

소에 있어서 人工授精時의 임신율, 出生時 性比 및 高活力精자의 分離에 關한 研究

金 明 哲
忠南大學校 農科大學

Studies on Separation of Highly Motile Sperm, Secondary Sex Ratio and Pregnancy Rate at Artificial Insemination in Bovine

Kim, M. C.

College of Agriculture, Chung Nam National University

Summary

As a fundamental study to increase the fertility and to modify the sex ratio in cattle, highly motile sperm were separated by bovine serum albumin gradients. The pregnancy rates of Korean native cow and Holstein cow, and the sex ratio between AI and natural mating were also investigated.

The results obtained were as follows.

1. First service pregnancy rate of Korean native cow in artificial insemination was higher than that of Holstein.
2. At secondary sex ratio in artificial insemination and natural mating, male ratio in artificial insemination was slightly higher than that in natural mating.
3. The sperm separated from marketed frozen semen using 6%, 10% and 20% bovine serum albumin showed significantly high value in motility, percent of normal sperm and progressive motility as compared with control sperm.

I. 緒 論

Ericsson등(1973)은 사람의 精液中에서 高活力精자를 분리하는 방법을 보고하였는데, 이 방법은 bovine serum albumin(BSA) 위에 정자를 올려 놓으면 죽은 정자나 운동성이 약한 정자는 점조도가 높은 BSA를 통과하지 못하지만 고활력정자는 BSA를 통과하여 아래쪽을 향해 游泳한다는 사실을 이용한 것으로서, 또한 이때에 X염색체를 갖고 있는 정자는 느린 유영을 하며, Y염색체를 갖고 있는 정자는 이것보다 빠른 운동능력을 갖고 있으므로, 이 방법으로 분리하면 90~98%의 운동성을 갖고 있으며, 85%까지의 Y정자비율을 함유하고 있는 정자의 분리가 사람에서 가능하다(Ericsson등, 1973). 그 후 이 방법의 효과는 Evans등(1975), Singer등(1980), Quinlivan등(1982), Weeda 및 Cohen등(1982)에 의해 서도 확인되었다.

한편 이 방법의 변형에 의해 말 및 돼지와 같은 가축의 정자분리를 위한 시도가 이루어졌으나(Goo-

deaux 및 Kreider, 1978; Dixon등, 1980), Dixon등(1980)은 仔豚의 性比를 바꾸지는 못하였다. 또한 Maxwell등(1984)은 BSA로 분리한 정자를 냉동 및 융해한 결과, 면양정자의 생존율이 크게 증가되었다고 보고하였으며, White등(1984)은 BSA로 면양정액을 분리한 후에 상층과 하층의 정자를 각각 냉동하였다가 융해한 후에 인공수정하여 본 결과, 상층의 정자로 인공수정된 면양은 63.3%의 암컷을, 그리고 하층의 정자로 인공수정된 면양은 75%의 숫컷을 분만하였다고 보고하였다.

한편 BSA로 사용하여 Faust등(1976), Wall 등(1980)은 소의 고활력정자를 선택적으로 분리하였으며, Illyes등(1977)은 분리된 고활력정자를 냉동하였으며, Rutherford(1982)는 소에서 고활력정자를 분리한 후 정자를 냉동융해하여 인공수정하였던 결과 受胎率을 증가시켰고, Illyes등(1980)은 분리된 고활력정자를 인공수정에 사용한 결과 숫송아지 비율의 증가를 나타냈다고 보고하였다.

또한 金(1984)은 소에서 BSA 및 Tyrode液을 사

용하여 고환력정자를 분리하였으며, 兪등(1984)은 소에서 bovine serum albumin을 사용하여 고환력정자를 분리한 후에, 분리된 층과 상층에 있는 정자 두부의 크기를 측정하고 결과 분리된 층에는 두부의 크기가 작은 Y정자가 많이 분리되었다고 보고하였다.

그러나 대부분이 原精液으로부터 고환력정자를 분리한 것이며, 이미 냉동된 정액으로부터 bovine serum albumin을 사용하여 고환력정자를 분리한 보고에는 접하기 어려웠다.

따라서 本 연구는 한우 및 홀스타인의 인공수정시의 임신율을 조사하고, 홀스타인의 인공수정시와 자연교미시의 출생시 성비를 비교조사한 후에 市販 冷凍精液으로부터 BSA를 사용하여 고환력정자의 분리를 시도하였던 바, 새로운 知見을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

인공수정시의 임신율조사에 供試된 對象牛는 1984年 9月부터 11月까지 서울근교에서 사육중이던 한우암소 42두 및 홀스타인암소 168두로 總 210두를 調査對象으로 하였다.

