

高活力牛精子的選擇的 分離에 관한 研究

金 明 哲

延世大學校 農業開發院

(1984. 10. 4 接受)

Studies on Selective Separation of Highly Motile Bovine Sperm

Myung-cheol Kim

Institute of Agricultural Development, Yonsei University

(Received October 4, 1984)

Abstract: As a fundamental study to increase the reproductive efficiency in cattle, highly motile sperm were separated and collected from raw semen, extended semen and frozen semen by different methods using various concentrations of bovine serum albumin or Tyrode's solution. Various characteristics and light microscopic and electron-microscopic morphology of sperm separated by different methods were compared.

The results obtained were as follows;

1. The sperm separated from raw semen using bovine serum albumin showed esignificantly high value in motility, motile sperm count, percent of normal sperm and progressive motility, as compared with control sperm and revealed the highest sperm recovery rate when separated with 6% bovine serum albumin.

2. The sperm motility, percent of normal sperm and progressive motility of the highly motile sperm frozen after being separated from raw semen with bovine serum albumin, showed significantly high value than those of a control sperm and especially found the highest value when separated with 20% bovine serum albumin.

3. Light-microscopic percent of abnormality was significantly low in the prefrozen and postfrozen highly motile sperm separated with bovine serum albumin, as compared with control sperm.

4. Electron-microscopic finding of the highly motile sperm separated with bovine serum albumin showed low percent of deformity in the dilatation and vesiculation of cell membrane, in dilatation and density loss of acrosome than in those of control sperm.

5. It was impossible to separate the highly motile sperm from frozen semen with bovine serum albumin, but it was possible with Tyrode's solution.

6. Recovery rate of highly motile sperm from raw semen extended semen and frozen semen was the highest when the sperm pellet stood in Tyrode's solution for 80 minutes.

7. The highly motile sperm separated from raw semen, extended semen and frozen semen with Tyrode's solution showed significantly high value in motility, progressive motility and percent of normal sperm, as compared with control sperm.

8. Highly motile sperm, when separated from raw semen, extended semen and frozen semen with Tyrode's solution, showed significantly low percent of microscopic abnormality as compared with control sperm.

緒 論

Leewenhoek와 Hamm이 1677년 動物의 精子를 현미경하에서 처음 관찰한 후 1780년 Spallanzani에 의해 처음으로 과학적인 人工授精이 개에 이루어졌으며, 그 후 많은 研究를 거쳐 1930年代 이후 소련, 덴마크, 영국 및 미국에서 各種 家畜에 대해 人工授精이 활발하게 실용화되었다⁴⁸⁾.

이 時期에 사용되었던 精液은 原精液 또는 稀釋精液이었으며, 희석정액을 사용할 때의 受胎率을 증가시키기 위하여 稀釋液에 卵黃^{42, 51)}, 脫脂粉乳^{2, 40, 57)}, 緩衝劑^{24, 58, 59)}, 抗生物質^{1, 39, 41)}, 효소 등²⁵⁾을 添加하여 희석정액의 質을 개선하려고 노력하였다. 하지만 稀釋精液의 受胎可能期間은 4~5일을 넘기기 힘든 문제점을 갖고 있었다³⁾.

그러나 1949년 Polge 등⁴⁴⁾이 動物의 精자를 -79°C 에서 生存시킬 수 있다고 보고한 이후 1960年代에 冷凍精液의 사용이 실용화되어 장기보존에 관한 문제는 해결되었다³¹⁾.

그럼에도 불구하고 운동성정자중의 20~80%는 冷凍 및 融解時에 운동성을 상실한다⁴⁶⁾. 따라서 Rutherford⁵⁰⁾가 지적한 바와 같이 냉동정액의 融解後 운동성은 약 35%밖에 되지 않아서 受胎率이 나쁘며 著者が 조사한 바에 의하면 國內市販되는 냉동정액의 경우 35%에도 못미치는 경우가 자주 발견되고 있다.

냉동정액의 정자운동성을 증진시켜 受胎能力을 높이는 방법은 다음 두가지를 생각할 수 있다. 첫째, 冷凍精液 製造前에 原精液中에서 高活力精자를 선택적으로 분리한 후 冷凍精液을 제조하여 융해후의 정자운동성을 증진시키는 방법과 둘째, 市販冷凍精液을 융해후 高活力精자를 선택적으로 分離收集하는 방법이다.

HCG, testosterone 및 clomiphene 등의 홀몬제 투여로 精子數는 증가시킬 수 있으나 정자운동성을 개선하기는 어렵다¹⁰⁾.

사람의 정액중에서 畸形 또는 debris를 제거한 고활력정자를 분리하는 방법은 1973년 Ericsson 등²⁰⁾에 의해 최초로 보고되었으며, 이 방법의 효과는 Evans 등²²⁾ Ross 등⁴⁹⁾, Broer 등¹¹⁾, David 등¹⁴⁾, Jeulin 등³⁴⁾, Singer 등⁵⁵⁾, Leslie 및 Quinlivan³⁶⁾, Quinlivan 등⁴⁵⁾, Weeda 및 Cohen 등⁶²⁾에 의해서도 확인되었다.

Ericsson 등²⁰⁾의 방법은 정자의 생리적인 游泳能力

에 근거를 둔 방법으로서 bovine serum albumin 위에 정자를 올려 놓으면 죽은 정자나 운동성이 약한 정자는 침조도가 높은 bovine serum albumin을 통과하지 못하지만 고활력정자는 bovine serum albumin을 통과하여 아래쪽을 향해 游泳한다는 사실을 이용하는 것이다²⁷⁾.

또한 bovine serum albumin 대신 human serum albumin을 사용하여도 사람의 고활력정자를 선택적으로 분리할 수 있다는 사실이 Dmowski 등^{17, 18)}, Binor 등⁸⁾, Beernink 및 Ericsson^{6, 7)}, Sherman 및 Dmowski 등⁵⁴⁾에 의해 보고되었다.

human serum albumin을 사용한 고활력정자의 분리는 精子無力症^{10, 12)}, 男性不妊症^{9, 21, 26)}, 精子減少症 등⁵³⁾의 환자정액과 精漿 allergy를 갖고 있는 부인에서의 임신유도 등⁵³⁾에도 성공적으로 시도되었다.

한편 bovine serum albumin을 사용하여 Faust 등²³⁾과 Wall 등⁶¹⁾은 소의 고활력정자를 선택적으로 분리하였으며, Illyes 등³²⁾은 분리된 고활력정자를 냉동하였으며, Illyes 등³³⁾은 분리된 고활력정자를 냉동한 후 인공수정에 성공하였으며, Rutherford⁵⁰⁾는 소에서 高活力精자를 분리한 후 분리된 정자를 냉동용해하여 인공수정하였던 결과 受胎率을 증가시켰고, White 등⁶³⁾은 형태학적으로 정상적인 精자를 선택적으로 분리하였다고 보고하였다.

또한 Goodeaux 및 Kreider³⁰⁾는 bovine serum albumin을 사용하여 말의 정액으로부터 고활력정자를 선택적으로 분리할 수 있었으며 이렇게 분리된 정액을 人工授精에 사용한 결과 정상분만율이 증가되었다고 보고하였다.

Dixon 등¹⁶⁾은 bovine serum albumin을 사용하여 돼지의 정액으로부터 고활력정자를 분리할 수 있었으나 이렇게 분리된 정액을 사용하여 인공수정을 시켜도 분만율에는 有意差가 없었다고 보고하였다.

Wall 등⁶¹⁾은 bovine serum albumin을 사용하여 토끼의 정액으로부터 고활력정자를 선택적으로 분리할 수 있었으며 이렇게 분리된 정액을 인공수정에 사용한 결과 受胎率이 증가되었다고 보고하였다.

著者は 소의 冷凍精液의 精子運動性を 증진시키기 위하여 bovine serum albumin을 이용하여 高活力精자分離를 시도하였던 바, 液狀精液으로부터 미리 高活力精자를 분리수집하여 冷凍시킴

로써 融解後 정자운동성을 증진시키는 것은 가능하지만, 이미 냉동된 市販凍精液中에서 고효력정자를 분리하는 방법은 어렵다는 사실을 알았다.

우리나라에서는 정액수급현황으로 볼 때 原精液로부터 bovine serum albumin을 사용하여 高活力精자를 분리하는 것은 많은 어려움이 있다고 생각된다.

그러므로 저자는 일반냉동정액으로부터 高活力精자를 분리하는 방법을 연구해야 한다는 필요성을 강력히 느꼈다.

저자는 精자가 universal movement를 나타낸다는 생리적인 현상⁵⁶⁾을 이용하면, 일반냉동정액으로부터도 高活力精자를 선택적으로 분리할 수 있으리라는 생각하에 tyrode液을 사용한 선택적 분리실험을 한 결과 새로운 知見을 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 供試精液 : 공시정액은 人工法에 의해 채취한 原精液과 시판하고 있는 韓牛와 홀스타인의 凍精液을 사용하였다.

