

X-精子和 Y-精子的 分離에 관한 研究 Ⅲ. Sephadex Gel 濾過에 의한 牛精子的 分離

李柱榮 · 嚴基鵬 · 高大煥* · 金鍾培 · 鄭吉生

建國大學校 畜産大學

Separation of X- and Y-Bearing Spermatozoa Ⅲ. Separation of bull spermatozoa by Sephadex Gel Filtration

Lee, J. Y., K. B. Oum, D. H. Ko*, J. B. Kim and K. S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

Summary

These experiments were carried out to develop new techniques for In Vitro separation of X-and Y-bearing spermatozoa. The bull semen was applied to the various Gel-Columns filled with swollen Sephadex G-50 Fine and then elutriated with Locke solution (elutriation rate; 1ml/3-4 min., 1ml/1-2min.). Elutriated solution was fractionated into 1ml by automatic Fraction Collector and spermatozoa included in each fraction were subjected to the estimation of viability and recovery rate, and to B-body test.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. When the column size and the elutriation rate were adjusted to 15x1.6cm and 1ml/3-4 min., respectively, the highest sperm concentration was obtained from the 8th to the 12th fraction.
2. As a trend, the viability of spermatozoa was improved by chromatography, and the degree of improvement ranged 5 to 10 percentage.
3. The average recovery rate of spermatozoa applied to column was 73.2 percentage and ranged 52.6 to 81.3 percentage.
4. The lowest rate of B-body bearing spermatozoa following chromatography was obtained when the column size and the elutriation rate were adjusted to 15x0.8 cm and 1ml/1-2min., respectively.

(Key words: Separation, bull X-and Y-bearing sperm, chromatography, B-body test.)

I. 緒 論

Lush(1925)가 沈澱法에 의해, 家兔精자를 사용하여, X-精자와 Y-精자의 分離를 試圖한 이래 後代의 性支配를 위한 努力은 多角的인 側面에서 검되어 왔다. 즉, Diasio 등(1971)과 Ericsson 등(1973)은 X-精자와 Y-精자가 갖는 走地性的 差異를 이용하여, Mudd(1929)와 Nevo 등(1961)은 X-精자와 Y-精자의 電氣的 性質의 差異를 이용하여 兩者의 分離를 試圖하였다. 또 Bhattacharya 등(1976)은 家畜精자에 蛋白質分解酵素인 protease를 첨가하여 精子頭部表面의 蛋白質膜을 融解한 다음, quinacrine

色素를 精子에 透過시켜, Y-精자의 染色體에서만 특이하게 檢出되는 B-小體(B-body)를 檢出하는 새로운 方法을 開發함으로써 家畜精자에 있어서 X-精자와 Y-精자를 識別하는데에 공헌하였다.

한편, Bryant(1980)는 X-精자와 Y-精자는 그 表面의 免疫學的 性質이 다르다는 점을 이용하여 X-精자와 Y-精자의 純度を 각각 면역학적 方法으로 93%까지 높이는데 성공하였고, Kaneko 등(1983)은 不連續 percoll 重層法에 의하여 X-精자와 Y-精자의 純度を 각각 73.1%까지 높이는데에 성공하였으며, Steeno 등(1975)과 Broer 등(1977)은 Sephadex Gel-column을 사용하여 精子分劃을 實施함으로써

本 論文은 한국과학재단의 目的 기초연구비에 의한 것임

*尚志大學 併設專門大學(Sang-Ji Junior College)

X-精자의 純度を 80.0%까지 높이는데 성공하였다. 또 최근 Quinlivan 등(1982)은 같은 방법에 의하여 X-精자의 純度を 74.0%까지 높이는데 성공했다고 報告하였다. 그러나 이들 보고와는 달리 Schilling 등(1978)과 Jaumotte 등(1979)은 Sephadex Gel-column을 사용하여 精자를 濾過해도 X-精자와 Y-精자의 比率에는 有意差가 없었다고 報告하였다.

