

양에 있어서 Protein Column 및 H-Y 항체의處理에 의한 性比調節에 관한 研究

金 相 根

忠南大學校 農科大學

Studies on the Control of Sex Ratio by Treatment of Protein Column and H-Y Antibody in Ewes

Kim Sang Keun

College of Agriculture, Chungnam National University

Summary

This experiment was carried out to investigate the sex ratio of produced lamb after artificial insemination into the cervix with spermatozoa from the top and bottom portion of ram semen separated by diluting semen a column of protein, and after implantation into the uterus with normal morulae and blastocyst cultured in BMOC-3 and Ham F-10 medium containing H-Y antibody and complement treated with spleen and testis, respectively. All embryos developed to morulae and blastocyst were cultured in medium under gas phase of 5% CO₂ in air at 37°C, 24 hrs. Estrus of ewes induced by a MAP vaginal sponge and 750 IU PMSG during the non-breeding season.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. The ratio of heating, lambing, and prolificacy after artificial insemination into the cervix of ewes induced by a MAP vaginal sponge and 750 IU PMSG during the non-breeding season were 100%, 40% and 2.74 heads, respectively.
2. Involving 44 ewes, spermatozoa from the top of the protein column produced 23.1% male and 76.9% female lambs, while spermatozoa from the bottom of the column produced 81.3% male and 18.8% female offspring, respectively.
3. The sex ratio (male-to-female) of progeny produced after implantation with normal morulae and blastocyst cultured in medium containing H-Y antibody and complement treated with spleen and testis were 21.0%, 79.0% and 17.4%, 82.6%, respectively.

I. 緒 論

家畜에 있어서 後代의 性을 人爲的으로 支配하러는 研究는, 많은 研究者들의 多角의이고도 끊임없는 努力에 힘입어 現在에 있어서의 性支配에 대한 研究는 상당한 水準에 도달하고 있는 實情이다.

家畜에 있어서의 性支配에 대한 研究는 대체로 다음의 3가지로 要約할 수가 있는데, 첫째는 交配前後의 雌畜에 대한 여러가지 刺戟이나 處理 即, 營養, alcohol, pH 및 內分泌의 方法을 통해 원하는 性的 精子로 受精을 試圖하는 方法과, 둘째는 精子

를 精子頭部의 크기나 무게(比重), 電氣的 差異 및 運動速度에 의해 X精子和 Y精자를 分離하고, 分離한 精자를 人工授精에 의해 産仔를 調節하는 方法과, 셋째는 胚의 性을 判別하여 判別한 胚를 recipient에 移植하여 원하는 性的 産仔를 얻는 方法이다 (Stolkowski, 1967; Ax等, 1976; Cole等, 1940; Schilling等, 1967; O, Donnel, 1969; Shettles等, 1976; 毛利, 1985; Loir & Lanneau, 1974; Bhattacharya等, 1962; Mudd & Mudd, 1929; Gledrill等, 1984; Vickers, 1967; Singh & Hare, 1970; Shelton等, 1984; Sato等, 1984). 이것을 살펴보면 家畜의 性比調節에 있어서 X, Y精

자의分離는精子頭部の크기나 무게,電氣的差異 및運動速度등에 의한分離方法이 주로利用되고 있으며,胚의性鑑別은小量의榮養膜細胞의分離 또는切斷胚의性染色體의分析,H-Y抗體와胚를處理한第2抗體의適用에 의한性染色體의分析등이 주로利用되고 있다.

本研究는羊에 있어서의性比를調節하기 위해,protein column에 의해精子를分離한 후人工授精시켜出産한産仔의性比와H-Y抗體와補體로胚를處理한 후培養을 통해桑實胚 및胚盤胞까지正常的으로發生한受精卵을移植하여出産한産仔의性比를調査하기 위해實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 飼養管理

供試動物은外見上健康하다고認定된2~6歲의Suffolk種羊120頭로서,飼養管理는1頭當15%의粗蛋白質을含有한pellet飼料200g과乾草1kg을給與하였으며,물,소금,mineral block은自由給食케하였다.

2. 發情誘起 및 授精

發情의誘起는MAP(Methyl Acetoxy Progesterone, Upjohn Inter., Australia) 60mg을吸着시킨sponge를腔内に9日間插入한 후,sponge除去日에750IU의PMSG를注射하는方法에 의해發情을誘起하였으며,授精은發情誘起羊에腹腔內視鏡을利用하여子宮頸管을 통해人工授精시켰다.

