

## 불연속 Percoll 원심분리에 의한 돼지 X-정자와 자성배아에 관한 연구

심대용 · 유성진 · 강한승 · 유정민 · 이채관 · 강성구<sup>†</sup>

인제대학교 생물학과

## Discontinuous Percoll Gradients Enrich X-Bearing Porcine Sperms and Female Embryos

Dae-Yong Shim, Seong-Jin Yoo, Han-Seung Kang, Jeong-Min Yu,

Chae-kwan Lee and Sung-Goo Kang<sup>†</sup>

Department of Biology, College of Natural Sciences, Inje University, Kimhae 621-749. Korea

**요약** : X, Y 정자를 분리하여(sexing technology) 필요한 성을 조절한 배아의 연구가 아직 실용화되지 않고 있다. 본 연구는 이에 대한 기초연구로서 돼지의 X 정자와 Y 정자를 분리하기 위하여 불연속 percoll 농도구배를 제조한 후 상층에 정액을 분주하여 120×g에서 20분간 원심분리 하였다. 분리된 각 층의 정자를 회수( $7 \times 10^6$  sperms/ml)하여 genomic DNA를 추출한 후, PCR 방법을 이용하여 Y 염색체의 성 결정 유전자(TDF)인 SRY(sex determining region of Y chromosome) 유무를 판단하였다. TCM-199 배양액에 성숙시킨 난자와 분리하지 않은 정자를 대조군으로, 분리한 X 정자를 실험군으로 인공수정을 한 후 돼지 체외 수정란을 획득하였다. 체외 생산된 2세포기의 배아의 SRY 유전자를 PCR 증폭하여 성 판별에 사용하였다. 불연속 percoll 원심분리 후 정자의 생존율은 95% 층에서  $94.4\% \pm 5.1\%$  ( $P < 0.01$ )로써 가장 높았다. 체외수정된 결과 분리하지 않은 대조군(47.1%)보다 자성정자가 많다고 판단되는 실험군에서 수정율이 높았다(80%). 불연속 percoll 원심분리 후 SRY 유전자의 PCR을 실시한 결과 30%, 50%, 65% 농도에서 80%, 95% 농도보다 Y 염색체 특이적인 밴드가 많이 증폭되는 것을 확인하여 상층에 Y 염색체를 가지는 음성 정자가 많이 있으며 하층에 X 염색체를 가지는 자성정자가 많이 있는 것으로 확인하였다. 또한 95% 농도 층의 정자를 인공수정된 초기배아의 자성은 66.7%로서 대조군 33.3%보다 높았다. 따라서 불연속 percoll 원심분리 후 80%, 95% 층에서 X 정자가 많이 회수되고, 활동성이 증가하는 것뿐만 아니라 정자의 질도 개선할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

**ABSTRACT** : Predetermination of sex in livestock offspring is in great demand and is of critical importance to providing for the most efficient production of the animal agriculture. Such a sexing technology would also enhance the economy of conventional artificial insemination(AI) and aid the porcine industry. The purpose of this study was to evaluate the efficiency of enriching X-bearing porcine sperm using discontinuous percoll gradients and PCR method. Semen was collected from mature boars of proven fertility center (AI center KimHae). Sperm was loaded on the isotonic discontinuous percoll gradient and then it was centrifuged at 120×g for 20 minutes. After centrifugation, sperm included in each fraction were recovered ( $7 \times 10^6$  sperms/ml) and then sperm genomic DNA was extracted for the PCR. SRY gene was used to evaluate the ratio between X and Y sperm in the separated fractions. *In vitro* fertilization was carried out by adding the unseparated sperm (control) or separated (experimental group) to the matured oocytes in TCM-199. Embryos for sex determination were obtained at 2 cell stage and then was used for SRY gene amplification. After centrifugation of discontinuous percoll gradient, the most motile sperm was obtained at 95% fraction ( $94.4\% \pm 5.1\%$ ,  $P < 0.01$ ). The PCR analysis evaluated that 30%, 50% and 65% fractions were Y sperm rich, whereas 80% and 95% fractions were X sperm rich. PCR analysis with each porcine embryo showed that 33.3% of control and 66.7% of experimental group were determined as female embryos. In conclusion, *in vitro* matured oocytes inseminated with sperms (95% fraction) prepared by percoll gradient centrifugation showed high fertilization rates and female embryos than control sperms.