인공수정시와 자연교미시의 出生時 性比의 비교조사에 供試된 대상우는 1975년부터 1983년까지 경기도지역의 기업목장에서 사육중이던 홀스타인 암소 1716두를 調査對象으로 하였다.

2. 供試精液

공시정액은 국내에서 시판하고 있는 홀스타인 冷凍精液을 사용하였다.

3. bovine serum albumin(이하 BSA라 칭한다.)

25% BSA(Sigma Co.)를 Tyrode液으로 BSA濃度가 각각 6%, 10% 및 20%가 되도록 稀釋하여 사용하였다.

4. Tyrode液

實驗에 사용한 Tyrode液은 Wade(1977)에 준하였다.

5. 6% BSA를 사용한 분리방법

Tyrode液을 사용하여 냉동정액 0.5ml을 1:1로 희석하였고, 1500rpm으로 2분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 Tyrode액을 1ml 加하여, 정자 pellet를 희석하였다. 시험관(13×125mm)을 시험관 받침대에 수직으로 세워 놓고, 시험관에 6% BSA 6ml를 관벽을 따라 주입하였다.

Tyrode액으로 희석한 정자 1ml을 시험관내 BSA 위에 올려 놓고 1시간 동안 실온에서 정치시켰다. 시험관의 상층액과 하층액의 精子의 性狀들을 관찰하였다.

6. 10% BSA를 사용한 분리방법

6% BSA를 사용한 분리방법과 동일하나, BSA 농도를 10%로 하여 사용하였다.

7. 20% BSA를 사용한 분리방법

6% BSA를 사용한 분리방법으로 분리된 하층의 정액을 1500rpm으로 2분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 Tyrode액을 0.5ml 加하여, 정자 pellet를 희석하였다. 시험관(6×75mm)을 시험관받침대에 수직으로 세워 놓고, 시험관에 20% BSA 0.5ml와 12% BSA 1ml을 층을 이루게 놓고, 그 위에 희석된 정자 0.5ml을 올려 놓고 1시간 동안 실온에서 정치시켰다. 그리고 시험관의 상층액을 제거하고, 30분후에 다시 중간층을 제거하고, 층액의 精子의 性狀들을 관찰하였다.

본 항부의 대조군은 BSA를 사용하지 않은 정액으로 하였다.

8. 精子性狀의 관찰

총정자수, 운동성정자수 및 운동성의 관찰은 Sorensen방법(1979)에 준했으며, 前進運動性의 관찰은 Glaub방법(1976)에 준하였다.

III. 結果

소에서 人工授精時의 임신율 및 인공수정시와 자연교미시의 出生時 性比를 조사한 後에, 시판 냉동정액으로부터 高活力精子의 분리가 가능한 지를 알기 위하여 BSA를 각각 6%, 10% 및 20%로 만든 실험액을 사용하여 정자분리실험을 시도한 바, 분리된 精子의 운동성, 운동성정자수, 正常精子率, 前進運動性 및 回收率등을 관찰한 성적은 다음과 같다.

서울근교에서 사육중인 한우 및 홀스타인에 있어서, 冷凍精液으로 인공수정시의 임신율을 조사한 결과는 Table 1 과 같다. 한우는 人工授精牛 42頭中에서 27두가 임신함으로서 64.3%의 임신율을 나타내었고, 홀스타인은 인공수정우 168두 중에서 79두가 임신함으로서 47.0%의 임신율을 나타내었으며, 總對象牛에서는 210두 중에서 106두가 임신함으로서 50.5%의 임신율을 나타내었다.

경기도지역의 기업목장에서 사육중인 홀스타인에 있어서 인공수정시와 자연교미시에 분만되는 송아지의 sex ratio는 Table 2 와 같다.

자연교미시에는 신생송아지 772두 중에서 숫송아지가 391두, 암송아지는 381두로서 出生時 性比가

1.03 : 1.00이었으며, 인공수정시에는 신생 송아지 944두 중에서 숫송아지가 505두, 암송아지는 439두로써 出生時 性比는 1.15 : 1.00이었다.

6%, 10% 및 20% BSA를 사용하여 시판냉동정액으로부터 분리된 정자의 관찰결과는 Table 3 과 같다.