原精液은 경기도 고양군 지역에서 사육중인 한우-샤로레 1대雜種 種牝牛 중 臨床的所見과 臨床病理學的인 검사에 의하여 건강하다고 인정된 3세의 種牝牛 5두로부터 人工法으로 채취하여 실험실까지 운반하였으며 운반에 소요된 시간은 약 3시간이었다.

原精液은 原精液, 稀釋精液 및 凍精液의 3가지 형태로 분류하여 공시하였는데, 희석정액 및 냉동정액의 제조방법은 다음과 같다.

희석정액의 제조는 原精液 0.5ml를 卵黃枸橼酸稀釋液⁵¹⁾ 9.5ml로 희석한 후 4시간에 걸쳐 5°C로 될 때까지 서서히 3分間에 0.4°C씩 냉각시켰다.

냉동정액의 제조는 原精液을 1次稀釋液⁴³⁾으로 희석한 후 4시간에 걸쳐 5°C까지 冷却시킨 후 同量의 2次稀釋液⁴³⁾을 4회로 나누어 20분 간격으로 첨가 혼합하여 0.5ml straw에 生存精자數가 약 2.5×10^7 이 되도록 充滿하고, -79°C 에서 10분간 豫備凍結한 다음 液體室素에 담겨서 凍結保存하였다. 냉동정액은 사용직전 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 의 온수에서 15~20초 동안 溶해시켜 사용하였다.

2. bovine serum albumin(이하 BSA라 칭한다) : 25% BSA(Sigma CO)를 tyrode液으로 BSA濃도가 각각 6%, 10% 및 20%가 되도록 稀釋하여 사용하였다.

3. Tyrode液 : 이 實驗에 사용한 tyrode液은 Wade⁶⁰⁾에 준했으며 그 처방은 다음과 같다.

즉 증류수 1,000ml당 NaCl 8g, KCl 0.2g, MgCl₂

6H₂O, 0.1g, NaH₂PO₄ 0.05g, Glucose 1g, NaHCO₃ 1g 및 CaCl₂ 0.2g을 넣어 pH 7.4로 조절하였다.

4. bovine serum albumin에 의한 精자分離

1) 6% bovine serum albumin을 사용한 Faust방법(Fig. 1) : tyrode液을 사용하여 원정액 1.5ml를 1:1로 희석하였고, 3,000rpm으로 3분간 원심분리한 후, 상청액을 제거하고 tyrode液을 사용하여 精자數가 ml當 100×10^6 이 되도록 희석하였다. 4개의 시험관(13×125mm)을 시험관 받침대에 수직으로 세워 놓고, 각 시험관에 6% bovine serum albumin을 6ml씩 관벽을 따라서 주입하였다. tyrode液으로 희석한 정자(精자數 $100 \times 10^6/\text{ml}$) 2ml를 시험관내 bovine serum albumin層위에 조심스럽게 주입하여 bovine serum albumin層과 혼합되지 않게 한 후 한시간동안 실온에서 정치시켰다.

각 시험관의 상층액은 상층액끼리, 하층액은 하층액끼리 모아서 精자의 性狀들을 관찰하였다.

2) 10% bovine serum albumin을 사용한 Ericsson 방법 : tyrode液을 사용하여 原精液 1.5ml를 1:1로 稀釋하였고 3,000rpm으로 3分間 원심분리한 후, 상청액을 제거하고 tyrode液을 사용하여 精자數가 ml當 20×10^6 이 되도록 희석하였다. 80개의 시험관(6×75mm)을 시험관 받침대에 수직으로 세워놓고, 각 시험관에 10% bovine serum albumin을 1ml씩 관벽을 따라 주입하였다. tyrode液으로 희석한 정자 0.5ml(精자數 10×10^6)를 시험관내 bovine serum albumin層위에 조심스럽게 注入하여 bovine serum albumin層과 混合되지 않게 한후 한시간 동안 실온에서 정치시켰다. 각 시험관의 상층액은 제거하고, 하층액은 하층액끼리 모아서 精자의 性상을 관찰하였다.

3) 20% bovine serum albumin을 사용한 Ericsson 방법(Fig. 2). : tyrode液을 사용하여 原精液 1.5ml를 1:1로 稀釋하였고, 3,000rpm으로 3分間 遠心分離한 후, 상청액을 제거하고 tyrode液을 사용하여 精자數가 ml當 80×10^6 이 되도록 稀釋하였다. 20개의 시험관(6×75mm)을 시험관 받침대에 수직으로 세워놓고, 각 시험관에 6% bovine serum albumin을 1ml씩 관벽을 따라 주입하였다. tyrode液으로 희석한 精자 0.5ml(精자數 40×10^6)를 시험관내 bovine serum albumin層위에 조심스럽게 주입하여 bovine serum albumin層과 혼합되지 않게 한 후 한시간 동안 室溫에서 정치시켰다. 각 시험관의 상층액을 제거하고, 각 시험관의 하층액을 모아서 3,000rpm으로 3分間 遠心分離한 후 상청액을 제거하고 tyrode液을 사용하여 精자數가 ml當 60×10^6 이 되도록 稀釋하였다. 각 시험관에 20% bov-

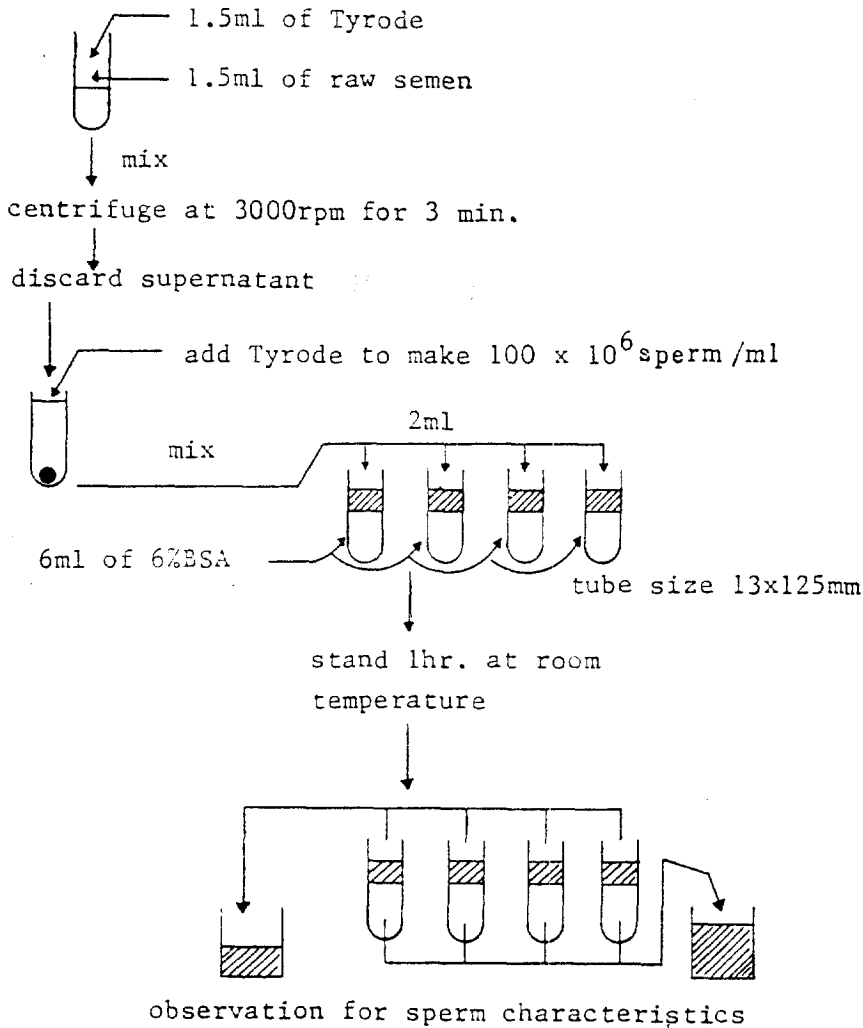


Fig. 1. Faust's method using 6% bovine serum albumin.

ine serum albumin을 0.5ml씩 관벽을 따라 주입하였고, 그위에 12% bovine serum albumin을 1ml씩 관벽을 따라 서서히 주입하였다. 그리고 희석된 정자 0.5 ml씩을 시험관내 bovine serum albumin층위에 조심스럽게 주입한 후 한시간 동안 室温에서 정치시켰다. 각 시험관의 상층액을 제거하고, 각 시험관을 다시 30 분동안 室温에서 정치시킨 후 각 시험관의 상층액을 제거하고, 하층액은 하층액끼리 모아서 精자의 性狀들을 관찰하였다.

본 항목의 대조군은 bovine serum albumin을 사용하지 않은 정액으로 하였다.

5. Tyrode液에서의 정자정치시간에 따른 精자의 性狀(Fig. 3): 原精液, 稀釋精液 및 冷凍精液을 각각

tyrode液을 사용하여 1:1로 稀釋하고, 3,000rpm으로 3分間 원심 분리한 후 상층액은 버리고 시험관을 45° 角度로 기울여 시험관에 tyrode液을 2ml씩 서서히 주입시켰다. 室温에서 20, 40, 60, 80, 100 및 120분간 각각 정치한 다음 정자의 회수율, 운동성 및 전진운동성을 정치시간별로 관찰하였다.