**Key words** : Sexing technology, Percoll gradients, Porcine, SRY.

## 서론

본 연구는 경상남도생명공학연구(2000)의 지원을 받았다.

<sup>†</sup>교신저자: 경남 김해시 어방동, 인제대학교 생물학과. (우) 621-749, (전) 055-320-3213, (팩) 055-336-7706, e-mail: biosgkan@ijnc.inje.ac.kr

포유동물에서 X, Y 정자를 분리하여(sexing technology) 필요한 성을 조절한 배아의 연구가 아직 실용화되지 않고 있

다. 배아를 얻기 위해서는 분리된 X 또는 Y 정자로 수정시키거나 성 판별된 배아를 이식하는 것이 필요하다. 생체내에서 정자의 분리는 성교의 시점, 체액내의 상태를 변화시켜서 X 정자와 Y 정자 중 어느 한쪽의 활력을 촉진 또는 억제하여 성비를 조절하였으나 성공적인 결과를 얻지 못하였다. 그 후 정액에서 X 정자와 Y 정자를 분리하는 인공 분리법에 대한 연구로 방향이 바뀌었다. X, Y 정자의 분리는 정자의 두부의 크기, 정자의 비중, 막 표면의 하전, 운동성, DNA 함량의 차이 등과 같은 성질을 이용하는 것으로 알부민 원심분리법(Ericsson et al., 1973; Quinlivan et al., 1982), Sephadex Gel-column법(Steen et al., 1975; Quinlivan et al., 1982), 전기영동법(Engelmann et al., 1988), H-Y 항원이용법(Hendriksen et al., 1993), swim-up법(Moohan & Lindsay., 1995; Khatamee et al., 1999), flow cytometry법(Johnson LA., 1995, 2000), percoll 원심분리법 등이 사람 및 동물들을 대상으로 수행되었다. 특히, percoll은 농도 구배 매질로서 체외수정시 사멸정자, 체세포 및 세포단편을 제거하고 활력정자와 세균이 없는 정자를 동시에 얻기 위한 수단으로 이용되고 있다. Percoll 원심분리법의 큰 장점은 콜로이드 성질로써 전체적인 등장액을 만드는 고밀도구배를 만들기 쉽다. 이러한 특성 때문에 원심분리를 실시하면 생존정자는 스스로의 활력밀도에 적합한 농도 구배의 배양액내에 집결된다. 따라서 기계적인 충격이나 삼투압적인 충격을 줄이면서 생존정자 및 X 정자와 Y 정자를 분리할 수 있다. 이 방법을 사람 정자에 적용하였을 경우 운동정자 비율의 향상, 기형정자의 감소, 표면에 음전하가 높은 X 정자가 상층보다 하층에서 많이 회수되었다(Kaneko et al., 1983; Izuka et al., 1987; Wang et al., 1994; Tohyama et al., 1997). X, Y 정자와 수정란의 성감별은 형태적으로 구분하는 것은 불가능하며 따라서 정자의 특이물질, 형광물질과의 결합에 의해 구분할 수 있다(Johnson LA., 2000). Y 염색체의 장완부 말단(Yq12)에 위치하는 F-body에 fluorescence quinacrine mustard 염색에 의한 정자 선택 방법이 보고되었으나(Kaneko et al., 1983; Izuka et al., 1987) X, Y 정자를 효율적으로 판단할 수 없다고 보고하였다(van Kooij et al., 1992). 정자 분리의 판단의 효율을 향상하기 위해 정자 특이적인 probe를 이용한 fluorescence in situ hybridization(FISH)와 flow cytometry을 이용하는 방법이 있으나 성 판정에 소요되는 시간 오래 걸리는 단점이 있다(Wang et al., 1994; Johnson LA., 1995; Lin et al., 1998). 음성 특이 반복서열(McGraw et al., 1988)과 SRY 유전자를 이용한 PCR 방법은 정확도가 높으며 판별하는데 시간이 오래 걸리지 않는 장점이 있다. Y 염색체상의 유전자 좌위에서 정소결정인자(TDF)는 정소의 발생과 분화를 유도하

