 Verstegen, 2001), 국내에서는 고가의 종견을 관리하고 번식용으로 사용하기에는 개인적으로는 많은 어려움이 있음에도 불구하고 자연 교배를 통한 방법이 널리 성행되었다. 우수한 종견의 정액을 수집하여 동결하게 되면 개량 및 번식이 편리하게 되어 산업적으로 활성화가 촉진되어 수요자가 원하는 반려동물을 육종할 수 있으며, 애완동물에 대한 지나친 과육과 돌발적인 무관심 등으로 유발되는 유기동물의 방지를 위해서도, 계획적인 생산 및 관리가 가능할 것이다. 개 정액 동결은 여러 분야에 다양

하게 연구가 진행되어 왔으며, 특히 개 정액의 특성상 체외에서의 생존성이 떨어지므로, 희석액(Abdelhakeam 등, 1991; 박 등, 1997)의 다양한 개발과 함께 동결이 시도되어 왔으나, 좋은 성적을 얻지는 못하였다. 동해 방지제는 주로 glycerol을 사용하였고, DMSO (Holt, 200)가 사용되기도 하였으며, 동해 방지제의 농도 및 평형 시간(Martin, 1963; Foote, 1964; England, 1993), 동결 속도(Andersen, 1975; Marzur 등, 1970; Morton, 1988, Strom, 1977; Dobrinski 등, 1993; 이 등, 2003)가 동결-용해 후 생존율에 미치는 영향이 가장 많이 보고되고 있다. 또한 생존율 향상을 위해 각종 첨가제를 넣어 사용하는데, glucose나 fructose 등 단당류(Ivanova-Kicheva 등, 1997; Rota 등, 1995; 유 등, 2002; 유와 공, 2003)의 첨가, 그리고 인지질(Farstad, 2009), Equex STM paste(김 등, 2002; Ninzanski 등, 2009) 등 비단백질을 이용하여 생존율을 향상시키는 노력을 하고 있다. 양이나 소의 정장에는 fructose나 sorbitol 등 탄수화물이 분포

* Correspondence : E-mail : sunho8722@korea.kr

하고 있다고 하며, 이는 정장으로 혈당과 fructose가 testosterone의 조절에 의해 전환되어 함유되는 것으로 알려져 있다(Garcia와 Graham, 1989). 최근에는 정장 분리의 기술 개발을 통해 대체 물질보다는 자연 조건을 이용한 생존을 향상을 위해 더 많은 관심을 기울이고 있다.

따라서 본 연구는 진도개 정액의 동결-융해 후 안정적으로 정액을 이용할 수 있도록 가장 기본적인 희석액인 난황트리스에 단당류의 첨가와 동결 속도를 조절하여 생존을 높이는 방법을 개발하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

본 연구에 사용된 공시동물은 진도개사업소(전남 진도군 소재)에서 사육 중인 1~8세의 수컷 성견 12두를 사용하였고, 자연 교미를 한 적은 있으나, 인공적으로 정액 채취의 경험이 전혀 없는 것을 이용하였다. 이들의 체중은 16~20 kg이었고, 각각 단독의 사육장에서 충분한 운동, 1회의 사료(대한사료) 급여와 무제한 물을 급여하여 사육하였다.

2. 정액 채취

정액 채취는 2주 1회의 간격으로 수압법을 이용하여 실시하였고, 발정 암컷을 주변에 두어 수컷이 리비도(libido)가 발생하도록 유도하였다. 청결한 채취를 위해 생식기 주위를 청결히 하고, 음경을 마사지하여 발기를 유도시킨 후 팽대부 밖으로 포피를 밀어내어 발기가 원활히 되도록 하였으며, 발기된 음경과 팽대부를 압박하며 사정을 유도하였다. 이 때 음경 표피가 건조하여 출혈이 발생되지 않도록 젤을 도포하였다. 사정된 정액은 총량의 조사를 위해, 전 정액을 채취하였고, 총 정액량과 총정자수 등의 일반적인 성상을 검사하였다.