한편, 국내의 경우에도 試驗管内에서 X-精자와 Y-精자의 分離를 시도한 바 있다. 즉, 李 등(1980)은 電氣泳動法에 의하여, 高 등(1979)은 水素이온濃도의 差를 이용하여 X-精자와 Y-精자의 分離를 시도하였으며, 沈 등(1987)은 離性特異抗原인 組織適合性-Y 抗原(Histocompatibility-Y antigen)을 受精卵에 처리하여 性支配를 試圖한 바가 있다. 그러나 최근에 와서 그 성과가 주목되고 있는 Sephadex Gel 濾過法에 의하여 X-精자와 Y-精자의 分離를 시도한 연구는, 人間精자의 경우는 嚴 등(1987)의 報告가 있으나, 牛精자의 경우에는 報告가 前無한 상태이다. 이에 本 研究에서는 精자分劃에 의한 家畜産仔의 性支配를 실용화 하는데에 필요한 기초지식을 얻기 위하여 Sephadex Gel-column으로 牛精자의 分劃을 실시하여 X-精자와 Y-精자의 分劃을 試圖, 긍정적인 成績을 얻었으므로 그 結果를 報告한다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗期間 및 場所

本 實驗은 1987年 3月부터 同年 10月 사이에 建國大學校 畜産大學 家畜繁殖學 研究室에서 實施하였다.

2. 實驗 材料

1) 供試精液

2세 이상된 홀스타인種의 精巢를 도살 직후에 채취하여 精巢上體 尾部精자를 Tyrode液에 浮遊시켜 供試하였다. 이때 精자濃度 $45 \times 10^6/ml$ 이상, 生存率 60% 이상의 條件을 갖춘 精液만을 선택하여 供試하였다.

2) 稀釋液

X-精자와 Y-精자를 分離하기 위하여 分劃을 실시함에 있어서 精자의 洗滌 및 溶出液으로는 Locke

液(調製使用)을 供試하였다.

3) Sephadex Gel

精자分劃用 Column은 Sephadex G-50 Fine(Pharmacia, Sweden)을 사용하여 제조하였다.

3. 實驗 方法

1) Chromatography의 實施

Sephadex powder를 Locke液에 沈漬하여 실온에서 一晝夜이상 膨潤시킨 다음, Gel의 높이와 지름을 각각 $10 \times 1.6cm$ 와 $15 \times 1.6cm$ 및 $20 \times 1.6cm$ 와 $15 \times 0.8cm$ 로 조정하였다. 이렇게 제조된 column上端에 2~3회 세척한 精자浮遊液 2ml을 각각 첨가한후 Locke液을 사용하여 상이한 속도로 용출시키면서, Fraction Collector(Manhattan Co., Korea)로 1ml씩 분리채취하였다. Chromatography를 위하여 사용한 column의 규격과 column별 溶出速度는 Table 1에 제시한 바와 같았다.

Table 1. The conditions of Column in the Chromatography

Experiments	Column size(cm)	Elutiation rate
I	10×1.6	1 ml/3 - 4 min.
II	15×1.6	1 ml/3 - 4 min.
III	20×1.6	1 ml/3 - 4 min.
IV	15×0.8	1 ml/3 - 4 min.
V	15×1.6	1 ml/1 - 2 min.
VI	15×0.8	1 ml/1 - 2 min.

2) 精자狀態의 檢査

分劃實施 前後의 精자에 대하여 生存率과 運動性 등을 Sorenson(1979)의 方法에 準하여 檢査하였다.

3) B-小體의 檢定

分劃前後의 精자에 대하여 Bhattacharya(1976)의 方法을 기초로 하여 B-小體(B-body)의 有無를 檢査하였다. 즉, 400xg에서 10분간 원심분리를 실시함으로써 2-3회 세척한 정자에게 8~10%의 protease(Type III, Sigma chemical Co., U.S.A)를 添加하여 37°C에서 25~30분간 消化시켰다. 다음, 消化시킨 精자浮遊液과 0.05%의 Quinacrine Mustard(Sigma chemical Co., USA) 溶液을 각각 1:1로 混合하여 30°C에서 25~30분간 染色한 後, 染色된 精자浮遊液을 슬라이드 글라스에 塗抹하여 커버 글라

스로 덮은 뒤 nail polish를 사용하여 封入한 다음, B-小體를 檢索하였다. 이때 oil immersion 을 실시 하였으며 光源은 HP-430이었고 transmission wave length는 530nm이었으며 exiter filter 로는 KP-490 을 사용하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. B-小體의 檢索