며 SRY 유전자가 가장 유력한 정소결정인자(TDF)로 생각되고 있다. 생쥐(Koopman et al., 1990), 돼지(Daneau et al., 1996, Pomp et al., 1995), 사람(Sinclair et al., 1990)의 경우 SRY 유전자가 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 불연속 percoll 원심분리 방법을 이용하여 돼지 정자의 운동성 증가와 X 정자를 분리하고 Y 염색체의 성 결정 유전자인 SRY 유전자를 사용하여 PCR 증폭을 실시하고 증폭되는 밴드의 양을 확인하여 X 정자의 분리를 판단하고자 하였다. 이렇게 분리된 X 정자를 체외수정한 후 초기배아의 SRY 유전자 증폭을 통하여 자성배아의 성감별을 하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Percoll 농도 구배에 의한 정자의 분리

실험에 사용된 정자는 경남 A.I 센터(Artificial Insemination Center)에서 사육되는 종모돈을 사용하였다. 정액채취는 오전 7~8시 사이에 수압법으로 채취하여 37°C를 유지하여 1시간 내에 실험실로 운반하였다. Percoll(Sigma, USA)과 0.1M HEPES-buffer, 1.5M NaCl을 1 : 9의 비율로 혼합하여 100% percoll (pH 7.4)로 제조하였다. 희석액(VMD-Mulberry III, pH 7.4)을 사용하여 비율이 각각 30%, 50%, 65%, 80%, 95%가 되도록 불연속 구배를 형성하여 정액 2 ml을 상층분주한 뒤 120 × g에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 분리된 정자를 회수한 후 hematocytometer을 사용하여 각각의 농도 구배에 따른 정자농도, 생존율을 조사하였다.

### 2. 난자 배양과 체외수정

본 실험에 사용된 난소는 경남 김해 도축장에서 획득하였다. 0.9% 생리식염수 (30~35°C)에 100 µg/ml penicilline G와 100 µg/ml streptomycin sulfate를 첨가하여 적출된 난소를 침지하여 실험실로 운반하였다. 적출할 여포의 크기는 중간여포(3~6 mm)를 선택하여 난포를 파열하여 난구 세포들로 둘러싸인 난자와 난구세포 복합체(oocyte-cumulus complexes, OCCs)를 취하였다. 난구세포 복합체를 성숙용 배양액에 옮겨 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48 시간 동안 체외성숙을 유도하였다. 배양액은 TCM-199 기본배양액에 50 µg/ml streptomycin sulfate, 75 µg/ml potassium penicillin G, 0.2 mM Na-pyruvate, 0.32 mM Ca-lactate, 2.2 g/L sodium bicarbonate을 넣어 혼합한 후 0.22 µm filter (USA, Millipore)로 여과하여 사용하였다. 이 배양액을 기본으로 하여 체외성숙 배양액은 0.4% BSA, 10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml hCG, 1 µg/ml estradiol-17β, 10% (v/v) 돼지 난포액(porcine follicular fluid, pFF)을

첨가하여 사용하였으며 수정 배양액은 0.4% BSA를 첨가한 TCM-199을 사용하였다. 사용하기 전 배양접시(Falcon)에서 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 12시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 사용된 돼지의 난포액은 1 ml 주사기를 이용하여 직경 3~6 mm 여포에서 난포액을 흡입하여 12,000 rpm, 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 다시 원심분리하여 0.22  $\mu$ m filter로 여과하여 -20°C에 보관하여 사용하였다. 체외성숙 유도된 난포란은 형태적으로 난구세포가 팽화된 것을 선별하여 0.1% hyaluronidase를 첨가하여 난구세포를 제거 후 제 1극체(first polar body)의 유무를 확인하였다. 불연속 percoll 원심분리 후 95% percoll 층의 정자를 회수하여 0.4% BSA가 첨가된 TCM-199로 희석하여 150 $\times$ g, 2분간 2회 원심분리하여 percoll을 세척하였다. 침전된 정자괴에 1 ml의 0.4% BSA를 첨가한 TCM-199 배양액으로 잘 혼합한 후 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정능력획득을 시킨 정자(1~5 $\times$ 10<sup>6</sup> sperms/ml)로 성숙이 유도된 난자와 수정시켰다. 수정시킨 난자는 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2세포기로 분할되는 것을 관찰하여 수정율을 판단하였다.