3. 정액 검사

채취된 정액은 원심관으로 총 정액량을 환산하고, 정액을 1,500 rpm으로 20분간 원심분리하여 정장액과 농후부 정액을 분리하여 농후부 정액을 채취하였고, Makler chamber를 이용하여 총정자 수를 확인하였다. 정자의 활력은 정자 활동 자동 분석 장치(SIAS, Medical Supply, 한국)를 이용하여 활력을 조사하였다. 동결 보호제를 이용한 glycerol 평형과 예비 동결 시간에 따라 동결된 정액은 액체 질소통에 보관하기 전에 생존율을 검사하였다.

4. 정액의 동결 및 융해

희석액은 난황트리스액을 제조하였으며, 최종 pH는 6.5로 조정하였고, 삼투압은 280 mOsm/kg으로 조정하였으며, glucose와 fructose는 각각 4 mM을 첨가하여 정액 희석 및 동결

에 공시하였다.

정액의 동결은 정장액과 농후부를 분리하고, 농후부를 37°C 난황트리스액과 1:1로 희석하여, 정자가 안정화되도록 하였다. 희석된 정액은 동결 보호제 및 예비 동결 시간을 고려하여 6개 시험구로 나누어 4°C까지 냉각하였다. 동결 보호제인 glycerol을 4, 6, 8%로 구분하였다. 1:1로 희석된 정액이 4°C로 냉각된 후 glycerol 최종 농도의 1/8, 1/4, 1/2 그리고 최종 농도가 되도록 glycerol을 첨가하였고, 첨가는 각 15분 간격으로 하였으며, 최종 농도로 1시간 동안 평형을 실시하였다. 예비 동결 시간은 액체질소 위 5 cm 5분, 5 cm 10분을 실시한 후 액체질소에 침지하여 동결을 하였다. 단당류 첨가에 의한 생존성 검사는 예비 동결 시간을 액체질소 위 5 cm 5분간 실시 후 액체질소에 침지하여 동결을 실시하였다. Glycerol 평형은 4°C에서 2시간 동안 실시하여 최종 농도에 도달하도록 하였고, 평형이 된 정자는 $20\sim 40 \times 10^6$ cells/ml로 조정하여 스트로에 봉입하였고, 스트로 선단부는 sealing gel을 이용하여 봉합하였다. 동결된 정액은 동결 후 생존을 검사를 위해 액체질소에서 꺼내 공기 중에서 10초간 예비 융해를 하였고, 37°C 온수에서 20초간 융해한 후 생존을 검사를 하였다.

5. 통계 처리

본 연구에서 glycerol 농도와 단당류의 첨가, 액체질소 위에서 한 예비 동결 시간에 의한 생존을 실험을 4회 실시하였으며, 실험 결과는 통계 프로그램인 STATVIEW를 이용한 ANOVA test로 분석하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 단당류의 첨가에 의한 동결-융해 정액의 생존율

난황트리스 희석액을 기본 희석액으로 하여 glucose 또는 fructose 4 mM을 첨가하여 동결-융해한 진도개 정자의 생존율은 Table 1과 같다. 난황트리스 단독일 때, 4% glycerol에서 $50.7 \pm 19.0\%$, 6%는 $58.6 \pm 18.0\%$, 8%에서는 $40.0 \pm 10.0\%$ 를 나타냈고, glucose 첨가 시 4% glycerol에서는 $43.1 \pm 14.7\%$, 6%에서는 $38.1 \pm 16.5\%$, 8%에서는 $33.3 \pm 4.0\%$ 를 나타내었다. Fructose 첨가 시에는 4% glycerol에서 $47.9 \pm 21.1\%$, 6%에서 $61.3 \pm 6.2\%$, 8%에서는 $34.3 \pm 12.6\%$ 를 나타냈으며, 처리간에 유의성이 인정되었다($p < 0.05$). 가장 높은 생존율은 Tris-egg yolk+fructose에 6% glycerol 첨가 시, $61.3 \pm 6.2\%$ 로 가장 높은 생존율을 보였으며, 가장 낮은 것은 Tris-egg yolk+fructose에 8% glycerol 첨가 시 $33.3 \pm 4.0\%$ 로 나타났다.