3. 受精卵의 回收 및 移植

多排卵處理를한 후,發情이認定된羊에 대해人工授精시킨지2~4日에腹腔內視鏡을利用하여受精卵을回收하였다.回收한8~16細胞와桑實胚의受精卵을CO₂培養器內(5% CO₂, 95% air, 37°C)에서24~48時間培養하면서桑實胚 및胚盤胞까지正常的으로發達한受精卵을供卵羊과受卵羊과의發情日差가±2日 이내로發情이同期化된個體에腹腔內視鏡을 통해子宮內에移植하였다.

4. Protein column의 處理

Protein column의製作은Fig. 1에서 보는바와같이羊의精子濃度をml當 200×10^6 으로調整하여

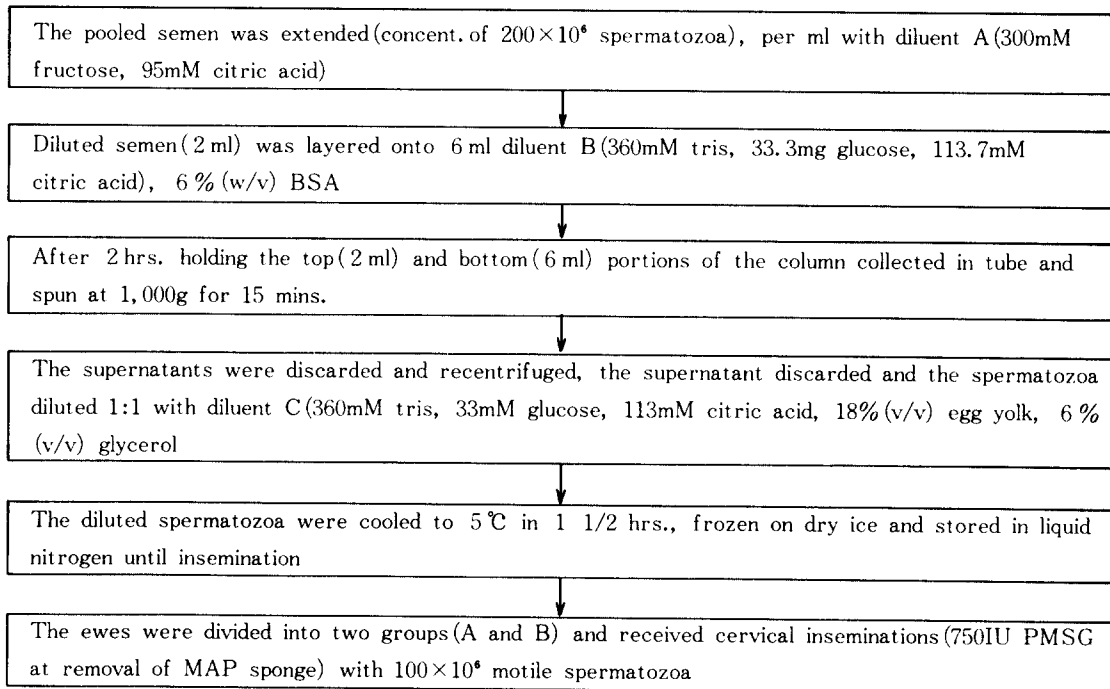


Fig. 1. Experimental procedures for protein column method

稀釋液 A (300mM fructose, 95mM citric acid)와稀釋한 다음, 2ml를 취하여 이것과 稀釋液 B (360mM Tris, 33.3mg glucose, 113.7mM citric acid) 및 6% (v/v) BSA 6ml를 添加하여 2시간 靜置後 column의 上層液(top) 2ml와 下層液(bottom) 6ml를 각각 試驗管에 취하여 1,000r.p.m.으로 15分間 遠沈한 다음 上層液은 버리고 再遠沈하여 다시 上層液은 버리고 下層液의 精子和 1:1比率로 稀釋液 C (360mM Tris, 33mM glucose, 113mM citric acid, 18% (v/v) egg yolk, 6% (v/v) glycerol) 와 稀釋한 후 液體窒素中에 保存하면서, 上層液과 下層液을 각각 發情을 誘起한 羊의 子宮頸管內에 人工授精시켰다.