### 3. PCR을 이용한 정자, 초기배아의 SRY, SRY/ZFX-Y 및 18S rRNA 유전자 증폭

각 농도구배에 의한 percoll 층에서 분리된 정자의 (7 $\times$ 10<sup>6</sup> sperms/ml) genomic DNA을 추출하여 SRY 유전자(163bp)와 ZFX/Y 유전자(445bp)를 PCR 방법에 의하여 증폭하였다. SRY primer의 염기배열은 forward primer 5'-TGAACGCTTTCAT-TGTGTGGTC-3', reverse primer 5'-GCCAGTAGTCTCTGTGC-CTCCT-3'이며, ZFX/Y primer의 염기배열은 forward primer 5'-ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT-3', reverse primer 5'-GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT-3'이다. PCR의 수행은 정자 genomic DNA에 1 $\times$ PCR buffer(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.1% Triton-X 100), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 각각 20 pmole의 primer, 0.01% BSA, 5 U Taq polymerase를 첨가한 후 시행하였다. 처음 95°C에서 2분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C 2분간 extension을 실시하였고 다음에 94°C에서 1분간, 60°C에서 1분간, 72°C에서 1분간 39회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72°C에서 9분간 extension시킨 후 반응을 종결하였다. DNA의 분석은 3% NuSieve 3:1 agarose gel에서 50V에서 1시간 전기영동을 실시하여 확인하였다. 2세포기 배아의 Acid tyrode's solution을 사용하여 투명대를 제거한 후 10ul의 멸균수가 들어있는 PCR tube에 넣고 액체질소에서 freezing, thawing을 반복한 후 수정란의 DNA을 추출하였다. 추출된 수정란의

genomic DNA을 SRY(Sex determining region of Y chromosome) 유전자 (163bp)와 18S rRNA 유전자(649bp)를 증폭하였다. 18S rRNA primer의 염기배열은 forward primer 5'-CTC-GATGCTCTTAGCTGAGT-3', reverse primer 5'-CTAGTTA-GCATGCCGAGAGT-3'이다. PCR의 수행과 분석은 정자의 유전자 증폭과 같은 방법으로 행하였다. 다만 annealing은 53°C에서 1분간 행하였고 DNA 증폭은 39회 반복하였다.

### 4. 통계처리

각 실험의 통계는 T-test 방법을 사용하였다.

## 결 과

### 1. Percoll 원심분리 후 정자분리, 운동성 및 수정율

불연속 percoll 농도구배 후 상층에 1 $\times$ 10<sup>8</sup>/ml의 정자를 분주하여 120 $\times$ g, 20분 간 원심분리 했을 때 30%에서 95%층까지 모든 층에서 정자가 회수되었고 seminal plasma에서는 정자가 회수되지 않았다. 대조군의 운동성이 평균 76.7%  $\pm$  4.2% 이었으나 불연속 percoll 원심분리 후 정자의 운동성은 percoll 농도가 높을수록 운동성이 증가되는 경향을 보였으며 특히 95% 층에서 94.4%  $\pm$  5.1% (P<0.01)로써 가장 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1). 대조군과 불연속 percoll 원심분리 후 분리된 95%층 정자(실험군)를 각각 36시간 동안 성숙 난자와 체외수정을 유도한 결과 수정율은 대조군에서 47.1%, 실험군에서 80%로 각각 나타났다. 6회 반복 실험에 의한 수정율 (P<0.01)은 유의적인 차이를 나타냈다(Fig. 2).