2. 동결 속도에 의한 동결-융해 정액의 생존율

난황트리스 희석액을 기본 희석액으로 희석하고, 액체질소 위 5 cm에 5분간 예비 동결 시 4% glycerol에서 $64.5 \pm 15.8\%$,

Table 1. Survival rates of frozen sperm with monosaccharide and glycerol in Jindo Dog

Extender + additives	Glycerol conc. (%)	Survival rates(%) of frozen-thawed sperm
Tris-egg yolk	4	50.7±19.0 ^a
	6	58.6±18.0 ^a
	8	40.0±10.0 ^b
Tris-egg yolk + glucose	4	43.1±14.7 ^b
	6	38.1±16.5 ^b
	8	33.3± 4.0 ^c
Tris-egg yolk + fructose	4	47.9±21.1 ^a
	6	61.3± 6.2 ^a
	8	34.3±12.6 ^c

*The different superscripts mean significantly different ($p<0.05$)

**Freezing rate was 5 cm-5 min. above LN₂ gas.

Table 2. Survival rates of frozen-thawed sperm with tris-egg yolk extender on freezing rates in Jindo Dog

Freezing rates	Glycerol conc. (%)	Survival rates(%) of frozen-thawed sperm
5 cm - 5 min	4	64.5±15.8 ^a
	6	51.9±27.6 ^a
	8	29.7±24.8 ^b
5 cm - 10 min	4	62.5±20.3 ^a
	6	64.9±23.6 ^a
	8	34.5±27.4 ^b

*The different superscripts mean significantly different ($p<0.05$).

6%에서 51.9±27.6%, 8%에서 29.7±24.8%의 생존율을 보였고, 액체 질소 위 5 cm에 10분간 예비 동결 시 4% glycerol에서 62.5±20.3%, 6%에서 64.9±23.6%, 8%에서 34.5±27.4%를 나타내었다. 동결 속도에 따른 생존율은 유의차를 나타냈다($p<0.05$). 가장 높은 생존율을 나타낸 것은 6% glycerol 첨가에 액체질소 위 5 cm에서 10분간 예비 동결한 것이었고, 가장 낮은 것은 8% glycerol 첨가에 액체질소 위 5 cm에서 5분간 예비 동결한 것이었다.

고 찰

정액 동결에 당을 첨가한 연구는 많은 연구자들에 의해 실

시되어 왔다. Hafs와 Elliot(1955)는 아주 적은 양의 xylose와 fructose 등의 단당류를 첨가하면 소 정자의 생존성을 향상시킨다고 하였으며, Martin과 Emmens(1961) 등도 1.25%의 fructose 첨가에 의해 소 동결정액을 인공수정 후 발정재귀율이 현저히 낮아졌다고 보고하였으나, glucose의 첨가에 대한 연구는 없었다. 이러한 결과는 testosterone의 조절에 의해 정장 내에 fructose가 함유되는 양과 소의 경우와 같이 개 정장 내에도 fructose가 존재함으로써 glucose보다는 동결정액의 경우에도 더 좋은 결과가 나오는 것으로 사료되며, 본 연구의 결과도 대체적으로 fructose의 첨가에서 동결-용해 후 더 좋은 생존율을 나타냈다.

Hammerstedt 등(1990)은 적절한 동해 방지제와 농도가 동결정자의 생존성을 유지할 수 있으며, glycerol을 4~11%의 농도로 사용되고 있으나, DMSO 단독 혹은 혼합에 의해 동결성을 높이고 있다(Holt, 2000).

김 등(2002)은 Sweden extender 희석액에 3~8% glycerol과 Equex STM paste를 첨가하여 동결-용해 후 65.3~83.0%의 활력을 보였으나, 24시간 배양 후 60.1~71.3%로 떨어진다고 하였으며, glycerol은 5%에서 동결-용해 후와 24시간 배양에서 가장 높은 것으로 보고하여 본 연구의 용해 후 생존율보다는 다소 높은 경향이였다. 이는 Equex STM paste의 첨가에 의한 효과로 여겨지는데, 이는 난황의 활성도를 높이는 것으로 알려져 있어 다소 높은 생존율을 보이는 것으로 사료된다.

Dobrinski 등(1993)은 'slow', 'intermediate' 그리고 'fast' 등으로 동결 속도를 조정하였으나, 희석액간의 유의차가 인정되지 않았다. Kim 등(2007)은 난황트리스에 12% glycerol 첨가에 의해 동결-용해 후 활력은 64.9%를 나타내어 본 연구의 결과보다는 다소 높았으나, 용해 방법이 70℃ 온수에 8초간 용해하여 더 좋은 결과를 얻었을 것으로 생각된다. 또한 동결 시 6% glycerol에 액체질소 위 6 cm 10분간 예비 동결 후 동결한 것은 본 결과의 6% glycerol과 비슷한 결과를 얻어 본 연구 결과와 유사한 경향을 보였다.