6. Tyrode液을 사용한 精子分離(Fig. 3): 실험방법은 예비실험인 실험방법 2와 같으나 실험 2에서 정치시간이 80분일 때 運動性있는 精자의 回收率이 가장 높았으므로 본 실험에서는 80분간 정치한 다음 상층의 浮游液 1.5ml를 pasteur 피펫으로 조심스럽게 회수하였으며, 이를 tyrode層이라고 칭하고, 각 시험관에 남아 있는 부분을 하층이라고 칭하여 精자의 性상들

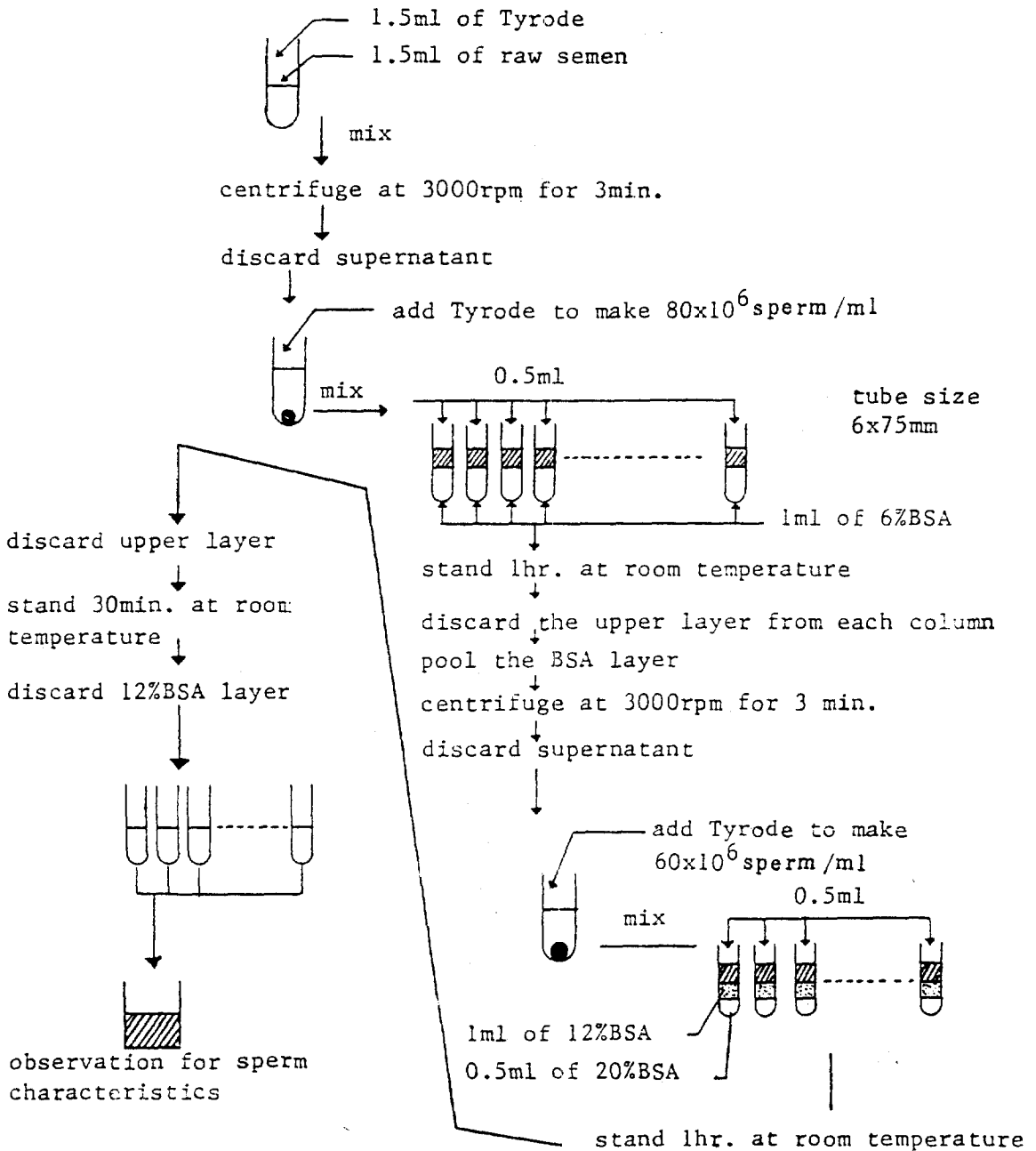


Fig. 2. Ericsson's method using 20% bovine serum albumin.

을 각각 관찰하였다.

본 항목에서의 대조군은 tyrode液을 사용하지 않은 정액으로 하였다.

7. bovine serum albumin을 사용하여 分離된 精子의 冷凍實驗: bovine serum albumin에 의해 分離된 각 실험군을 상술한 방법으로 冷凍 및 融解하였으며,

冷凍前과 融解後의 精子性狀을 대조군과 비교 관찰하였다.

1) 精子性狀의 觀察: 總精子數, 運動性 精子數, 運動性的 觀察는 sorensen方法⁵⁹⁾에 준했으며, 前進運動性的 觀察는 glaub方法²⁹⁾에 준하였다.

2) 精子形態의 觀察: 光學顯微鏡的 形態의 觀察는

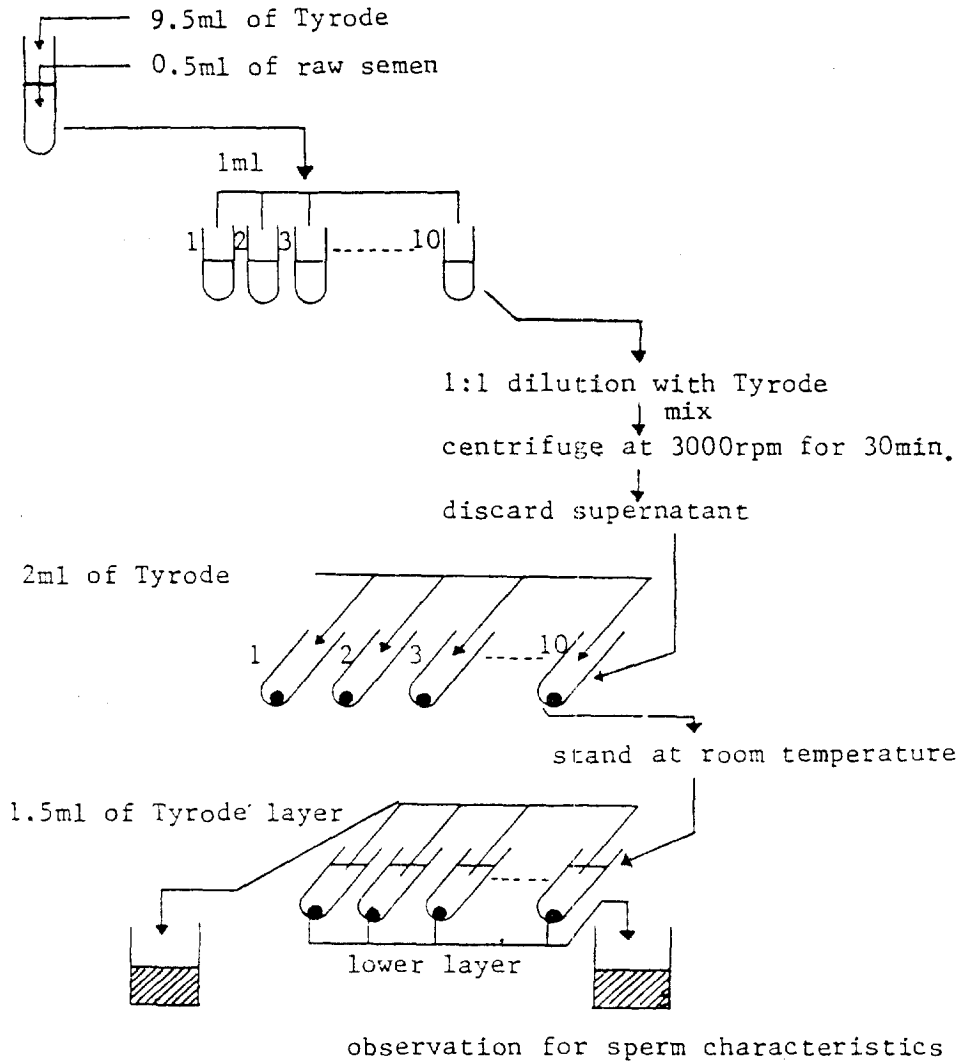


Fig. 3. Selective separation of highly motile sperm with tyrode's solution.

hematoxylin-eosin 複染色⁵²⁾을 하여 1,000倍로 鏡檢하였으려, 正常, 矮小頭部, 巨大頭部, 頭部缺損, 不定形, 重複尾部, 尾部畸形, 未成熟精子로 분류하였는데 분류기준은 다음과 같다.

矮小頭部: 두부의 最大縱徑이 4 μ , 最大橫徑이 2 μ 이하인 것(Fig. 5).