總精子數는 $24.3 \pm 0.89 (\times 10^6)$ 의 정자를 6%, 10% 및 20% BSA로 분리한 결과 각각 $6.2 \pm 0.72 (\times 10^6)$, $5.7 \pm 0.77 (\times 10^6)$ 및 $1.3 \pm 0.08 (\times 10^6)$ 로서 분리실험군 중에서는 6% BSA에 의해 가장 많은 정자가 분리된 결과를 나타내었다 ($P < 0.01$).

精子運動性은 6%, 10% 및 20% BSA에 의해 분리된 정자와 대조군정자에 있어서 각각 82.3 ± 7.59 ,

Table 1. First service pregnancy rate in cows inseminated with frozen semen

Breed	No. of cows inseminated	No. of pregnant cows	Pregnancy rate (%)
Korean native cow	42	27	64.3
Holstein	168	79	47.0
Total	210	106	50.5

Table 2. Secondary sex ratios of bovine following natural mating and artificial insemination

	No. males (%)	No. females (%)	Male : female ratio
Natural mating	391 (50.6)	381 (49.4)	1.03 : 1.00
Artificial insemination	505 (53.5)	439 (46.5)	1.15 : 1.00

Table 3. Light microscopic characteristics of marketed frozen semen passed through bovine serum albumin (n = 12; mean ± S. D.)

	6% BSA	10% BSA	20% BSA	Control
Total sperm count ($\times 10^6$)	6.2 ± 0.72	5.7 ± 0.77	1.3 ± 0.08	$24.3^{**} \pm 0.89$
Motility (%)	82.3 ± 7.59	85.9 ± 8.32	$92.5^{**} \pm 3.78$	23.7 ± 4.32
Motile sperm count ($\times 10^6$)	5.1 ± 0.15	4.8 ± 0.12	1.2 ± 0.02	$5.8^{**} \pm 0.09$
Normal sperm (%)	93.8 ± 1.57	94.5 ± 1.75	$96.2^* \pm 2.43$	87.5 ± 1.68
Progressive motility	3.5 ± 0.18	3.6 ± 0.19	$3.8^{**} \pm 0.17$	2.1 ± 0.21
Total	$25.5^{**} \pm 3.04$	23.5 ± 3.72	5.3 ± 1.72	
Sperm recovery (%)	$88.0^{**} \pm 5.01$	82.8 ± 7.54	20.6 ± 4.27	

BSA : Bovine serum albumin ** : $P < 0.01$ * : $P < 0.05$ Progressive motility : Glaub(1976)

85.9±8.32, 92.5±3.78 및 23.7±4.32%로서 3 가지 실험군의 정자운동성은 모두 대조군에 비해 현저히 높았으며, 분리실험군중에서는 20%BSA에 의해 분리한 정자가 가장 높은 성적을 나타내었다($P < 0.01$).

運動性精子數는 6%, 10% 및 20%BSA에 의해 분리된 정자와 BSA를 사용하지 않은 對照群精子에 있어서 각각 $5.1 \pm 0.15 (\times 10^6)$, $4.8 \pm 0.12 (\times 10^6)$, $1.2 \pm 0.02 (\times 10^6)$ 및 $5.8 \pm 0.09 (\times 10^6)$ 로서 3 가지 실험군의 운동성정자수는 모두 대조군에 비하여 적었으며($P < 0.01$), 분리실험군 중에서는 6% BSA에서 가장 많았다.

正常精子率은 6%, 10% 및 20% BSA에 의해 분리된 정자와 대조군정자에 있어서 각각 93.8 ± 1.57 , 94.5 ± 1.75 , 96.2 ± 2.43 및 $87.5 \pm 1.68\%$ 로서 대조군에 비해서 실험군에서 모두 높았으며($P < 0.05$), 실험군간에는 큰 차이가 없었다.

前進運動性은 6%, 10% 및 20% BSA에 의해 분리된 정자와 대조군정자에 있어서 각각 3.5 ± 0.18 , 3.6 ± 0.19 , 3.8 ± 0.17 및 2.1 ± 0.21 로서 3 가지 실험군의 전진운동성은 대조군에 비하여 모두 높았으며($P < 0.01$), 실험군간에서는 큰 차이가 없었다.

