大韓獸醫學會誌(1989) 第29卷 第1號
Korean J Vet Res (1989) 29(1) : 57~60

家兎에 있어서 albumin density gradient에 의한 性選擇試圖

金 明 哲
忠南大學校 農科大學

(1988.7.27 접수)

Sex selection attempts in rabbits by albumin density gradients

Myung-cheol Kim
Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chungnam National University

(Received June 27, 1988)

Abstract: This study was carried out to evaluate the possibility of sex preselection by gradients methods using bovine serum albumin in rabbits. Artificial insemination was performed with sperm from the top and bottom layer of rabbit semen separated by bovine serum albumin gradients. Various characteristics of separated sperm, and the conception rate and secondary sex ratio at artificial insemination with separated sperm were compared.

The results obtained were as follows.

1. The sperm from the bottom layer showed significanty high value in motility, percent of normal sperm and progressive motility as compared with control sperm and the sperm and the sperm from the top layer.

2. The conception rate of sperm from the bottom layer was higher than that of the top layer. But secondary sex ratio was not altered by this methods.

Key words: rabbits, bovine serum albumin gradients, sperm separation

緖 論

발생학적으로 포유동물의 性은 卵子에 X 또는 Y精子가 受精됨으로서 결정되어지며, 오늘날까지 연구되어 온 바에 의하면 모든 雄性에서는 대개 같은 數의 X 및 Y精子가 있다고 하였다[1].

人工的으로 受胎前에 性을 결정하기 위하여 X 및 Y염색체를 갖고 있는 정자를 분리하려는 試圖가 이루어져 왔는데, 원심분리[2], 遊泳能力,[3,4,5,6,7] H-Y 抗體處理[8,9,10] 및 pH의 변화[11] 등에 의한 方法들이 보고되어 왔다.

정자의 유영능력의 差異에 근거하는, bovine serum albumin(BSA)를 사용한 Ericsson et al[4]의 방법이 보고된 이후 이 方法을 사용하여 가축의 정자를 분리하려는 다수의 연구가 시도되었다,[3,7,12]

그러나 Dixon et al[3]은 이 방법을 사용하여 돼지에서 性比를 바꾸지 못하였으며, White et al[7]은 면양에서 성비의 변화를 일으켰다고 한다.

본 실험은 토끼에서 BSA에 의한 정자분리로 性比의 변화가 일어날 수 있는가를 알아보기 위하여 실시하였다.

材料 및 方法

供試動物 : 經產의 日本白色兎 30마리를 1개월간 예비사육한 후 임상적으로 건강하다고 認定되는 平均體重 3kg 內外의 수토끼 3마리와 암토끼 20마리를 選定, 2개의 實驗群으로 구분하여 각군에 암토끼 10마리씩을 配定供試하였다.

精液採取 : 精液은 수토끼 3마리에서 각각 1~2回/週에 걸쳐 人工膣法에 의해 採取하고, 즉시 精液檢査를

Table 1. Light microscopic characteristics of sperm from the top and bottom of bovine serum albumin columns

	Top	Bottom	Control
Total sperm count($\times 10^6$)	148.8 ± 8.75	51.2 ± 8.75	200.0**
Motility(%)	17.3 ± 3.87	87.4** ± 7.27	45.9 ± 7.61
Motile sperm count($\times 10^6$)	25.7 ± 5.74	44.7 ±10.93	91.8** ±15.76
Normal sperm (%)	73.9 ± 4.92	95.6** ± 1.59	84.3 ± 6.21
Progressive motility	1.7 ±0.13	3.7** ±0.15	2.5 ± 0.22
Motile sperm recovery(%)	28.0 ± 5.41	48.7** ± 6.78	

**: $p<0.01$, Progressive motility[13]

Table 2. Conception rate and sex ratio following insemination of sperm from the top and bottom of bovine serum albumin columns

BSA column portion	No rabbits treated	Conception rate(%)	Offspring sexed	Males (%)
Top	11	64	43	51.2
Bottom	9	100	47	53.7

하여 生存率이 30% 以上, 精子數가 2×10^8/ml 以上인 精液만을 使用하였다.