이 등(2003a)과 정 등(2001)은 난황트리스 희석액에 8% glycerol 첨가에 의한 동결 시, 액체 질소 위 6 cm 예비 동결에서 54.0%의 생존율을 보고하여 본 연구에서 glycerol 8%의 29.7%보다는 높은 생존율을 보였다.

이 등(2003b)은 modified-TYB 희석액에 4~8% glycerol 첨가 시 4%첨가가 68.8%로 가장 높게 나타났으나, 본 연구는 6% glycerol 첨가가 가장 높은 58.6%를 나타내어 glycerol 농도에 차이를 보였으며, 본 연구의 결과보다 대체적으로 높은 생존율을 나타냈다. 또한, 예비 동결시 액체질소 위 5 cm에서 77.0%의 생존율을 나타내어 역시 본 연구 결과보다는 높게 나타냈다. 이상의 결과를 살펴보면 희석액에 따라 차이는 있으나, fructose가 glucose보다는 정액 동결에 좋은 효과를 보이는 것으로 사료되며, glycerol의 농도는 4~10%까지 다양하나 희석

(평균) 시간의 조절이 가장 중요하며 동결-융해 후 생존율에 가장 크게 영향을 미치는 요인으로 생각된다. 동결 속도는 프로그램 동결기보다는 급속 동결법이 현장작용을 위해서도 좋을 것으로 생각되며, 액체질소 증기위에서 10 cm 정도 이상에서 10분 이상이 개정액 동결에 유리한 것으로 나타났다.

결 론

본 연구는 진도개 정액 동결시 난황트리스 회석액을 이용하여 단당류와 동결 속도에 따른 동결-융해 후 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 진도개는 12두의 1~8세의 수컷으로 2주에 1회씩 수압법으로 정액을 채취하여 실험에 공시하였다. 정액 회석액은 난황트리스에 4, 6 그리고 8%의 glycerol과 4 mM의 glucose나 fructose를 각각 첨가하여 2시간 동안 4°C에서 평형을 실시하였고, 동결-융해 후 생존율을 검사하였고, 동결 속도는 액체질소 위 5 cm 5분 혹은 10분간 예비 동결 후 생존율을 검사하였다. 난황트리스에 4, 6 그리고 8% glycerol 단독 첨가 시 동결-융해 정액의 생존율은 각각 50.7±19.0%, 58.6±18.0%, 40.0±10.0%를 나타냈고, 난황트리스에 4, 6 그리고 8% glycerol 및 glucose 첨가시 동결-융해 정액의 생존율은 각각 43.1±14.7%, 38.1±16.5%, 33.3±4.0%를 나타냈으며, 난황트리스에 4, 6 그리고 8% glycerol 및 fructose 첨가시 동결-융해 정액의 생존율은 각각 47.9±21.1%, 61.3±6.2%, 34.3±12.6%로 나타났다. Glycerol 첨가와 단당류 첨가에 의한 생존율은 유의성이 인정되었다($p<0.05$). 진도개 정액 동결시 난황트리스 회석액에 4, 6 그리고 8% glycerol 첨가하여 액체질소 위 5 cm 5분간 예비 동결 그리고 동결-융해 후 생존율은 각각 64.5±15.8%, 51.9±27.6%, 29.7±24.8%의 생존율을 보였고, 액체질소 위 5 cm에 10분간 예비 동결 시, 각각 62.5±20.3%, 64.9±23.6%, 34.5±27.4%를 나타내었다. 동결 속도에 따른 생존율은 유의성이 인정되었다($p<0.05$). 본 연구 결과에서는 난황트리스 회석액에 fructose가 정액 동결에 좋은 효과를 보이는 것으로 사료되고, 이 때 glycerol의 농도는 6%가 가장 좋게 나타났으며, 급속 동결법 시 액체질소 증기위에서 5cm 정도로 10분 이상이 진도개 정액 동결에 유리한 것으로 나타났다.