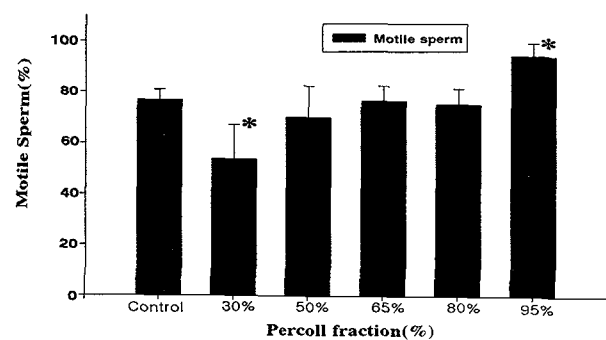
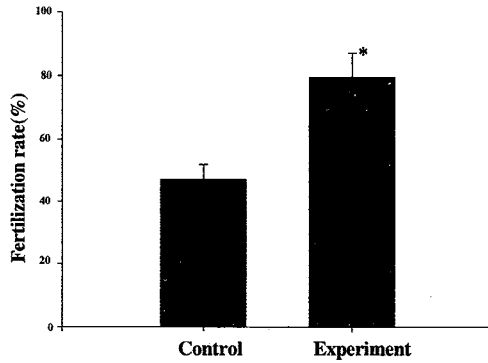
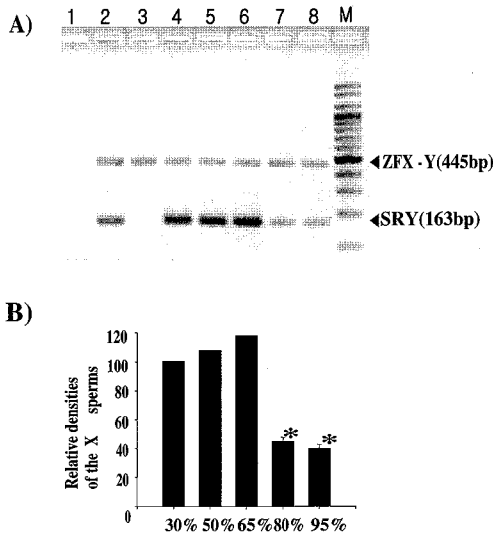


Fig. 1. Percentage of motile sperm in various fractions after density gradient centrifugation in percoll. Control group was not separated with percoll gradient. Motile sperms were 53.7% $\pm$ 13.4% in the top fraction, gradually increasing toward the bottom, reaching the value of 94.4% $\pm$ 5.1% in the lowest fraction. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of motile sperm obtained from 6 repeated experiments (\*, P < 0.01 vs. control).

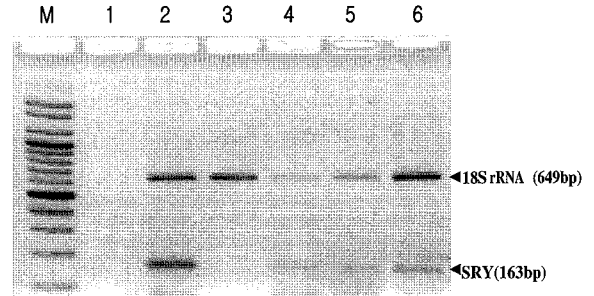


**Fig. 2. Fertilization rate of porcine sperm after density gradient centrifugation in percoll.** Fertilization rate was investigated at 48h post-IVF by 2 cell stage. Separated sperm(Experiment; 80%) had high fertilization rates than not separated (Control; 47.1%). Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of fertilization rates obtained from 6 times of experiments(\*,  $P < 0.05$  vs. control).