BSA에 의한 精子分離: Tyrode液을 사용하여 원정액을 1:1로 稀釋하였고 3000 rpm으로 원심분리한 후, 상청액을 제거하고 tyrode 액을 사용하여 精子數가 ml 當 2×10^7이 되도록 희석하였다. 20여개의 시험관(6×75 mm)을 시험관 받침대에 세워 놓고, 각 시험관에 10% BSA를 1 ml씩 관벽을 따라 주입하였다. Tyrode 액으로 희석한 정자 0.5 ml를 시험관내 BSA층위에 올려 놓고 1시간 동안 실온에서 정치시켰다. 각 시험관의 상층액과 하층액을 구분하여 상층액은 상층액끼리, 하층액은 하층액끼리 모아서 精子의 性狀을 관찰하였다.

精子性狀의 觀察: 總精子數, 運動性精子數 및 運動性을 관찰하였으며, 前進運動性의 관찰은 Glaub 方法[13]에 준하였다. 光學顯微鏡的 形態의 관찰은 hematoxylin-eosin 複染色을 하여 1000倍로 鏡檢하였다.

人工授精: 암토끼에 人工的인 排卵을 誘導하기 위하여 人工授精 4시간 전에 HCG 50 IU를 암토끼의 耳靜脈에 서서히 주사하고, 分離된 정액을 ml當 精子數를 3×10^6으로 하여 암토끼의 膣內에 注入하였다.

토끼 태아의 性比 調査: 授精後 27일에 開腹하여 摘出한 토끼 태아를 解剖하고 生殖器官을 입체현미경으로 觀察하여 性比를 調査하였다.

結 果

BSA를 사용하여 분리된 정자의 관찰: 10% BSA를 사용하여 原精液으로부터 분리된 고활력 정자의 관찰 결과는 Table 1과 같다.

總精子數는 200($\times10^6$)의 정자를 10% BSA로 분리한 결과 상층액 및 하층액은 각각 148.8±8.75($\times10^6$) 및 51.2±8.75($\times10^6$)로서, 하층액의 총정자수가 상층액 보다 적었다($p<0.01$).

精子運動性은 상층액, 하층액 및 대조군은 각각 17.3±3.87%, 87.4±7.27% 및 45.9±7.61%로서, 하층액의 정자운동성이 상층액 및 대조군에 비하여 현저히 높았다($p<0.01$).

運動性이 있는 精子數는 상층액, 하층액 및 대조군은 각각 25.7±5.74($\times10^6$), 44.7±10.93($\times10^6$) 및 91.8±15.76($\times10^6$)으로서, 상층액 및 하층액의 운동성 정자수는 모두 대조군에 비하여 적었으며 ($p<0.01$), 분리실험군중에서는 하층액이 많았다. 正常精子率은 상층액, 하층액 및 대조군은 각각 73.9±4.92%, 95.6±1.59% 및 84.3±6.21%로서 하층액에서 가장 높았다($p<0.01$).

精子의 前進運動性은 상층액, 하층액 및 대조군은 각각 1.7±0.13, 3.7±0.15 및 2.5±0.22로서 하층액에서 현저하게 높았다($p<0.01$).

運動性精子回收率은 상층액 및 하층액에 있어서 각각 28.0±5.41% 및 48.7±6.78%로서, 하층액에서 운동성이 있는 정자의 회수율이 높았다($p<0.01$).

BSA에 의해 分離된 精子의 人工授精時 姙娠率 및 性比調査: 原精液을 10% BSA로 사용하여 분리하여 상층액과 하층액의 정자를 인공수정하였을 때, 姙娠率 및 雄性比는 Table 2와 같다.

姙娠率은 상층액 및 하층액은 각각 64 및 100%로서 하층액의 임신율이 상층액에 비하여 높은 성적을 나타내었다.

雄性比는 상층액 및 하층액은 각각 51.2 및 53.7%로서, 서로 비슷한 경향을 나타내었다.

考 察

Ericsson et al[4]은 사람의 정액에서 BSA gradients로 분리된 정자는 대조군에 비하여 높은 운동성을 나타내며, 85%까지의 Y精子比率을 함유하고 있는 정자의 분

리가 가능하다고 하였으나, Evans et al[5] 및 Ross et al[6]은 동일한 方法으로 고활력정자의 분리는 가능하나 X 및 Y정자의 분리는 어렵다고 하였다. 이들의 결과는 性比에 있어서는 차이가 있으나, column의 하층액의 정자는 원정액보다 운동성 및 전진운동성이 현저히 높다는 사실은 일치되었다.

그후 Faust et al[14], Wall et al[12], 金[15], 金[16], 金等[17]은 BSA를 사용하여 소에서 고활력정자를 분리하였으며, 토끼를 사용한 본실험의 결과는 하층액의 운동성이 87.4%, 전진운동성은 3.7%로서 이들의 결과와 유사한 성적을 나타내었다.