總精子回收率은 6%, 10% 및 20% BSA에 의해 분리된 정자에 있어서 각각 25.5 ± 3.04 , 23.5 ± 3.72 및 $5.3 \pm 1.72\%$ 로서 6% BSA를 사용한 실험군의 총 정자회수율이 다른 군에 비하여 현저하게 높았다($P < 0.01$).

運動性精子回收率은 6%, 10% 및 20% BSA에 의해 분리된 정자에 있어서 각각 88.0 ± 5.01 , 82.8 ± 7.54 및 20.6 ± 4.27 로서 6% BSA를 사용한 실험군의 운동성정자회수율이 다른 군에 비하여 현저하게 높았다($P < 0.01$).

IV. 考 察

Pelissier(1976)는 젖소에서의 1회의 인공수정에 의한 분만율은 47%였다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 홀스타인은 Pelissier(1976)의 성적과 거의 일치하였으나 한우가 임신율이 64.3%로서 젖소에 비해 높았던 것은(Table 1), 한우는 비육우이므로 착유를 안하며 따라서 유방의 질환이 적으므로 건강상태에 기인한 불임증이 적었기 때문인 것으로 사료된다. Brands(1965)는 소에서의 出生時 性比에서 숫송아지의 비율이 50.6%였다고 보고한 바 있다.

한편 본 실험에서의 숫송아지의 비율은 자연교미 때에는 50.6%로서 Brands(1965)의 보고와 거의 일치하였으나, 인공수정 때의 비율은 53.5%를 나타내므로 인공수정 때에는 자연교미 때에 비해서 숫송아지의 비율이 증가되었다(Table 2).

이러한 원인은 다음과 같이 생각해 볼 수 있다.

자연교미 때에는 受精에 이르는 시간까지에 질, 자궁경, 자궁경관점액, 자궁강, 수란관등의 정자에 대한 장벽들이 있다. 그러나 인공수정 때에는 정액이 자궁강내에 주입되므로 장벽들이 많이 제거된다. 따라서 운동성이 보다 빠른 Y精子가 난자에 먼저 도달할 가능성이 높은 것으로 사료된다.

소의 냉동정액을 6%, 10% 및 20% BSA에 각각 통과시켜 고회력정자의 분리를 시도한 결과 각 처리군의 운동성, 정상정자율, 전진운동성은 BSA를 통과하지 않은 대조군에 비해 현저히 높았으며, (Table 3), 이러한 결과는 Glass와 Ericsson(1982)이 지적한 바와 같이 운동성이 높고 정상적인 정자일수록 점조성이 있는 BSA층을 용이하게 통과한다는 주장과 일치되는 성적인 것으로 사료된다.

한편 金(1984)은 시판냉동정액으로부터는 BSA를 사용하여 고회력정자의 분리가 어렵다고 보고한 바 있다.

본 실험에서 시판냉동정액으로부터 BSA를 사용하여 고회력정자의 분리가 가능하였던 것은 金(1984)은 sperm을 washing時에 3000rpm으로 3분간 원심분리하였으나, 본 실험에서는 1500rpm으로 2분동안 원심분리하였기 때문인 것으로 사료된다.

본 실험에서 6% BSA를 사용했을 때에 정자회수율이 가장 높았으며, 20% BSA에서 정자운동성이 가장 높았던 것은 사람의 原精液을 사용한 Ericsson등(1973)의 결과와 유사한 성적이었다.

한편 金등(1984)은 BSA로 분리된 층에는 작고 운동성이 빠른 Y정자의 비율이 증가되며, BSA의 농도가 높을수록 Y정자의 비율이 높아진다고 하였다.

따라서 field에서 시판냉동정액으로부터 BSA로 고회력정자를 분리한 후에 인공수정에 사용하면 수태율의 향상을 이룰 수 있을 것으로 사료되며, 또한 숫송아지의 비율을 증가시키고자 할 경우에는 10% 또는 20% BSA로 정액을 분리한 후 人工授精에 사용하면 될 것으로 사료된다.

IV. 摘要

소에 있어서 수태율의 증진 및 性比의 변경을 위한 기초실험으로서, 人工授精時의 임신율 및 인공수정시와 자연교미때의 出生時 性比를 조사한 후에 BSA gradients로 市販冷凍精液으로부터의 高活力 精子の 분리를 시도하였던 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 1회의 인공수정에 의한 임신율은 한우가 홀스타인에 비하여 높았다.
2. 자연교미시와 인공수정시의 出生時 性比는 인공수정시에 숫송아지의 비율이 높았다.
3. 시판냉동정액으로부터 6%, 10% 및 20% BSA를 사용하여 고활력정자의 분리가 가능하였으며, 분리된 정자는 대조군에 비하여 운동성, 정상정자율 및 전진운동성이 현저히 높았다.