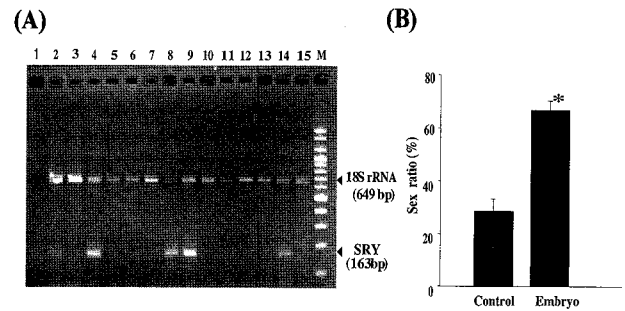
**Fig. 3. Amplification of SRY/ZFX-Y genes with polymerase chain reaction(PCR) using separated sperm genomic DNA(A) and relative ratio of the X-sperm (B).** The upper band corresponds to the positive control ZFX/Y(445bp) PCR product. A significant difference in the density of X-bearing sperm between the top and the bottom fractions. Lane 1, blank; Lane 2, male genomic DNA(positive control); Lane 3, female genomic DNA(negative control); Lane 4, 30% percoll; Lane 5, 50% percoll; Lane 6, 65% percoll; Lane 7, 80% percoll; Lane 8, 95% percoll; Lane M, DNA size marker(100bp ladder). Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of SRY gene amplification obtained from 3 times of experiments(\*,  $P < 0.01$  vs. 30%).

2. Percoll 원심분리 후 Y정자와 초기배아의 유전자 분석  
분리된 정자의 응정정자와 자성정자의 분포를 알아보기



**Fig. 4. PCR amplification of SRY/18S rRNA genes in small amount of pig sperms.** The upper band corresponds to the positive control 18S rRNA(649bp) PCR product. The primary condition of PCR using embryos were defined using sperm genomic DNA as a template. Lane M, DNA size marker(100bp ladder); Lane 1, blank; Lane 2, male genomic DNA(positive control); Lane 3, female genomic DNA (negative control); Lane 4~6, 4~20 sperms DNA.

위해 각 층마다  $7 \times 10^6$  sperms/ml 정자의 genomic DNA를 추출 후 Y 염색체 특이적인 SRY(163bp) 유전자와 암수에 모두 존재하는 ZFX/Y(445bp) 유전자 증폭을 한 결과 각 층에서 밴드가 확인되었다. 특히 30%, 50%, 65%에서 80%, 95%보다 Y 염색체 특이적인 밴드(SRY)가 많이 증폭되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 초기배아 각각에서의 SRY 유전자 증폭 조건을 찾기 위하여 적은 수의 정자를 이용하여 PCR 조건을 실험하였다. 정자 4개에서 30개까지 DNA에 대해서 SRY 유전자와 18S rRNA(649bp) 유전자를 증폭한 결과 정자 4개 이상에서 증폭되었다(Fig. 4). 불연속 percoll 원심분리 후 자성정자가 많다고 판단되는 95%층(실험군)과 분리하지 않은 정자(대조



**Fig. 5. PCR amplification of SRY/18S rRNA genes(A) and sex ratio(B) using embryos.** Unseparated sperms (control) or separated sperms (in 95% fraction) were used for *in vitro* fertilization. Lane 1, blank; Lane 2, male genomic DNA(positive control); Lane 3, female genomic DNA(negative control); male samples (lane 4, 8, 9, 14) and female samples (lane 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15); Lane M, DNA size marker(100bp ladder). Sex ratio represents the ratio of female embryo. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of PCR using embryos obtained from 3 times of experiments(\*,  $P < 0.05$  vs. control).

군)를 인공수정하여 2세포기 초기배아를 PCR 증폭한 결과 SRY 유전자는 음성배아에서 증폭되었다. 대조군에서는 33.3%, 실험군에서는 66.7%가 자성 배아로 판정되었다(Fig. 5).