巨大頭部: 두부의 最大縱徑이 12 μ , 最大橫徑이 6 μ 이상인 것(Fig. 6).

頭部缺損: 두부를 갖고 있지 않은 것(Fig. 7).

不定形: 두부의 형태가 비정상적인 모양인 것(Fig.

8).

重複尾部: 尾部가 2개 있는 것(Fig. 9).

尾部畸形: 尾部가 감기거나 절단되거나 심하게 꺾인

것(Fig. 10).

未成熟精子: 原形質滴이 있는 것(Fig. 11).

電子顯微鏡의 형태의 관찰에서 시료의 처리는 Luft³⁸⁾에 준했으며, 채취한 시료를 3% glutaraldehyde로 前固定한 다음 phosphate buffer (pH 7.4)로 두번 세척한 후 2,000rpm으로 遠心分離하여 상층액은 버리고 沈澱된 시료를 2% agar로 포매한 후 1% osmium tetroxide로 4°C에서 2時間 후 固定하였으며, ethanol과 propylene oxide로 脫水하고 epon 溶液에 포매한 다음 60°C에서 3日間 incubation하였다.

超薄切片은 500Å으로 切片을 만든 후 uranyl acetate와 lead citrate로 複染色⁴⁷⁾을 하여 투과전자현미경(H-500, Hitachi)으로 細胞膜의 擴張 및 空胞形成, acro-

some의 擴張 및 density loss를 관찰하였다.

8. 統計處理: 두 실험군간의 有意性檢定은 T-test를 하였으며, 셋이상의 실험군간의 有意성檢정은 F-test를 실시하였다.

結 果

精液中에서 高活力精자를 선택적으로 분리하기 위하여 6%, 10% 및 20% 濃度の bovine serum albumin과 tyrode液을 각각 사용하였으며, 분리된 分劃에 대하여 각각 精子運動性, 運動性精子數, 正常精子率, 前進運動性, 回收率 및 形態學의 特性 등을 比較觀察한 성적은 다음과 같다.

1. bovine serum albumin을 사용한 精子分劃分離

1) bovine serum albumin을 사용하여 分離된 精子의 觀察

冷凍精液: 6% bovine serum albumin을 사용하여 냉동정액으로부터 分離된 精子의 觀察結果는 Table 1과 같다. 分離된 精자와 對照群精자의 운동성은 각각 17.8 ± 4.29 및 $22.5 \pm 4.72\%$ 로서 분리된 정자의 운동성이 대조군에 비하여 낮았으며, 총 정자수와 운동성정자수에 있어서도 分離된 精자가 對照群精자에 비하여 낮았다. 분리된 정자와 대조군정자의 正常精子率은 각각 9.46 ± 1.43 및 $88.6 \pm 2.17\%$ 이었다. 따라서 bovine

Table 1. Light microscopic characteristics of marketed frozen semen passed through 6% bovine serum albumin

(n=10; mean \pm S. D.)

		6% BSA	Control
Total sperm count ($\times 10^6$)		5.1 ± 1.77	24.5 ± 0.97
Motility (%)		17.8 ± 4.29	22.5 ± 4.72
Motile sperm count ($\times 10^6$)		0.9 ± 0.44	5.4 ± 1.06
Normal sperm (%)		94.6 ± 1.43	88.6 ± 2.17
Progressive motility		2.1 ± 0.31	1.9 ± 0.33
Sperm recovery (%)	Total	21.2 ± 7.26	
	Motile	16.9 ± 6.27	

BSA: Bovine serum albumin

Progressive motility: Glaub(1976)

Table 2. Light microscopic characteristics of raw bovine semen passed through bovine serum albumin (n=10; mean \pm S. D.)

		6% BSA	10% BSA	20% BSA	Control
Total sperm count ($\times 10^6$)		252.8 ± 29.10	211.0 ± 37.13	60.8 ± 14.76	800.0**
Motility (%)		83.6 ± 8.28	86.5 ± 7.58	95.2** ± 3.82	48.0 ± 8.56
Motile sperm count ($\times 10^6$)		211.3** ± 43.20	182.7 ± 45.26	57.6 ± 15.57	384.0 ± 68.51
Normal sperm (%)		95.5 ± 1.62	95.1 ± 2.42	96.4** ± 1.71	85.6 ± 5.68
Progressive motility		3.7 ± 0.21	3.7 ± 0.16	3.8** ± 0.17	2.7 ± 0.23
Sperm recovery (%)	Total	31.6** ± 3.64	26.4 ± 4.64	7.6 ± 1.90	
	Motile	55.0** ± 3.29	47.8 ± 6.30	15.0 ± 2.49	

BSA: Bovine serum albumin ** : $p < 0.01$

* : $p < 0.05$, Progressive motility: Glaub(1976)

serum albumin 사용에 의한 일반 시판냉동정액으로부터의 高活力精자분리는 의의가 없었다.

原精液: 6%, 10% 및 20%의 濃도가 다른 bovine serum albumin을 사용하여 원정액으로부터 분리된 高活力精자의 관찰결과는 Table 2와 같다.

總精子數: 800×10^6 의 精자를 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin으로 분리한 결과 각각 $252.8 \pm 29.10 (\times 10^6)$, $211.0 \pm 37.13 (\times 10^6)$ 및 $60.8 \pm 14.76 (\times 10^6)$ 으로서 分離實驗群中에서는 6% bovine serum albumin에 의해 가장 많은 精자가 分離된 결과를 나타내었다 ($p < 0.01$).

精子運動性: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 分離된 精자와 對照群精자에 있어서 각각 83.6 ± 8.28 , 86.5 ± 7.58 , 95.2 ± 3.82 및 $48.0 \pm 8.56\%$ 로서 3가지 실험군의 정자운동성은 모두 對照群에 비해 현저히 높았으며, 분리실험군 중에서는 20% bovine serum albumin에 의해 분리한 精자가 가장 높은 성적을 나타내었다 ($p < 0.01$).

運動性精子數: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 分離된 精자와 bovine serum albumin을 사용하지 않은 對照群精자에 있어서 각각 $211.3 \pm 43.2 (\times 10^6)$, $182.7 \pm 45.26 (\times 10^6)$, $57.6 \pm 15.57 (\times 10^6)$ 및 $384.0 \pm 68.51 (\times 10^6)$ 로서 3가지 實驗群의 運動性精子數는 모두 對照群에 비하여 적었으며 ($p < 0.01$), 분리실험군중에서는 6% bovine serum albumin에서 가

장 많았다.

正常精子率: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 分離된 精子和 對照群精子에 있어서 각각 95.5 ± 1.62 , 95.1 ± 2.42 , 96.4 ± 1.71 및 $85.6 \pm 5.68\%$ 로서 대조군에 비해서 실험군에서 모두 높았으며 ($p < 0.05$), 實驗群間에서는 큰 差異가 없었다.

前進運動性: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 分離된 精子和 對照群精子에 있어서 各各 3.7 ± 0.21 , 3.7 ± 0.16 , 3.8 ± 0.17 및 2.7 ± 0.23 으로서 3가지 실험군의 前進운동성은 대조군에 비하여 모두 높았으며 ($p < 0.01$), 實驗群間에서는 큰 差異가 없었다.

總精子回收率: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 정자에 있어서 各各 31.6 ± 3.64 , 26.4 ± 4.64 및 $7.6 \pm 1.90\%$ 로서 6% bovine serum albumin을 사용한 실험군의 총정자회수율이 다른 群에 비하여 현저하게 높았다 ($p < 0.01$).

運動性精子回收率: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 정자에 있어서 各各 55.0 ± 3.29 , 47.8 ± 6.30 및 $15.0 \pm 2.49\%$ 로서 6% bovine serum albumin을 사용한 實驗群의 운동성 정자회수율이 다른 群에 비하여 현저하게 높았다 ($p < 0.01$).

2) bovine serum albumin에 의해 分離된 精자의 冷凍實驗: 原精液을 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리하고 분리된 精자를 冷凍, 融解한 후 관찰한 결과는 Table 3과 같다.

精子運動性: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin을 사용하여 분리된 精子和 對照群精자를 冷凍, 融解했을 때 各各 57.5 ± 8.78 , 60.5 ± 11.1 , 68.2 ± 8.48

Table 3. Light microscopic characteristics of bovine semen frozen and thawed following passing through bovine serum albumin (n=10; mean±S. D.)

	6% BSA	10% BSA	20% BSA	Control
Motility(%)	57.5 ±8.78	60.5 ±11.10	68.2** ±8.48	12.8 ±6.12
Normal sperm (%)	94.4 ±2.37	94.2 ±2.39	95.8** ±2.10	84.1 ±4.16
Progressive motility	3.1 ±0.27	3.0 ±0.17	3.2** ±0.25	2.2 ±0.21

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

및 $12.8 \pm 6.12\%$ 로서 3가지 實驗群의 精子運動性은 모두 대조군에 비해 현저히 높았으며, 分離實驗群中에서는 20% bovine serum albumin을 사용하여 분리한 精자가 가장 높은 성적을 나타내었다 ($p < 0.01$).