V. 引用文獻

1. Brands, A.F.A., J. Bannerjee-Schotsman, S.W.J. Van Dielen and A. Van Loen. 1965. Sex ratios at birth in cattle. *Tijdschr. voor Diergeneesk.* 90: 909.
2. Dixon, K.E., E.A. Jr. Songy, D.M. Thrasher and J.L. Kreider. 1980. Effect of bovine serum albumin on the isolation of boar spermatozoa and their fertility. *Theriogenology.* 13: 437.
3. Ericsson, R.J., C.N. Langevin and M. Nishino. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature.* 246: 421.
4. Evans, J.M., T.A. Douglas and J.P. Renton. 1975. Attempts to separate fractions rich in human Y sperm. *Nature.* 253: 352.
5. Faust, A.M., J.L. Kreider, R.J. Ericsson, S.D. Goodeaux and R.A. Godke. 1976. Isolation of progressively motile spermatozoa from bull semen. *J. Anim. Sci.* 43: 283.
6. Glass, R.H. and R.J. Ericsson. 1982. Getting pregnant in the 1980s: New advances in infertility treatment and sex preselection. Univ. California Press, Berkeley. 113.
7. Glaub, J.C., R.N. Mills and D.F. Katz. 1976. Improved motility recovery of human spermatozoa after freeze preservation via a new approach. *Fert. Steril.*, 27: 1244.
8. Goodeaux, S.D. and J.L. Kreider. 1978. Motility and fertility of stallion spermatozoa isolated in bovine serum albumin. *Theriogenology.* 10: 405.
9. Illeyes, D.R., W.R. Warren, A. Baham, J.L. Kreider and R.A. Godke. 1977. Freezing separated bovine spermatozoa. *J. Anim. Sci. Suppl.* 1. 45: 171, abstr.
10. Illyes, D.R., J.L. Kreider, A. Baham and R.A. Godke. 1980. AI of beef heifers with frozen, BSA-separated semen from dairy bulls. *J. Anim. Sci. Suppl.* 1, 51: 38, abstr.
11. Maxwell, W.M.C., G. Mendoza and I.G. White. 1984. Post-thawing survival of motile ram sperm after isolation by layering on protein columns. *Theriogenology.* 21: 601.
12. Pelissier, C.L. 1976. Dairy cattle breeding problems and their consequences. *Theriogenology.* 6: 575.
13. Quintivan, W.L.G., K. Preciado, T.L. Long and H. Sullivan. 1982. Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and Sephadex chromatography. *Fert. Steril.* 37: 104.
14. Rutherford, B. 1982. Gets more bull calves and better conception. *Gelbvieh country.* 9: 31.
15. Singer, R., M. Sagiv, M. Barnet, D. Allalouf, B. Landau, E. Segenreich and C. Servadio. 1980. Properties of spermatozoa from normospermic and oligospermic human semen fractionated on columns of discontinuous gradients of albumin. *Int. J. Fert.* 25: 51.
16. Sorensen, A.M. Jr. 1979. A laboratory manual for animal reproduction. American press, Boston. 53.
17. Wade, A. 1977. Martindale the extra pharmacopoeia. 27th ed. Pharmaceutical press, London. 1452.
18. Wall, R.J., D.A. Jerrard and R.H. Foote. 1980. Separation of rabbit and bull spermatozoa on bovine serum albumin gradients. *Biol. Reprod. Suppl.* 1, 22: 94, abstr.
19. Weeda, A.J. and J. Cohen. 1982. Effects of purification or split ejaculation of semen and stimulation of spermatozoa by caffeine on their motility and fertilizing ability with use of zona-free hamster

- ova. *Fert. Steril.* 37: 817.
20. White, I.G., G. Mendoza and W.M.C. Maxwell. 1984. *Reproduction in sheep*. Australian Academy of Science, Canberra. 299.
21. 金明哲. 1984. 高活力精子的選擇的分離에 관한 研究. *대한수의학회지*. 24 : 245.
22. 김명철, 조충호, 정순오. 1984. Albumin density gradient 방법에 의한 고활력정자 분리시의 정자두부크기의 비교 관찰. *대한불임학회지*. 11 : 69.