## 고 찰

일반적으로 수정율은 정자의 수보다는 질이 더 중요하며 정액의 양, 정자의 농도, 운동성, 형태학적 특성 등이 큰 영향을 미친다(Lipshultz, 1982). 양질의 정자를 회수하는데 percoll의 사용이 일반화 되었다. 특히 사람의 정자를 12 단계 불연속 percoll 원심분리에 의해 활동성 정자와 X 정자를 94% 이상 회수하였다는 보고(Iizuka et al., 1987)후 많은 연구자들의 percoll을 이용하여 정자 분리를 시도하였다. 따라서 본 연구에서는 돼지 정자를 불연속 percoll 원심분리법을 사용하여 X 정자와 Y 정자를 분리하고 PCR을 이용하여 초기배아의 성판별 가능성을 실험하고 정자의 질을 개선할 수 있는지의 여부를 확인할 목적으로 실험하였다. 불연속 percoll 원심분리 후 30%에서 95% 층까지 모든 층에서 정자가 회수되었고 농도가 낮은 곳에서는 활동성 정자의 회수가 적었다. Percoll 원심분리 후 95%층에서  $94.4\% \pm 5.1\%$  ( $P < 0.01$ )로써 정자의 운동성이 가장 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1). 이러한 결과는 정액내에 존재하는 정액성분, 사멸정자, 체세포, 세포단편 및 백혈구 등의 이물질이 제거된 결과로 보여진다. 사람의 정자를 percoll 원심분리 후 하층에서 상층보다 더 높고 지속적인 운동성을 가진다는 보고 (Bolton et al., 1986; Kaneko et al., 1986; Watkins et al., 1996; Tohyama et al., 1997)와 유사한 결과를 나타내었다. 그리고 운동성이 향상된 X 정자(95%층)와 체외수정시킨 후 관찰한 수정율에서도 분리하지 않은 정자(대조군)와 비교시 수정율이 증가( $P < 0.05$ )하였다(Fig. 2). 사람의 경우 percoll을 처리하여 운동성 향상과 준비된 정자를 체외수정하였을 경우 성숙율이 높았다는 보고하였다(Grant et al., 1994). 불연속 percoll 원심분리 후 X, Y 정자의 분리를 평가하기 위하여 SRY 유전자를 이용하여 PCR을 실시한 결과 80%, 95%에서 SRY 유전자가 많이 증폭되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이것은 불연속 percoll 원심분리 후 상층에 Y 염색체를 가지는 음성정자가 많이 있으며 하층에 X 염색체를 가지는 자성정자가 많이 있는 것으로 판단된다. 사람의 경우 percoll 원심분리 후 하층에서 X 정자를 많이 회수했다는 보고(Iizuka et al., 1987; Tohyama et al., 1997)와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 돼지 정자의 경우도 불연속 percoll 원심분리 후 하층에서 상층보다 활동성이 증가된 X 정자를 많이 회수했다는 것을 알 수 있었다. 체외수

정된 배아의 성 판별을 위해 PCR 조건을 확립하기 위하여 돼지의 정자를 대상으로 SRY 유전자를 증폭한 결과 초기배아의 2세포기에 해당하는 DNA량인 정자 4개에서 SRY 유전자와 18S rRNA 유전자 증폭이 가능하다는 것을 확인하였다(Fig. 4). 자성정자가 많다고 판단되는 95%층(실험군)과 분리하지 않은 정자(대조군)를 체외수정한 수정란을 대상으로 하여 PCR 증폭을 하여 성 판별을 실시한 결과 실험군에서 66.7%가 자성배아로 판정되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 불연속 percoll 원심분리에 의해 분리된 X 정자를 농가에서 적용하였을 경우 자성의 산자를 많이 생산할 수 있을 것으로 추측할 수 있다. 위와 같은 결과들로 보아 percoll 원심분리법에 의한 돼지 X정자와 Y정자의 분리는 농도가 높을수록 X정자의 순도가 증가하며 운동성이 향상되어 정자의 질을 개선할 수 있다는 사실을 알 수 있다. 따라서 실험방법의 개선에 의해 X-정자의 순도는 더욱 높일 수 있을 것으로 기대된다.