참고문헌

- Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA and Chaloner KM. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen : Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, types of sugars and the method of dilution. *Cryobiology* 28:43-49.
- Andersen K. 1975. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthyg.* 10:1-4.
- Dobrinski I, Lulai C, Barch AD and Post K. 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47:291-296.
- England GCW. 1993. Cryopreservation of dog semen : A review. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47:243-255.
- Farstad W. 2009. Cryopreservation of canine semen-new challenges. *Reprod. Domest. Anim. Suppl.* 2:336-341.
- Foote RH. 1964. The effect of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog sperm in buffered yolk medium. *American J. Vet. Res.* 25:32-36.
- Gracia MA and Graham EF. 1989. Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effect of sugar and sugar alcohols on postthaw motility. *Theriogenology* 31:1029-1037.
- Hafs HD and Elliot FI. 1955. The effect of methods of adding egg yolk and monosaccharides to the survival of frozen bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 38:811-815.
- Hammerstedt RH, Graham JK and Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Andro.* 11:73-88.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:3-22.
- Iguer-Ouada M and Versteegen JP. 2001. Long term preservation of chilled canine semen : Effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55:671-684
- Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N and Somlev B. 1997. Cryopreservation of caninesemen in pellets and in 5 ml aluminiumtubes using three extenders. *Theriogenology* 48:1343-1349.
- Kim HJ, Oh HJ, Jang K and Kim MK. 2007. Nirth of puppies after intrauterine and intra tubal insemination with frozen-thawed canine semen. *J. Vet. Sci.* 8:75-80.
- Martin JC. 1963. The deep-freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim milk. *Res. Vet. Sci.* 4:315-325.
- Marzur P, Leibo SP, Farrant J, Chu EHY, Hana MG and Smith LH. 1970. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additives on the survival of mammalian cell. In : Wolstenholme GEW O Connor M. (edsO. The frozen cell. CIBA Foundation Symposium. 69-88.
- Matin ICA and Emmens CW. 1961. Effects of time of equilibration and addition of fructose on the survival and fertility of bull spermatozoa deep frozen -79°C. *J. Reprod. Fertil.* 2:404-410.

- Morton DB. 1988. Artificial insemination with frozen semen in the dog : Principles of 'DNA fingerprinting' In: Jones DE and Joshua JO (eds), Reproductive Clinical Problems in the Dog. Bristol : Wright and Sons Ltd. 169-186.
- Nizanski W, Dubiel A, Bielas W and Dejheka GJ. 2001. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the utility of dog semen after thawing. J. Reprod. Fert. Suppl. 57:365-369.
- Rota A, Storm B, Linde-Forsberg C and Rodriguez-Martinez H. 1995. Effect of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. Theriogenology 44:885-900.
- Strom B, Rota A, and Linde-Forsberg C. 1997. *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. Theriogenology 48:247-256.
- 김용준, 한종현, 유일정, 지동범. 2002. Equex STM paste 첨가 희석액이 개 정액의 동결·융해 후 정자활력 및 생존율에 미치는 영향. 한국임상수의학회지 19:80-85.
- 박병권, 박창식, 이성호, 박영석. 1997. 한국 진도견 정액의 성상 및 보존성에 관한 연구. 한국가축번식학회지 21:405-409.
- 유대중, 공일근. 2003. Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류가 동결·융해정자의 침체 손상에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 18(2):91-96.
- 유대중, 정수룡, 오인석, 김홍률, 이계웅, 조성균, 배인휴, 양철주, 공일근. 2002. Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류가 동결·융해정자의 운동성에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 17:137-143.
- 이영락, 이성림, 강태영, 최상용. 2003a. 개 정자의 동결융해 후 생존성 및 침체의 변화. 한국수정란이식학회지 18:51-59.
- 이제협, 박향, 박흠대, 김재명. 2003b. 개 정자의 동결보존에 있어서 Glycerol 농도, 동결 및 융해 속도가 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 18:195-201.
- 정정란, 유재규, 양성열, 여현진, 박종식, 예은하, 노규진, 최상용. 2001. 개정자의 보존방법에 따른 침체 및 생존성의 변화 II. 동결보존에 따른 효과. 한국수정란이식학회지 16:133-138.

(접수: 2010. 8. 24 / 심사: 2010. 8. 25 / 채택: 2010. 9. 3)