Quinacrine Mustard로 處理된 精子를 螢光顯微鏡 하에서 觀察했을 때의 B-小體는 Fig. 1 에서 보는 바와 같았다. 즉, 어두운 顯微鏡視野中에서 精子는

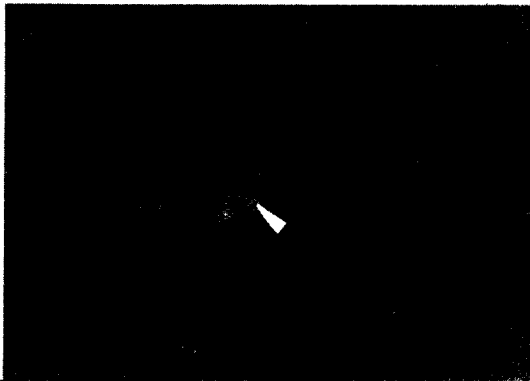


Fig. 1. A typical B-body positive bull spermatozoa. Arrow indicates B-body. (1000x)

全體的으로 螢光을 띄며, 그중 Y-精子는 대개의 경우 精子頭部의 중간부분에서 특히 強하게 螢光을 발산하는 圓形의 小斑點, 즉 B-小體를 나타내었다. 이것은 高등(1979)과 최근 Shyoso Ogawa 등(1987)이 報告한 B-小體와는 동일한 것이었지만 李등(1979)이 보고한 것과는 형태가 다른 것이었다.

2. 實驗Ⅰ의 結果

Sephadex G-50 Gel-column(10×1.6cm)을 사용, 용출속도를 1ml/3-4min.로 分劃했을 때 分劃前後의 B-小體出現率과 精子生存率 그리고 精子回收率은 Table 2 에서 보는 바와 같았다. 즉, 정자는 7번 劃分에서 최초로 관찰되었으며 10~12번 劃分에서 가장 濃厚하였다. B-小體出現率은 分劃前에는 47.7%였으나 分劃後에는 10번 劃分の 경우 26.5%로 가장 낮았으며(X-精子比率 72.5%), 분획이 진행됨에 따라 B-小體出現率은 점차 높아지고 X-精子率은 점차 낮아지는 경향을 보였다.

精子生存率은 分劃前의 64.0%에서 分劃後에는 좋아져서 10번 劃分에서는 77.0%로 가장 높았고 12번 劃分부터는 점차 감소하였다. 精子의 總回收率은 주입된 總精子 516×10^5 개 중 420×10^5 개가 회수됨으로서 81.3%였다.

3. 實驗Ⅱ의 結果

15×1.6cm의 column을 사용하여 分劃했을 때, 分

Table 2. Viability and recovery rate of spermatozoa and percentage of spermatozoa with B-body before and after Chromatography with Sephandex G-50 Gel Column*

	Fraction No.	Percentage of sperm with B-body	Sperm viability (%)	No. of sperm recovered	No. of sperm applied
Before chromatography		47.7 (52.3)**	64.0		516×10^5
After chromatography	8	28.5 (71.5)	75.5	37×10^5	
	10	26.5 (73.5)	77.0	55×10^5	
	12	28.5 (71.5)	76.0	42×10^5	
	14	48.5 (51.5)	62.5	20×10^5	
	16	61.0 (39.0)	52.5	8×10^5	
Total or Mean		38.7 (61.4)	68.7	162×10^5	420×10^5
Recovery rate(%)					81.3

*Column size, 10×1.6cm, Elutriation rate, 1ml/3-4 min.

**Percentage of X-Spermatozoa

Table 3. Viability and recovery rate of spermatozoa and percentage of spermatozoa with B-body before and after Chromatography with Sephadex G-50 Gel Column*

	Fraction No.	Percentage of sperm with B-body	Sperm viability (%)	No. of sperm recovered	No. of sperm applied
Before chromatography		44.7 (55.3)**	77.7		1368×10 ⁵
After chromatography	12	23.0 (77.0)	80.0	38×10 ⁵	
	14	23.7 (76.3)	81.5	266×10 ⁵	
	16	31.0 (69.0)	71.0	220×10 ⁵	
	18	59.8 (40.2)	40.0	46×10 ⁵	
	20	65.8 (34.2)	22.5	6×10 ⁵	
Total or Mean		40.7 (59.3)	59.0	576×10 ⁵	1044×10 ⁵
Recovery rate(%)					76.3

*Column size, 15×1.6cm, Elutriation rate, 1ml/3-4min.