한편 White et al[7]은 면양에서 BSA를 사용하여 정액을 분리 수집한 후 상층액과 하층액을 인공수정에 사용한 결과 出産한 産仔의 雄性比는 각각 36.4% 및 75%를 나타내었다고 보고하였다.

그러나 토끼의 정액을 사용한 본실험에서 BSA를 사용하여 정액을 분리하고, 상층액 및 하층액의 정자를 인공수정한 결과, 임신율은 하층액이 상층액에 비해높은 성적을 나타내었으나 雄性比는 두 개의 群이 類似한 성적을 나타내었다.

따라서 BSA를 사용한 분리방법은 사람에서의 雄性不姙症의 치료 또는 가축에서의 受胎率의 向上을 위한 수단으로서는 응용이 될 수 있으나, BSA를 사용한 분리방법을 性比의 調節을 위한 方法으로 사용하기 위해서는 더욱 많은 연구가 수행되어야 될 것으로 생각된다.

結 論

토끼에서 BSA gradients로 性의 前選擇이 可能한지를 알아보기 위하여 BSA를 사용하여 정액을 분리수집한 결과 상층액과 하층액의 精子의 性狀 및 인공수정시 토끼 태아의 性比를 비교관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 하층액의 정자는 상층액이나 대조군에 비하여 운동성, 정상정자율 및 전진운동성이 현저히 높았다.

2. 하층액의 정자는 상층액에 비하여 임신율에 있어서는 높은 성적을 나타내었으나, 토끼 태아의 性比에 있어서는 변화를 일으키지 못하였다.

參 考 文 獻

1. Glass RH, Ericsson RJ. Getting pregnant in the 1980s: *New advances in infertility treatment and sex preselection.* Berkeley: Univ California Press, 1982;113-128.
2. Schilling E. Experiments in sedimentation and centrifugation of bull spermatozoa and the sex ratio of born calves. *J Repord Fertil* 1966; 11: 469~472.
3. Dixon KE, Songy EA Jr, Thrasher, DM, et al. Effect of bovine serum albumin on the isolation of boar spermatozoa and their fertility. *Theriogenology* 1980; 13:437~444.
4. Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. Nature 1973; 246:421-424.
5. Evans JM, Douglas TA, Renton JP. An attempts to separate fractions rich in human Y sperm. *Nature* 1974; 253:352~354.
6. Ross A, Robinson JA, Evans HJ. Failure to confirm separation of X-and Y-bearing human sperm using BSA gradients. *Nature* 1974; 253: 354~355.
7. White IG, Mendoza G, Maxwell WMC. Preselection of sex of lambs by layering spermatozoa on protein columns. In: Lindsay DR, Pearce DT, ed. *Reproduction in sheep.* Canberra: Australian academy of science, 1984; 299~300.
8. Bennett D, Boyse EA. Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. *Nature* 1973; 246:308~309.
9. White KL, Lindner GW, Anderson GB, et al. Survival after transfer of "Sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theriogenology* 1982; 18:655~662.
10. Zavos PM. Preconception sex determination via intra-vaginal administration of H-Y antisera in rabbits. *Theriogenology* 1983; 20:235~240.
11. Roberts E. Effect of lactic acid and sodium bicarbonate on the sex ratio. *J Hered* 1940; 31: 499.
12. Wall RJ, Jerrard DA, Foote RH. Separation of rabbit and bull spermatozoa on bovine serum albumin gradients. *Biol Reprod* 1980; 22(Supple 1):94 abstr.
13. Glaub JC, Mills RN, Katz, DF. Improved motility recovery of human spermatozoa after freeze preservation via a new approach. *Fert Steril* 1976; 27:1283~1291.
14. Faust AM, Kreider JL, Ericsson RJ, et al. Isolation of progressively motile spermatozoa

from bull semen. *J Anim Sci* 1976; 43:283.

15. 金明哲, 고활력우정자의 선택적 분리에 관한 연구. 대한수의학회지 1984; 24:245~266.
16. 김명철, 소에 있어서 인공수정시의 임신율, 출생시 성비 및 고활력정자의 분리에 관한 연구. 한국가축번식학회지 1986; 10:182~187.
17. 김명철, 조충호, 정순오. Albumin density gradient 방법에 의한 고활력정자 분리시의 정자두부크기의 비교관찰. 대한불임학회지 1984; 11:69~76.