5. H-Y 抗體의 處理

H-Y 抗體의 製作은 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 羊의 脾臟과 精巢를 homogenization하여 100r.p.m.으로 10分間 遠心分離한 다음 下層液은 버리고 上層液은 4℃에서 30,000r.p.m.으로 20分間 再遠沈한 후 補體와 混合하여 H-Y 抗原을 製作하고 이를 1週 간격으로 7회에 걸쳐 同種羊에 注射하여 免疫시킨 후 8週째에 採血하여 抗血清을 分離하여 H-Y 抗體를 製作하였다. 抗體生成이 認定된 H-Y 抗體와 補體를 混合한 液으로 8~16細胞와 桑實胚의 羊受

精卵을 CO₂培養器內(5%CO₂, 95% air, 37℃)에서 24~48時間 培養하면서 桑實胚 및 胚盤胞까지 正常的으로 發生한 受精卵을, 腹腔內視鏡을 통하여 發情을 誘起한 羊의 子宮內에 移植하였다.

6. 性比 調査

Protein column에 의해 分離한 上層液과 下層液을 各各 人工授精시켰을 때와, H-Y 抗體와 補體로 胚를 處理한 후 桑實胚와 胚盤胞까지 正常的으로 發生한 受精卵을 移植하였을 때 出産한 産仔의 性比를 調査하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 非繁殖季節의 發情誘起

羊은 1年中 特定한 季節 즉 日照時間이 短縮되는 시기에 繁殖活動이 旺盛하게 이루어지는 季節繁殖動物이므로, 非繁殖季節의 發情誘起는 羊의 增殖과 性比調節등과 관련지어 볼 때 대단히 重要하다 하겠다.

非繁殖季節의 發情誘起는 Table 1에서 보는 바와 같이 MAP 60mg을 吸着시킨 sponge를 陰內에 9日間 插入한 후, sponge 除去日에 750IU의 PMSG를

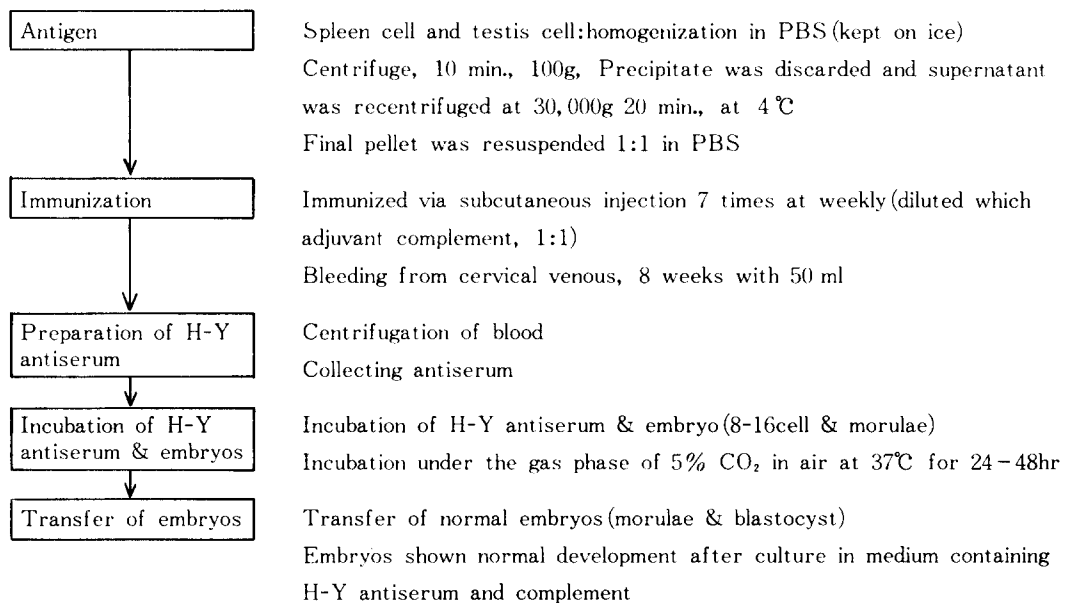


Fig. 2. Schematic representation of sex determination by H-Y antibody treatment

Table 1. Result on fertility in ewes during the non-breeding season

No. of ewes treated*	No. of ewes heated(%)	No. of ewes lambd	Prolificacy**
20	20(100)	8(40)	2.78

*:Treated with MAP sponge for 9 days and 750IU PMSG on sponge removal

** :No. of lambs born/No. of ewes lambd

注射하는 方法에 의해 發情을 誘起하고 腹腔內視鏡을 통해 子宮頸管內에 人工授精시켰을 때 100%의 發情誘起와 40%의 分娩率을 나타냈으며 腹當産仔數는 2.78頭였다. 이러한 結果는 Fukui等(1985)이 報告한 100% 및 30%의 發情誘起率과 分娩率, 그리고 2.33頭의 腹當産仔數와 比較할 때 약간 높은 成績이었다.