**Percentage of X-Spermatozoa

Table 4. Viability and recovery rate of spermatozoa and percentage of spermatozoa with B-body before and after Chromatography with Sephadex G-50 Gel Column*

	Fraction No.	Percentage of sperm with B-body	Sperm viability (%)	No. of sperm recovered	No. of sperm applied
Before chromatography		44.7 (55.3)**	75.0		456×10 ⁵
After chromatography	14	27.2 (72.8)	80.0	32×10 ⁵	
	16	23.8 (76.2)	78.5	35×10 ⁵	
	18	63.5 (46.5)	59.0	26×10 ⁵	
	20	66.5 (43.5)	41.0	18×10 ⁵	
Total or Mean		45.3 (59.8)	64.6	111×10 ⁵	240×10 ⁵
Recovery rate(%)					52.6

*Column size, 20×1.6cm, Elutriation rate, 1ml/3-4min.

**Percentage of X-Spermatozoa

劃前後의 B-小體出現率과 精子生存率 그리고 精子回收率は Table 3에서 보는 바와 같았다. 즉, 精子는 10번 劃分에서 최초로 관찰되었으며 14~16번 劃分이 가장 濃厚하였다. B-小體出現率は 劃分前의 44.7%에서 劃分後에는 12번 劃分에서 23.0%로 가장 낮아져 X-精子出現率は 77.0%였다. 이 결과는 Steeno 등(1975)이 12cm의 Sephadex column을 이용하여 人間精子를 分離한 성적인 X-精子의 比率 80~90%보다는 다소 낮은 것이었지만, Quinlivan 등(1982)의 74.0%보다는 다소 높은 것이었다.

精子生存率は 劃分前의 77.7%에서 劃分後에는 14번 劃分에서 81.5%로 가장 높았고 이후의 劃分

에서는 점차 낮아졌으나 대체적으로 劃分前보다는 그후에 있어서의 精子生存률이 양호하였다. 이러한 결과는 Broer 등(1977)과 Quinlivan 등(1982)의 결과와 일치하는 것이었다.

한편 Column에 注入된 1363×10⁵의 정자중 1044×10⁵의 정자가 回收됨으로서 精子回收率は 76.3%였다. 이 결과는 Sephadex column을 사용하였을 때의 精子回收률에 관한 한 Schilling 등(1978)의 50~70%, Quinlivan 등(1982)의 35%, 그리고 嚴 등(1987)의 40.8~52.3%보다는 높은 것이었지만 Bryant (1980)의 86.3%보다는 낮은 것이었다.

4. 實驗Ⅲ의 結果

20×1.6cm의 column을 사용했을 때 B-小體出現率과 精子生存率 및 精子回收率は Table 4에서 보는 바와 같았다. 즉, 精子는 13번 劃分에서 최초로 관찰되었으며 14-16번 劃分에서 가장 濃厚하였다. B-小體出現率は 16번 劃分에서 23.8%로서 15×1.6cm column을 사용했을 때의 결과와 같은 수준이었으며, 精子回收率は 52.6%로서 15×1.6cm column을 사용했을 때보다 현저하게 낮았다.

5. 實驗Ⅳ의 結果

15×0.8cm의 column을 사용하여 1 ml/3~4 min.의 용출속도로 分劃한 경우에 있어서의 결과는 Table 5에서 보는 바와 같았다. 즉 6번 劃分에서 정

자가 최초로 관찰되었고 8~10번 劃分에서 가장 濃厚한 정자농도를 보였으며, B-小體出現率과 精子生存率 및 精子回收率は 15×1.6cm의 column을 1 ml/3-4 min.의 용출속도로 分劃했을 때의 결과와 같은 수준이었다.