正常精子率: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 精子和 대조군정자에 있어서 各各 94.4 ± 2.37 , 94.2 ± 2.39 , 95.8 ± 2.10 및 $84.1 \pm 4.16\%$ 로서 對照群에 비해서 實驗群에서 모두 높았으며 ($p < 0.01$), 實驗群間에서는 큰 차이가 없었다.

前進運動性: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 精子和 對照群精子에 있어서 各各 3.1 ± 0.27 , 3.0 ± 0.17 , 3.2 ± 0.25 및 2.2 ± 0.21 로서 3가지 실험군의 前進運動性은 대조군에 비하여 모두 높았으며 ($p < 0.01$), 實驗群間에는 큰 차이가 없었다.

3) bovine serum albumin에 의해 分離된 精자의

Table 4. Post-thaw reduction rate of light microscopic quality of the sperm passed through bovine serum albumin (n=10; mean±S. D.)

	6% BSA			10% BSA			20% BSA			Control		
	Pre-freeze	Post-thaw	Reduction rate(%)	Pre-freeze	Post-thaw	Reduction rate(%)	Pre-freeze	Post-thaw	Reduction rate(%)	Pre-freeze	Post-thaw	Reduction rate(%)
Motility(%)	83.6 ±8.28	57.5 ±8.78	31.6 ±4.46	86.5 ±7.58	60.5 ±11.10	30.3 ±9.48	95.2 ±3.82	68.2 ±8.48	28.5 ±6.89	48.0 ±8.56	12.8 ±6.12	73.6 ±10.16
Motile sperm count($\times 10^6$)	211.3 ±43.20	147.3 ±37.90	31.5 ±4.50	182.7 ±45.26	127.8 ±42.30	30.3 ±9.50	57.6 ±15.57	41.5 ±14.38	28.5 ±6.86	384.0 ±68.51	10.4 ±49.00	74.6 ±8.26
Normal sperm (%)	95.5 ±1.62	94.4 ±2.37	1.2 ±0.92	95.1 ±2.42	94.2 ±2.39	0.9 ±0.90	96.4 ±1.71	95.8 ±2.10	0.6 ±0.88	85.6 ±5.68	84.1 ±4.16	1.7 ±1.09
Progressive motility	3.7 ±0.21	3.1 ±0.27	16.3 ±3.17	3.7 ±0.16	3.0 ±0.17	18.3 ±3.21	3.8 ±0.17	3.2 ±0.25	16.9 ±4.98	2.7 ±0.23	2.2 ±0.21	17.3 ±6.21

BSA: Bovine serum albumin Progressive motility: Glaub(1976) Reduction rate=

$\frac{\text{Prefreeze sperm quality} - \text{Postthaw sperm quality}}{\text{Prefreeze sperm quality}} \times 100$

冷凍前後의 性狀比較: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 精子의 冷凍前後의 性狀比較成績은 Table 4와 같다.

精子運動性: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 分離된 精子에 있어서 冷凍融解後 各各 31.6±4.46, 30.3±9.48 및 28.5±6.89%가 減少하였으며, 對照群의 精子는 73.6±10.16%가 減少하여, bovine serum albumin에 의해 분리된 高活力精子의 冷凍融解後 精子運動性의 減少가 대조군에 비하여 현저하게 낮음을 나타내었다.

運動性精子數: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 精子에 있어서 冷凍融解後 各各 31.5±4.50, 30.3±9.50 및 28.5±6.86%가 減少하였으며, 대조군의 精子는 74.6±8.26%가 減少하여 bovine serum albumin에 의해 분리된 高活力精子의 冷凍融解後 운동성정자수의 減少가 대조군에 비하여 현저하게 낮음을 나타내었다.

正常精子率: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 精子에 있어서 冷凍融解後 各各 1.2±0.92, 0.9±0.90 및 0.6±0.88%가 減少하였으며 대조군의 精子는 1.7±1.09%가 減少하여, bovine serum albumin에 의해 분리된 高活力精子의 冷凍融解後 正常精子率 減少가 대조군에 비하여 낮았으나, 큰 차이는 없었다.

前進運動性: 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 精子에 있어서 冷凍融解後 各各 16.3±3.17, 18.3±3.21 및 16.9±4.98%가 減少하였으며, 대조군의 精子는 17.3±6.21%가 減少하여, 6% 및 20% bovine serum albumin에 의한 精子의 冷凍融解後 前進運動性 減少率은 대조군에 비하여 낮았으며, 20% bovine serum albumin에서의 減少率이 가장 낮은 成績을 나타내었다.

4) 光學顯微鏡의 形態(Table 5): 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 精子와 대조군

Table 5. Light microscopic abnormalities of prefreeze and post-thaw sperm passed through bovine serum albumin (n=10; mean±S. D.)

	Prefreeze				Post-thaw			
	6% BSA (%)	10% BSA (%)	20% BSA (%)	Control (%)	6% BSA (%)	10% BSA (%)	20% BSA (%)	Control (%)
Small head	0.3±0.09	0.4±0.12	0.3±0.11	1.1±0.37	0.3±0.11	0.4±0.13	0.3±0.11	1.1±0.27
Large head	0.1±0.02	0.1±0.03	0.1±0.03	0.3±0.14	0.1±0.03	0.1±0.03	0.1±0.02	0.3±0.12
Absent head	0.8±0.37	0.6±0.21	0.3±0.15	2.8±1.03	1.2±0.35	0.9±0.29	0.4±0.16	3.4±1.02
Amorphous	0.1±0.03	0.1±0.03	0	0.2±0.06	0.1±0.02	0.1±0.02	0	0.2±0.05
Double tail	0.1±0.01	0.1±0.02	0	0.2±0.04	0.1±0.01	0.1±0.01	0	0.2±0.04
Tail abnormality	2.2±0.88	2.1±0.77	1.7±0.75	7.3±2.49	2.4±0.75	2.4±0.71	2.1±0.53	8.1±2.13
Immature sperm	0.9±0.41	1.5±0.36	1.2±0.32	2.5±0.77	1.4±0.62	1.8±0.60	1.3±0.04	2.6±1.12
Total abnormalities	4.5±1.62	4.9±2.08	3.6±1.35	14.6±5.68**	5.6±1.44	5.8±2.10	4.2±1.03	15.9±4.16**

BSA: Bovine serum albumin **: p<0.01

Table 6. Electron microscopic abnormalities of the sperm treated with 6% bovine serum albumin (n=6; mean±S. D.)

	Cell membrane			Acrosome		
	Intact (%)	Dilatation (%)	Vesiculation (%)	Intact (%)	Dilatation (%)	Density loss (%)
6% BSA	88* ±4.1	4 ±1.3	8 ±2.9	86** ±2.6	9 ±3.0	5 ±1.6
Control	81 ±2.4	6 ±1.6	13** ±2.5	75 ±2.4	16** ±2.3	9* ±2.1

BSA: Bovine serum albumin **: p<0.01 * : p<0.05

Table 7. Per Cent of motility of sperm separated by tyrode's solution at various time intervals
(n=10; mean±S. D.)

	20 min (%)	40 min (%)	60 min (%)	80 min (%)	100 min (%)	120 min (%)	Control (%)
Raw semen (KC)	16.2 ±2.20	27.5 ±2.46	57.4 ±6.70	89.8** ±3.68	60.2 ±3.19	52.3 ±4.50	36.2 ±3.39
Extended semen (KC)	20.1 ±4.23	25.8 ±2.49	51.3 ±3.95	85.1** ±2.92	58.6 ±4.84	47.3 ±5.00	28.3 ±3.74
Frozen semen (K)	23.6 ±3.44	32.4 ±4.70	43.7 ±4.06	83.7** ±3.77	65.1 ±3.48	48.3 ±2.50	23.5 ±3.50
Frozen semen (H)	28.3 ±2.58	35.1 ±3.63	53.5 ±3.41	86.8** ±2.66	67.8 ±2.20	42.9 ±3.73	27.3 ±2.75

KC : F₁ bull of Korean native-Charolais K : Korean native bull H : Holstein Friesian bull ** : p<0.01

Table 8. Progressive motility of sperm separated by tyrode's solution at various time intervals
(n=10; mean±S. D.)

	20 min (%)	40 min (%)	60 min (%)	80 min (%)	100 min (%)	120 min (%)	Control (%)
Raw semen (KC)	2.4 ±0.23	2.7 ±0.23	3.1 ±0.19	3.8** ±0.11	3.5 ±0.16	3.2 ±0.14	2.4 ±0.27
Extended semen (KC)	2.3 ±0.13	2.8 ±0.16	3.0 ±0.16	3.7** ±0.20	3.4 ±0.18	3.0 ±0.15	2.2 ±0.12
Frozen semen (K)	2.2 ±0.12	3.0 ±0.19	3.2 ±0.19	3.8** ±0.11	3.3 ±0.11	2.9 ±0.18	2.1 ±0.10
Frozen semen (H)	2.5 ±0.13	2.9 ±0.25	3.3 ±0.20	3.7** ±0.18	3.2 ±0.18	3.1 ±0.19	2.2 ±0.16

Progressive motility: Glaub (1976) KC : F₁ bull of Korean native-Charolais K : Korean native bull H : Holstein Friesian bull ** : p<0.01

Table 9. Sperm recovery rate of sperm separated by tyrode's solution at various time intervals
(n=10; mean±S. D.)