대체로 非繁殖季節에 있어서의 羊의 發情誘起 및 發情同期化 方法은 주로 progesterone, PGF₂α, MAP 및 FGA(Flurogesterone Acetate) 등이 利用되고 있지만, 특히 MAP와 PMSG를 併用處理하는 것과 MAP sponge 除去日에 호르몬의 處理가 發情誘起 및 分娩率에 있어 좋은 成績을 나타냈다고 한다(Fukui等, 1985).

2. Protein column 處理에 의한 性比

粘度가 있는 protein이나 BSA(Bovine Serum Albumin)에서는 X, Y精子的 活力과 運動性에 差異가 있다는 점에 着眼하여, 羊의 精子를 protein column으로 處理하여 上層液과 下層液으로 分離한 후, 이를 發情을 誘起한 羊에 腹腔內視鏡을 이용하여 子宮頸管內에 各各 人工授精시켰을 때 出産한 産仔의 性比는 Table 2와 같다.

Protein column으로 處理한 上層液과 下層液을 各各 人工授精한 結果, 61.9%와 69.6%가 分娩하였으며, 이때의 雌雄의 性比는 76.9%와 23.1%, 18.8%와 81.3%로 나타났다.

Table 2. Lambing following insemination of spermatozoa from the the top and bottom of protein columns

Protein column portion	No. of ewes treated	No. of ewes lambd	No. of males(%)	No. of female (%)
Top	21	13(61.9)	3(23.1)	10(76.9)
Bottom	23	16(69.6)	13(81.3)	3(18.8)

이러한 結果는, White等(1984)이 報告한 BSA column에 의한 上層液과 下層液을 人工授精시킨 다음 分娩한 雌雄의 性比 즉 63.3%와 36.4%, 25.0%와 75.0%와 比較할 때 약간 높은 成績이었으나, 上層液에서는 雌性이 下層液에서는 雄性이 높게 나타난 점은 一致하였다.

3. H-Y 抗體 處理에 의한 性比

羊의 脾臟과 精巢를 利用하여 各各 製作한 H-Y 抗體와 補體로 8~16細胞와 桑實胚의 羊受精卵을 24~48時間 培養하면서 桑實胚 및 胚盤胞까지 正常的으로 發生한 受精卵을 腹腔內視鏡을 利用하여 子宮內에 移植하였을 때 出産한 産仔의 性比는 Table 3과 같다. 總回收卵 398個中 212個와 186個卵을 脾臟과 精巢로 製作한 H-Y 抗體와 補體로 各各 培養하였을 때, 91.5%와 81.7%가 正常的으로 發達하였으며, 이중 41.8%와 45.4%가 分娩하였는데, 이때 産仔의 雌雄의 性比는 79.0%와 21.9%, 82.6%와 17.4%로 나타났다.

이러한 結果는, 試驗對象 動物은 다르지만, H-Y 抗體와 補體로 mouse 受精卵과 處理하여 移植하였을 때 出産한 雌雄의 性比는 77%~81%와 19%~23%였다고 報告한 Sato等(1984)과 沈等(1984)의 結果와 比較할 때 類似한 成績이었으나, 47%~90%와 10%~53%였다고 報告한 Shelton等(1984)과 Hiroyki等(1985)의 結果에 比해서는 다소 差異가

Table 3. Sex of progeny resulting from ewe embryos treated with H-Y antibody and complement

Source antibody	No. of embryos examined	No. of embryos developed (%)	Survival after transfer (%)	Sex ratio	
				Female (%)	Male (%)
Anti-spleen	212	194(91.5)	81(41.8)	64(79.0)	17(21.0)
Anti-testis	186	152(81.7)	69(45.4)	57(82.6)	12(17.4)

있었다.

양이나 기타 家畜에 있어서, H-Y 抗體와 補體로 受精卵를 處理하여 移植하였을 때 出産한 産仔의 性比를 調査한 報告는 거의 찾아볼 수 없었으나, 다만 實驗動物인 mouse 나 rat 等에서는 많은 研究報告가 있었다. 現在에는 H-Y 抗體 處理에 의한 높은 性比 調節과 더불어 monoclonal H-Y 抗體의 處理로 상당한 水準의 性比調節이 可能한 것으로 判斷된다.

이러한 事實로 미루어 볼때, 後代의 性을 人爲의 으로 支配하려는 人類의 念願도 곧 解決될 수 있을 것으로 豫見되며 今後 이 分野의 研究가 큰 活氣를 띄게 되어 크게 進展될 것으로 期待된다.