6. 實驗Ⅴ의 結果

이상 4 종류의 column을 사용하여 分劃을 實施한 結果 X-精子和 Y-精자의 分離成績이 가장 좋은 것은 15×1.6cm의 column이었으므로 이 column을 재차 사용하여 용출속도를 1 ml/1~2 min.으로 조정하였다. 이때의 分劃結果는 Table 6에서 보는 바와 같이 精자의 出現時期는 1 ml/3~4 min의 용출속도

Table 5. Viability and recovery rate of spermatozoa and percentage of spermatozoa with B-body before and after Chromatography with Sephadex G-50 Gel Column*

	Fraction No.	Percentage of sperm with B-body	Sperm viability (%)	No. of sperm recovered	No. of sperm applied
Before chromatography		46.5 (53.5)**	76.0		1325×10 ⁵
After chromatography	6	23.4 (76.6)	78.0	95×10 ⁵	
	8	24.0 (76.0)	80.2	185×10 ⁵	
	10	30.5 (69.5)	73.5	112×10 ⁵	
	12	38.3 (61.7)	62.0	65×10 ⁵	
Total or Mean		29.1 (71.0)	73.3	457×10 ⁵	950×10 ⁵
Recovery rate(%)					71.6

*Column size, 1.5×0.8cm, Elutriation rate, 1ml/3-4 min.

**Percentage of X-Spermatozoa

Table 6. Viability and recovery rate of spermatozoa and percentage of spermatozoa with B-body before and after Chromatography with Sephadex G-50 Gel Column*

	Fraction No.	Percentage of sperm with B-body	Sperm viability (%)	No. of sperm recovered	No. of sperm applied
Before chromatography		45.1 (54.9)	72.5	1	1826×10 ⁵
After chromatography	12	24.0 (76.0)	75.5	150×10 ⁵	
	14	21.6 (78.4)	81.0	315×10 ⁵	
	16	46.3 (53.7)	61.0	152×10 ⁵	
	18	58.3 (51.7)	36.0	88×10 ⁵	
Total or Mean		37.6 (65.0)	63.4	705×10 ⁵	1398×10 ⁵
Recovery rate(%)					76.5

*Column size, 15×1.6cm, Elutriation rate, 1ml/1-2 min.

**Percentage of X-Spermatozoa

Table 7. Viability and recovery rate of spermatozoa and percentage of spermatozoa with B-body before and after Chromatography with Sephadex G-50 Gel Column*

	Fraction No.	Percentage of sperm with B-body	Sperm viability (%)	No. of sperm recovered	No. of sperm applied
Before chromatography		44.3 (55.7)	73.1	123	958×10 ⁵
After chromatography	6	22.5 (77.5)	74.3	123×10 ⁵	
	8	21.5 (78.5)	77.3	152×10 ⁵	
	10	28.0 (71.4)	59.3	62×10 ⁵	
Total or Mean		24.2 (75.8)	70.3	337×10 ⁵	680×10 ⁵
Recovery rate (%)					71.1

*Column size, 15×0.8cm, Elutriation rate, 1 ml/1-2 min.

**Percentage of X-Spermatozoa

때보다 빨라 9번 劃分에서 최초로 확인되었으며 B-小體出現率과 精子生存率은 14번 劃分에서 각각 21.6%와 81.0%로서 가장 좋았다. 이러한 결과는 column의 크기가 같아도 용출속도를 빠르게 하면 X-精子和 Y-精子的 分離가 더욱 잘 된다는 것을 시사하는 것으로 생각된다.

7. 實驗VI의 結果

實驗 5의 結果를 기초로 하여 溶出速度를 1 ml/1~2min.으로 고정하고 column의 직경을 0.8cm로 조정하여 分劃을 實施하였다. 이때의 分劃結果는 Table 7에서 보는 바와 같았다. 즉, 정자는 5번 劃分에서 최초로 관찰되었으며 6~8번 劃分이 가장 濃厚하여 分劃에 필요한 時間을 절약할 수 있었다. B-小體出現率은 分劃前 44.3%에서 分劃後에는 8번 劃分에서 21.5%로 가장 낮았다.

이상의 結果를 종합하여 살펴보면 가장 낮은 B-body 出現率, 즉 가장 높은 X-精子的 出現率은 15×0.8cm의 column을 사용하여 1~2분당 1ml의 속도로 용출하였을 때였다.