Semen	20 min (%)	40 min (%)	60 min (%)	80 min (%)	100 min (%)	120 min (%)
Raw semen (KC)	5.1 ±1.20	23.6 ±3.37	37.2 ±2.15	76.3** ±2.54	63.4 ±2.50	54.1 ±2.28
Extended semen (KC)	8.9 ±3.51	30.1 ±3.60	46.8 ±2.53	69.3** ±4.00	59.2 ±2.30	57.4 ±2.80
Frozen semen (K)	2.6 ±0.20	13.8 ±1.99	26.3 ±3.30	64.2** ±3.19	57.3 ±3.13	49.2 ±3.20
Frozen semen (H)	7.2 ±2.10	20.7 ±2.71	27.3 ±2.79	66.1** ±2.77	54.5 ±2.42	46.8 ±3.68

KC : F₁ bull of Korean native-Charolais K : Korean native bull H : Holstein Friesian bull ** : p<0.01

정자의 光學顯微鏡의 畸形率은 各各 4.5±1.62, 4.9±2.08, 3.6±1.35 및 14.6±5.68%로서 실험군의 畸形率이 대조군의 畸形率에 비하여 현저하게 낮았다(p<0.01).

6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 의해

분리된 精子과 대조군의 精子를 冷凍融解後 관찰한 결과 그 畸形率은 各各 5.6±1.44, 5.8±2.10, 4.2±1.03 및 15.9±4.16%로서 實驗群의 畸形率이 對照群의 畸形率에 비하여 현저하게 낮았다(p<0.01).

5) 電子顯微鏡의 形態(Table 6) : 細胞膜 : 6% bovine

serum albumin에 의해 분리된 精子中에서 正常的인 形態를 나타내는 것(Fig. 12)은 $88 \pm 4.1\%$ 이었으며 擴張(Fig. 13)과 空胞形成(Fig. 14)을 나타내는 精子는 各各 4 ± 1.3 및 $8 \pm 2.9\%$ 이었고, 對照群精子 中에서 正常的인 形態를 나타내는 것은 $81 \pm 2.4\%$ 이었으며, 擴張과 空胞形成을 나타내는 精子는 各各 6 ± 1.6 및 $13 \pm 2.5\%$ 로서, 실험군이 대조군에 비하여 細胞膜의 한외구조적인 變形이 적음을 나타내었다.

Acrosome : 6% bovine serum albumin에 의해 분리된 精子中에서 正常的인 形態를 나타내는 것(Fig. 12)은 $86 \pm 2.6\%$ 이었으며, 擴張(Fig. 15)과 density loss(Fig. 16)를 나타내는 精子는 各各 9 ± 3.0 및 $5 \pm 1.6\%$ 이었고, 對照群精子 中에서 正常的인 形態를 나타내는 것은 $75 \pm 2.4\%$ 이었으며, 擴張과 density loss를 나타내는 精子는 各各 16 ± 2.3 및 $9 \pm 2.1\%$ 로서, 實驗群이 對照群에 비하여 acrosome의 한외구조적인 變形이 적음을 나타내었다.

2. Tyrode液에서의 정자정치시간에 따른 精子의 性狀

精液을 원심분리하여 얻은 精子 pellet에 tyrode액을 넣은 후 20, 40, 60, 80, 100 및 120分의 정치시간별로 高活力精子를 回收하여 檢査한 결과는 Table 7, 8, 9와 같다.

精子運動性, 前進運動性 및 運動性精子回收率은 80分間 정치시에 가장 우수한 성적을 나타내었다($p < 0.01$). 정치시간이 20분에서 80분 사이일 때는 시간이 경과할수록 높은 성적을 나타내었으나, 그 이후부터는 시간이 경과할수록 성적이 낮아졌다.

3. Tyrode液에 의한 精子分劃分離

Table 10. Motility of sperm of various specimens separated by tyrode's solution (n=12; mean±S.D.)

	Tyrode layer (%)	Lower layer (%)	Control (%)
Raw semen(KC)	87.9** ±6.36	7.6 ±2.04	34.4 ±3.78
Extended semen(KC)	81.1** ±8.59	4.3 ±2.12	26.9 ±6.52
Frozen semen(K)	84.5** ±4.38	5.6 ±0.67	22.1 ±8.41
Frozen semen(H)	87.5** ±5.89	6.1 ±2.45	28.2 ±10.12

KC : F₁ bull of Korean native-Charolais K : Korean native bull H : Holtstein Friesian bull ** : $p < 0.01$

Table 11. Number of motile sperm in various specimens separated by tyrode's solution (n=12; mean±S.D.)

	Tyrode layer (×10 ⁶)	Lower layer (×10 ⁶)
Raw semen(KC)	116.3** ±8.97	24.2 ±3.51
Extended semen(KC)	85.5** ±5.76	15.9 ±3.86
Frozen semen(K)	3.2** ±0.65	1.1 ±0.36
Frozen semen(H)	4.9** ±0.72	1.3 ±0.36

KC : F₁ bull of Korean native-Charolais K : Korean native bull H : Holstein Friesian bull ** : $p < 0.01$

Table 12. Normal sperm of various specimens separated by tyrode's solution (n=12; mean±S.D.)

Specimen	Normal sperm (%)	Tyrode layer (%)	Lower layer (%)	Control (%)
Raw semen(KC)	95.3* ±3.20	73.7 ±5.28	85.3 ±4.92	
Extended semen(KC)	95.2** ±1.46	76.5 ±2.43	85.5 ±2.00	
Frozen semen(K)	95.5** ±1.41	79.9 ±3.11	88.3 ±3.06	
Frozen semen(H)	95.5* ±2.32	77.5 ±2.76	88.4 ±2.63	

KC : F₁ bull of Korean native-Charolais ** : $p < 0.01$
K : Korean native bull * $p < 0.05$
H : Holstein Friesian bull

Table 13. Progressive sperm motility of various specimens separated by tyrode's solution (n=12; mean±S.D.)

	Tyrode layer	Lower layer	Control
Raw semen(KC)	3.9** ±0.10	1.3 ±0.22	2.3 ±0.34
Extended semen(KC)	3.8** ±0.15	1.3 ±0.23	2.1 ±0.33
Frozen semen(K)	3.7** ±0.22	1.1 ±0.13	2.0 ±0.42
Frozen semen(H)	3.7** ±0.27	1.3 ±0.19	2.2 ±0.40

Progressive motility: Glaub(1976) KC : F₁ bull of Korean native-Charolais K : Korean native bull H : Holstein Friesian bull ** : $p < 0.01$

精子運動 : tyrode액을 사용하여 각종 정액으로부터 高活力精子를 분리한 결과 각 분획의 精子運動性은 Table 10과 같다. 즉 原精液, 液狀精液 및 두 가지의 冷凍精液에 있어서 tyrode層의 精子運動性은 각각 87.9 ± 6.36 , 82.1 ± 8.59 , 84.5 ± 4.38 및 $87.5 \pm 5.89\%$ 이었으며, 下層의 精子運動性은 각각 7.6 ± 2.04 , 4.3 ± 2.12 , 5.6 ± 0.67 및 $6.1 \pm 2.45\%$ 로서, 어느 供試精液에 있어서나 tyrode層에 집결된 精子의 運動性이 下層에 집결된 精子의 運動性에 비해 顯著하게 높은 현상을 나타내었다($p < 0.01$).

또한 tyrode層에 집결된 精子의 運動性은 對照群의 運動性에 비하여도 顯著히 높았으며 下層의 精子運動性은 對照群의 運動性에 비하여 顯著히 낮았다.

運動性精子數 : tyrode液을 使用하여 各種 精液으로부터 精子를 分割分離한 結果 各 分割의 運動性 精子數는 Table 11과 같다. 즉 原精液, 液狀精液 및 두 가지의 冷凍精液에 있어서 tyrode層의 運動性정자수 ($\times 10^6$)는 각각 116.3 ± 8.97 , 85.5 ± 5.76 , 3.2 ± 0.65 및 4.9 ± 0.72 이었고, 下層의 運動性 精子數($\times 10^6$)는

Table 14. Recovery rate of motile sperm of various specimens separated by tyrode's solution (n=12; mean \pm S. D.)

Specimen	Recovery rate	
	Tyrode layer (%)	Lower layer (%)
Raw semen(KC)	75.0^{**} ± 9.78	15.6 ± 3.37
Extended semen(KC)	67.1^{**} ± 5.79	12.5 ± 3.40
Frozen semen(K)	62.9^{**} ± 7.88	21.2 ± 4.15
Frozen semen(H)	65.0^{**} ± 9.66	17.3 ± 4.86

KC : F₁ bull of Korean native-Charolais

K : Korean native bull

H : Holstein Friesian bull ** : $p < 0.01$

각각 24.2 ± 3.51 , 15.9 ± 3.86 , 1.08 ± 0.36 및 1.3 ± 0.36 으로서 運動性精子는 tyrode層에 顯著하게 選擇的으로 集결된 結果를 나타내었다($p < 0.01$).