IV. 摘 要

양에 있어서의 性比를 調節하기 위해 羊精子를 protein column에 의해 上層液과 下層液으로 分離한 후 人工授精시켰을 때와, H-Y 抗體와 補體로 胚를 處理한 후, 桑實胚나 胚盤胞까지 正常的으로 發生한 受精卵를 移植하였을 때 出産한 産仔의 性比를 調査하였던 바 그 結果는 다음과 같다.

1. 非繁殖季節에 發情을 誘起하고 腹腔內視鏡을 利用하여 子宮頸管內에 人工授精시켰을 때, 100%의 發情誘起와 40%의 分娩率 및 2.78頭의 腹當産仔數를 나타냈다.

2. 羊精子를 protein column에 의해 分離하였을 때 나타난 上層液과 下層液을 各各 子宮頸管內에 人工授精시킨 후 出産한 産仔의 雌雄의 性比는 76.9%와 23.1%, 18.8%와 81.3%를 나타냈다.

3. 羊의 脾臟과 精巢를 利用하여 各各 製作한 H-Y 抗體와 補體로 8~16細胞 및 桑實胚를 處理하여 正常的으로 發達한 受精卵를 移植하였을 때 出産한 雌雄의 性比는 79.0%와 21.0%, 82.6%와 17.4%를 나타냈다.

V. 引用文獻

1. Ax, R.L., R.J. Cllier and J.R. Lodge. 1976. Effect of dietary caffeine on the testis of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *J. Reprod.*, 47:235-238.
2. Bhattacharya, B.C. 1962. Die Verschiedene Sedimentations geschwindigkeit der X-und Y-spermien und die Frage der willkurlichen Gescelecht-bestimmung. *Z. Wiss. Zool.*, 196:203-250.
3. Cole, L.J., E. Waletzky and M. Shackelford. 1940. A test of sex control by modification of the acid-alkaline balance (Preliminary report). *Ibid.*, 31:501-502.
4. Fukui, Y., M. Kobayashi and H. Ono. 1985. Effects of injection time of pregnant mare's serum gonadotropin and individual rams on fertility of ewes in a trial of out-of-season breeding. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 31:16-24.
5. Gledhill, B.L., D. Pinkel, S. Lake, D.L. Garner and L.A. Johonsen. 1984. Identifying and separating X-and Y-chromosome-bearing mammalian sperm by flow cytometry. *Anim. Reprod. and Artifi. Insemi.*, 2:55 (abstr.)
6. Hiroyuki, A., Y. Takahashi and H. Kanakawa. 1985. Sex determination of ddY mouse morulae by anti-male spleen cell serum. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 31(2):74-77.
7. Loir, M. and M. Lanneau. 1974. Separation of ram spermatide by sedimentation at unit gravity. *Exp. Cell. Res.*, 83:319-327.
8. Mudd, S. and E.B.H. Mudd. 1929. The specificity of mammalian spermatozoa with special reference to electrophoresis as a mean of serological differentiation. *J. Immunol.*, 17:39-52.
9. O'Donnel, J.M. 1969. Intracellular level of sodium and potassium in bull spermatozoa in relation to cell metabolism. *J. Reprod. Fertil.*, 19:207-209.
10. Sato, E., K. Utsumi, M. Yamada and M. Yuhara. 1984. Sex identification of rat embryos by H-Y monoclonal antibody. *J. Mamm. Ova. Res.*, 1(1):107-109.
11. Schilling, E., J. Jazbec und R. Schmid. 1967. Grosse und Geschwindifkeit der

- Samenzellen vom Rind und schaf und deren mögliche Beziehungen zum Geschlecht. Zschr. Tierzucht. Zuchtbiol., 83:331-339.
12. Shelton, J.A. and E.H. Goldberg. 1984. Male-restricted expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. Transplantation, 37: 7-8.
 13. Shettles, L.B. 1976. Separation of X and Y spermatozoa. J. Urol., 116:462-464.
 14. Singh, E.L. and W.C.D. Hare. 1970. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. Theriogenology, 14:421-427.
 15. Stolkowski, M.J. 1967. Influence possible de la nutrition minerale sur la repartition des sexes chez la vache: une enquete retrospective. Comptesrendus, Ser. D., 265: 1059-1062.
 16. Vickers, A.D. 1967. A direct mersurement of the sex-ration mouse blastocyst. J. Reprod. Fertil., 13:375-376.
 17. White, I.G., G. Mendoza and W.M.G. Maxwell. 1984. Preselection of sex of lamb by layering spermatozoa on protein columns. Reprod. in Sheep, 299-300.
 18. 毛利 秀雄. 1985. X-精子とY-精子. 日本哺乳卵研究 2(2): 187-240.
 19. 沈昊燧, 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.