## 인용문헌

- Berger T, Marrs RP, Moyer DL (1985) Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 43: 268-273.
- Bolton VN, Warren RE, Braude PR (1986) Removal of bacterial contaminants from semen for *in vitro* fertilization or artificial insemination by the use of buoyant density centrifugation. *Fertil Steril* 46: 1128-1132.
- Creighton P, Houghton JA (1987) Visualization of pig sperm chromosomes by *in-vitro* penetration of zona-free hamster ova. *J Reprod Fertil* 80: 619-622.
- Daneau I, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW (1996) Porcine SRY gene locus and genital ridge expression. *Biol Reprod* 55: 47-53.
- Engelmann U, Krassnigg F, Schatz H, Schill WB (1988) Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. *Gamete Res* 19: 151-160.
- Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M (1973) Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 246: 421-424.
- Grant SA, Long SE, Parkinson TJ (1994) Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J Reprod Fertil* 100: 477-483.
- Hendriksen PJ, Tieman M, Van der Lende T, Johnson LA (1993) Binding of anti-H-Y monoclonal antibodies to separated X and Y chromosome-bearing porcine and bovine

- sperm. *Mol Reprod Dev* 35: 189-196.
- Hyne RV, Stojanoff A, Clarke GN, Lopata A, Johnston WI (1986) Pregnancy from *in vitro* fertilization of human eggs after separation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation. *Fertil Steril* 45: 93-96.
- Iizuka R, Kaneko S, Aoki R, Kobayashi T (1987) Sexing of human sperm by discontinuous Percoll density gradient and its clinical application. *Hum Reprod* 2: 573-575.
- Johnson LA (1995) Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference. *Reprod Fertil Dev* 7: 893-903.
- Johnson LA (2000) Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci* 2: 60-61: 93-107.
- Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, Iizuka R (1983) Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *Fertil Steril* 40: 661-665.
- Kaneko S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T, Mohri H, Iizuka R (1986) Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn. *Biol Reprod* 35: 1059-1063.
- Khatamee MA, Horn SR, Weseley A, Farooq T, Jaffe SB, Jewelewicz R (1999) A controlled study for gender selection using swim-up separation. *Gynecol Obstet Invest* 48: 7-13.
- Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348: 450-452.
- Lin SP, Lee RK, Tsai YJ, Hwu YM, Lin MH (1998) Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent *in situ* hybridization. *J Assist Reprod Genet* 15: 565-569.
- Lipshultz LI (1982) Beyond the routine semen analysis. *Fertil Steril* 38: 153-155.
- McGraw RA, Jacobson RJ, Akamatsu M (1988) A male-specific repeated DNA sequence in the domestic pig. *Nucleic Acids Res* 16: 10389.
- Moohan JM, Lindsay KS (1995) Spermatozoa selected by a discontinuous Percoll density gradient exhibit better motion characteristics, more hyperactivation, and longer survival than direct swim-up. *Fertil Steril* 64: 160-165.
- Pomp D, Good BA, Geisert RD, Corbin CJ, Conley AJ (1995) Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J Anim Sci* 73: 1408-1415.
- Quinlivan WLG, Preciado K, Long TL, Sullivan H (1982) Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and Sephadex chromatography. *Fertil Steril* 37: 104-107.
- Serafini P, Blank W, Tran C, Mansourian M, Tan T, Batzofin J (1990) Enhanced penetration of zona-free hamster ova by sperm prepared by Nycodenz and Percoll gradient centrifugation. *Fertil Steril* 53: 551-555.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- Steeno O, Adimoelja A, Steeno J (1975) Separation of X- and Y-bearing human spermatozoa with the Sephadex gel-filtration method. *Andrologia* 7: 95-97.
- Tohyama Y, Oshio S, Yotsukura M, Umeda T, Mohri H (1997) Percoll density gradients centrifugation can separate human X-bearing sperm. *J Assist Reprod Genet.* 14: 194s.
- van Kooij RJ, van Oost BA (1992) Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: a comparison. *Fertil Steril* 58: 384-386.
- Wang H-X, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD (1994) Discontinuous Percoll gradients enrich X-bearing human spermatozoa: A study using double-label fluorescence *in-situ* hybridization. *Hum Reprod* 9: 1265-1270.
- Watkins AM, Chan PJ, Patton WC, Jacobson JD, King A (1996) Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous Percoll gradient for sex preselection: computerized analyses. *Arch Androl* 37: 1-5.