Table 15. Morphological abnormalities of the sperm separated by tyrode's solution (n=12; mean \pm S. D.)

	Raw Semen(KC)			Extended Semen(KC)		
	Tyrode layer (%)	Lower layer (%)	Control(%)	Tyrode layer (%)	Lower layer (%)	Control(%)
Small head	0.8 ± 0.31	1.3 ± 0.27	0.9 ± 0.32	0.3 ± 0.05	0.9 ± 0.27	0.8 ± 1.01
Large head	0.1 ± 0.02	0.5 ± 0.20	0.3 ± 0.11	0	0.5 ± 0.13	0.2 ± 0.03
Absent head	0.4 ± 0.05	6.0 ± 1.90	2.5 ± 0.72	0.4 ± 0.11	5.7 ± 1.32	2.3 ± 0.91
Amorphous	0.2 ± 0.03	0.4 ± 0.11	0.3 ± 0.09	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.09	0.3 ± 0.06
Double tail	0	0.2 ± 0.03	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.04
Tail abnormality	2.0 ± 0.66	15.2 ± 4.70	8.3 ± 3.20	2.6 ± 0.08	13.0 ± 1.78	8.2 ± 1.32
Immature sperm	1.2 ± 0.34	2.7 ± 0.93	2.3 ± 0.67	1.2 ± 0.04	2.9 ± 1.02	2.5 ± 0.89
Total abnormalities	4.7 ± 3.20	$26.3 \pm 5.28^{**}$	14.7 ± 4.92	4.8 ± 1.46	$23.5 \pm 2.43^{**}$	14.5 ± 2.00
	Frozen Semen(K)			Frozen Semen(H)		
	Tyrode layer (%)	Lower layer (%)	Control(%)	Tyrode layer (%)	Lower layer (%)	Control(%)
Small head	0.3 ± 0.11	1.2 ± 0.35	0.8 ± 0.27	0.2 ± 0.04	1.3 ± 0.67	0.5 ± 0.15
Large head	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.11	0.2 ± 0.03	0.1 ± 0.02	0.4 ± 0.13	0.3 ± 0.09
Absent head	0.4 ± 0.09	2.8 ± 1.07	1.2 ± 0.28	0.4 ± 0.11	3.3 ± 1.02	1.3 ± 0.40
Amorphous	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.14	0.2 ± 0.04	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.09	0.1 ± 0.03
Double tail	0	0.2 ± 0.05	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.04
Tail abnormality	2.8 ± 1.08	12.7 ± 2.07	7.1 ± 2.07	2.5 ± 1.03	14.3 ± 2.32	7.2 ± 2.17
Immature sperm	0.8 ± 0.02	2.6 ± 1.03	2.1 ± 0.98	1.1 ± 0.41	2.7 ± 1.75	2.0 ± 0.68
Total abnormalities	4.5 ± 1.41	$20.1 \pm 3.11^{**}$	11.7 ± 3.06	4.5 ± 2.32	$22.5 \pm 2.76^{**}$	11.6 ± 2.63

KC : F₁ bull of Korean native-Charolais K : Korean native bull H : Holstein Friesian bull ** : $p < 0.01$

正常精子率 : tyrode液을 使用하여 각종 精液으로부터 精子를 分割分離한 結果 각 分割의 正常精子率은 Table 12와 같다. 즉 原精液, 液狀精液 및 두가지의 冷凍精液에 있어서 tyrode層의 正常精子率은 各各 95.3±3.20, 95.2±1.46, 95.5±1.41 및 95.5±2.32%로서 tyrode層은 下層이나 처리하지 않은 대조군에 비하여 正常精子率이 有意性있게 높았다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

前進運動性 : tyrode液을 使用하여 각종 精液으로부터 精子를 分割分離한 結果 各 分割의 前進運動性은 Table 13과 같다. 즉 原精液, 液狀精液 및 두 가지의 冷凍精液에 있어서 tyrode層의 前進運動性은 各各 3.9±0.10, 3.8±0.15, 3.7±0.27로서 下層이나 처리하지 않은 대조군에 比하여 顯著히 높았다($p < 0.01$).

運動性精子 回收率 : tyrode液을 使用하여 各種精液으로부터 精子를 分割分離한 結果 各 分割의 運動性精子 回收率은 Table 14와 같다. 즉 原精液, 液狀精液 및 두가지의 冷凍精液에 있어서 tyrode層의 運動性精子 回收率은 各各 75.0±9.78, 67.1±5.79, 62.9±7.88 및 65.0±9.66%로서 下層에 比하여 有意性있게 높았다($p < 0.01$).

形態學的 畸形 : tyrode液으로 精子를 分割分離한 후 形態學的 檢査를 한 結果 各種 畸形의 分布는 Table 15와 같다. 즉 原精液, 液狀精液 및 두 가지의 冷凍精液에 있어서 tyrode層에 집결된 精子의 畸形率은 各各 4.7±3.20, 4.8±1.46, 4.5±1.41 및 4.5±2.32%로서 下層의 精子와 처리를 하지 않은 대조군의 精子의 畸形率에 比하여 顯著히 낮았다($p < 0.01$).

考 察

Lipshultz³⁷⁾에 의하면 雌性受胎能力을 평가하는 데는 精子의 수 보다도 精子의 길이 더욱 重要性을 가진다고 하였으며 精確한 精액분석을 위해서는 精액의 양 精子의 농도, 운동성, 전진운동성 및 형태학적 특성 등의 5가지 항목을 檢査하지 않으면 안된다고 하였다.

Rutherford³⁸⁾에 의하면 一般 냉동정액의 용해 후 운동성은 35%이었으나, serum albumin으로 처리한 후 냉동시킨 精액을 용해하면 精子의 운동성은 65%이었고, 이렇게 serum albumin으로 처리한 精액을 소에 人工授精한 結果 처리를 하지 않은 一般 냉동정액을 사용하였을 때 보다 分娩率이 7% 향상되었다고 한다.

이 실험에서 소의 원정액을 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin에 각각 통과시켜 高活力精子의 분리를 시도한 結果 각 처리군의 運動性, 運動性 精子數 正常精子率 및 前進運動性은 bovine serum albumin을

통과하지 않은 대조군의 48.0%, 384.0×10⁶, 85.6% 및 2.7에 비해 현저히 높았으며, 總精子數는 대조군의 800×10⁶에 비해 현저히 낮았다(Table 2).

이와 같은 실험결과는 Glass와 Ericsson²⁷⁾이 지적한 것처럼 운동성이 높고 정상적인 정자일수록 점조성이 있는 bovine serum albumin層을 용이하게 통과한다는 주장과 일치되는 성적인 것으로 사료된다.

각 처리군간에 있어서는 20% bovine serum albumin을 처리했을 때 운동성, 전진운동성 및 정상정자율이 가장 높은 성적을 나타내었고, 運動性精子數 및 精子 回收率에 있어서는 6% bovine serum albumin을 사용할 때 가장 높은 성적을 나타내었다.

Ericsson 등²⁰⁾은 사람의 原精液을 사용하여 6%, 10% 및 20%의 농도를 달린 bovine serum albumin으로 정액을 처리한 結果 20%에서 정자운동성이 다른 처리군에 비하여 가장 높았으며, 정자회수율은 6%일 때 높았다고 보고하였다. 그러나 소에 대한 高활력정자 분리를 위하여 20% bovine serum albumin을 사용한 보고는 아직 檢한 바 없었으며, 본 실험의 結果는 사람의 원정액을 사용하여 얻은 Ericsson의 結果와 유사한 성적이었다.

이상을 綜合하면 bovine serum albumin을 사용하여 소의 原精液으로부터 高활력정자의 분리가 가능하였으며, 20% bovine serum albumin을 사용했을 때 質的으로 가장 좋은 정자를 선택적으로 구할 수 있었지만 精子回收率이 낮았으며, 10% bovine serum albumin을 사용할 때의 정자의 성상은 6% bovine serum albumin일 때와 별 차이가 없었으나 회수율에 있어서는 6% bovine serum albumin일 때 보다 적었으며 6% bovine serum albumin을 사용할 때는 정자회수율이 가장 높고 정자의 성상도 10% bovine serum albumin일 때와 근사한 성적이었으므로 6% bovine serum albumin을 사용하는 것이 실리적일 것으로 생각된다.

그러나 시판 냉동정액으로부터 高활력정자의 분리가 bovine serum albumin을 사용하여 가능한가를 시도하기 위하여 우선 6% bovine serum albumin으로 시도하여 본 結果 분리된 精子가 총정자수, 운동성, 운동성정자수에 있어서 bovine serum albumin으로 처리하지 않은 대조군에 비하여 현저히 낮은 성적을 나타내었다(Table 1). 이와 같은 본 실험결과로 bovine serum albumin으로 처리하지 않은 一般 시판 냉동정액에 대해서는 bovine serum albumin을 사용한 高활력정자의 분리성적이 낮다는 결론을 얻게 되었다.