IV. 摘 要

本 研究는 Sephadex Gel-column을 사용하여 X-精子和 Y-精자를 分離하는 方法을 開發할 目的으로 實施하였다. 精자의 分劃을 위하여 Sephadex G-50 Fine을 사용하였으며 膨潤된 Sephadex Gel을 상이한 크기의 column에 充塡시킨 다음, 상이한 속도에 의하여 Locke 液으로 溶出し켰다. 용출액은

Fraction collector를 사용하여 1ml씩 分離採取한 다음, B-小體의 檢定등을 실시하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 分劃을 실시한 結果, 劃分別 精자의 出現率은 column의 크기와 溶出速度에 따라 차이가 있었으며 15×1.6cm의 column을 1ml/3~4min.의 溶出速度로 分劃하였을 경우 8~12번 劃分중의 精子濃度가 가장 높았다.

2. 分劃實施 後에 있어서 精子生存率은 처음에는 매우 높고 分劃의 進行과 더불어 점차 떨어지는 傾向을 보였지만, 分劃실시 이전보다는 5~10% 정도 증가하는 傾向을 보였다.

3. Column에 注入된 精자의 回收率은 52.6%~81.3%의 범위로서, 평균 73.2%였다.

4. 分劃實施 後 B-小體의 出現率은 column의 크기와 溶出速度에 따라 차이가 있었으나 15×0.8cm의 column을 사용하여 1ml/1~2min.의 속도로 溶出했을때의 B-小體出現率이 21.5%로서 가장 낮았다.

V. 引用文獻

1. Bhattacharya, B.C. 1958. Sex control in mammals. Z. Tierz. Zucht. Biol., 72:250-254.
2. Bhattacharya, B.C., B.M. Enans. 1979. Semen separation technique monitored with greater accuracy by B-body test. Int. J. Fertil. 24(4): 256-259.
3. Broer, K.H., I. Winkaus, H. Sombrock and R.

- Keiser. 1977. Enrichments of X-spermatozoa and in vitro penetration through cervical mucus. *Androl.*, 9:74-78.
4. Bryant, J. Bernard. 1980. Method and material for increasing the percentage of mammalian offspring of either sex. United States Patent (19). 4,191,749.
 5. Ericsson, R.J., C.N. Langevin and M. Nishino. 1973. Isolation of fractions rich in human Y-sperm. *Nature*, 246:421-424.
 6. Kaneko, S.J., Yanagimachi, T. 1983. Separation of human X-and Y-bearing spermatozoa using Percoll Density Gradient Centrifugation. *Fertil. Steril.*, 40:661-665.
 7. Ogawa Shyoso, Hirohito Yamakawa, Junko Yamanoi, Shiichi Nishida, Tutomu Takashima, Tetsuro Matumoto, Yoshinori Tauchi, Hiroshi Nagashima and Yasuhiko Kanou. 1987. Detection of fluorescent body in spermatozoa of Bull, Boar, Dog, Rabbit, Rat and Mouse. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33(3):140-145.
 8. Quinlivan, 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. *fertil. Steril.* 37:104-107.
 9. Steeno, O., A. Adimoejia and J. Steeno. 1975. Separation of X-and Y-bearing human spermatozoa with the sephadex gel-filtration method. *Androl.*, 7:95-97.
 10. Schilling, E.R., Lafrenz and F. Klobasa. 1978. Failure to separate human X-and Y-chromosome bearing spermatozoa by Sephadex Gel filtration. *Androl.*, 10:215-217.
 11. Sorensen, A.M. Jr. 1979. A laboratory manual for animal reproduction 4th Edition. American press, Boston.
 12. 高大煥, 朴欽大, 鄭吉生. 1979. 家畜에 있어서 X-精子和 Y-精子的分離에 관한研究. 家畜繁殖研究會報 3 : 41-47.
 13. 李用斌, 吳鳳國, 徐國聖, 吳成宗, 任京淳. 1979. 돼지 性調節에 관한研究. 韓畜誌 22 : 324-329.
 14. 嚴基鵬, 鄭吉生, 鄭柄鉉. 1986. Sephadex Gel 濾過에 의한 人間精子的分離. 韓畜誌 28 : 765-770.
 15. 沈昊燮, 高正在, 金鍾培, 朴弘陽, 鄭吉生. 1986. 생쥐受精卵에 대한 H-Y抗體處理가 産仔의 性比에 미치는 影響. 韓畜誌 28(12) : 759-764.