이상과 같이 一般 냉동정액으로부터 高활력정자의 분리성적이 낮은 이유는 냉동정액은 용해 후 정자운동

성이 너무 낮아서 점조성이 있는 bovine serum albumin층을 쉽게 통과하지 못하는 것과 관련지어 생각할 수 있다.

Rutherford⁶⁰⁾는 bovine serum albumin을 사용하여 고효력정자를 분리한 후 분리된 정자를 냉동 용해하여 인공수정하였던 결과 수정율이 향상되었다고 한다. 따라서 본 실험에서는 냉동정액의 용해 후 精子活力을 높이기 위한 방법으로서 냉동전에 미리 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin을 통과시켜 高活力精子를 선택적으로 분리한 후 분리된 고효력정자만을 冷凍한 후 融解시켜 관찰한 결과 정자운동성, 정상정자율, 전진운동성에 있어서 일반 냉동정액을 냉동한 후 용해하여 관찰한 대조군에 비하여 현저히 높은 성적을 나타내었다(Table 3).

이 실험에서 냉동전에 bovine serum albumin을 각각 사용하여 원정액으로부터 고효력정자를 분리한 후 이를 냉동 용해시켜서 관찰한 결과 냉동후의 精子의 性狀이 냉동전에 비하여 감소하기는 하였으나 대조군에 비해 감소율이 현저히 적었다. 한편 사용한 bovine serum albumin의 농도가 높을수록 이러한 감소율은 더욱 낮았다(Table 4). 이러한 성적은 bovine serum albumin을 사용하여 분리된 고효력정자가 일반정자에 비해서 온도 쇼크에 대해 저항력을 갖고 있기 때문인 것으로 추측된다.

6%, 10% 및 20% bovine serum albumin을 사용하여 분리한 고효력정자를 광학현미경으로 관찰한 기형율은 냉동전에 있어서는 각각 4.5, 4.9 및 3.6%이었으며 냉동후에 있어서는 각각 5.6, 5.8 및 4.2%로서 다같이 대조군인 냉동전의 14.6%와 냉동후의 15.9%에 비하여 현저히 낮았으며(Table 5), 이는 White 등⁶¹⁾의 관찰결과와 근사한 성적이었다.

6% bovine serum albumin을 사용하여 분리한 고효력정자를 전자현미경으로 관찰한 세포막의 확장과 공포형성, acrosome의 확장과 density loss 등의 기형율은 각각 4, 8, 9 및 5%로서 대조군인 6, 13, 16 및 9%에 비하여 현저히 낮았다. 이와 같은 실험결과는 1982년 Sherman과 Dmowski⁶⁴⁾가 사람 精液중에서 고효력정자를 선택적으로 분리한 후 전자현미경으로 관찰한 결과 세포막의 기형율이 18%에서 11%로 감소되었으며, acrosome의 기형율은 27%에서 13%로 감소되었다고 한 보고와 유사한 성적이었다. 이러한 사실은 기형정자가 점조성이 높은 bovine serum albumin을 통과하기 힘들기 때문으로 생각되며 또한 精子가 bovine serum albumin을 통과할 때 形態的인 변화를 일으키지 않음을 시사하는 것으로 思料된다.

이상을 요약하면 이미 냉동된 일반정액으로부터는 bovine serum albumin을 사용하여도 고효력정자의 분리가 어려우나, 原精液으로부터 bovine serum albumin을 사용하여 분리한 고효력정자는 bovine serum albumin을 사용하지 아니한 대조군에 비하여 일반적인 精子性狀이 우월할 뿐더러 형태학적인 畸形率도 낮기 때문에 bovine serum albumin을 사용한 고효력정자의 分離는 受胎率을 높일 수 있는 가능성을 시사해 준다. 그러나 정액수급현황으로 볼때 원정액으로부터 bovine serum albumin을 사용하여 高活力精子를 분리하는 것은 말은 어려움이 있다고 생각된다. 따라서 이미 제조되어 시판되고 있는 一般冷凍精液으로부터 高活力精子를 분리하는 것이 현실적으로 절실하게 요구된다고 생각된다.

저자는 일반적으로 정액관계실험에 많이 이용하고 있는 정자에 무해한 완충액을 精液과 혼합한 다음 원심분리하여 정자를 침전시킨 후 정치시켜 두면 活力이 좋은 정자가 우선적으로 유영하여 올라와서 완충액에 부유되기 때문에 高活力精子를 분리할 수 있을 것이라는 가정하에 受精卵移植¹³⁾과 정액관계실험^{4,5,15,19,29)}에 가장 많이 쓰이는 tyrode液을 사용하여 고효력정자의 분리를 시도하였다.

이 실험에서 tyrode液을 사용하여 高活力精子를 분리하는데 있어서 우선 tyrode液에서의 정치시간을 결정짓기 위하여 정치시간을 20, 40, 60, 80, 100 및 120분으로 각각 정하여 원정액, 희석정액 그리고 두가지 종류의 냉동정액의 정자운동성, 전진운동성 및 운동성정자 회수율을 비교한 결과 각군의 精子運動性은 80분대에서 각각 89.8, 85.1, 83.7 및 86.8%로서 다른 시간대에 비하여 유의성있게 높았으며, tyrode액으로 처리하지 않은 대조군인 36.2, 28.3, 23.5 및 27.3%에 비하여 모두가 현저히 높은 精子運動性을 나타냄을 알수 있었다(Table 7). 前進運動性에 있어서도 각 처리군에 있어서 80분대의 성적이 각각 3.8, 3.7, 3.8 및 3.7로서 다른 시간대에 비하여 가장 높았으며, tyrode액으로 처리하지 않은 대조군인 2.4, 2.2, 2.1 및 2.2에 비하여 모두가 유의성 있게 높은 前進運動性을 나타내었다(Table 8). 운동성정자 회수율에 있어서도 80분대에서의 성적이 각각 76.3, 69.3, 64.2 및 66.1%로서 다른 시간대에 비하여 가장 높은 運動性精子 回收率을 보였다(Table 9). 따라서 tyrode액에서의 정자의 정치시간은 80분대에서 가장 좋은 결과를 나타내었으므로, 본 실험에서의 정치시간을 80분대로 고정하여 실험을 실시하였다.

tyrode액을 사용하면 bovine serum albumin을 사용

하였을 때와는 달리 原精液과 稀釋精液은 물론 市販 冷凍精液으로부터도 高活力精자를 분리할 수 있었으며 tyrode液을 사용하여 분리된 高활력정자는 運動性, 運動性精자數, 前進運動性 및 正常精자率에 있어서 대조군에 비해 매우 좋았으며, 형태적 기형율은 현저히 낮았다. 한편 運動性精자의 回收率은 各種 精液에 있어서 tyrode층에서 높았다.

즉 原精液, 稀釋精液 및 두 가지의 冷凍精液을 사용하여 tyrode액으로 80분간 정치한 정자의 운동성, 운동성정자수, 정상정자율 및 전진운동성에 있어서 정자의 운동성은 tyrode층에서 각각 87.9, 82.1, 84.5 및 87.5%(Table 10)이었고, 정자의 운동성정자수($\times 10^6$)는 tyrode층에서 각각 116.3, 85.5, 3.2 및 4.9(Table 11)이었으며, 정상정자율은 tyrode층에서 각각 95.3, 95.2, 95.5 및 95.5%(Table 12)이었고, 전진운동성은 tyrode층에서 각각 3.9, 3.8, 3.7 및 3.7(Table 13)으로서 모두 하층 및 대조군의 정자성상에 비하여 유의성있게 높은 성적을 나타내었다.

이와같은 결과는 원심분리에 의해 형성된 精자 pellet 층에서 運動性이 좋은 정자들이 먼저 universal movement를 일으켜서 tyrode액 속으로 유영하여 부유하기 때문에 高활력정자를 분리할 수 있을 것이라는 이 실험에서 설정한 가정을 잘 입증해 주는 것이라고 사료된다.

原精液, 稀釋精液 및 두 가지의 冷凍精液을 사용하여 tyrode액으로 80분간 정치한 정자의 운동성정자 회수율은 tyrode층에서는 각각 75.0, 67.1, 62.9 및 65.0%로서 하층의 운동성정자 회수율에 비하여 현저히 높은 성적을 나타내었는데(Table 14), 이러한 성적은 tyrode액을 사용하여 原精液과 稀釋精液은 물론 冷凍精液으로부터도 高活力精자가 선택적으로 잘 분리되었음을 입증해 주는 성적이라고 생각된다.

原精液, 稀釋精液 및 두 가지의 冷凍精液에 대하여 tyrode액으로 처리한 總精자畸形率은 원정액에 있어서는 tyrode층이 4.7%로서 대조군인 14.7%와 하층인 26.3%에 비해 현저히 낮았으며, 액상정액에 있어서는 tyrode층이 4.8%로서 대조군인 14.5%와 하층인 23.5%에 비하여 가장 낮았으며, 두 가지의 냉동정액에 있어서도 tyrode층이 각각 4.5 및 4.5%로서 대조군인 11.7 및 11.6% 그리고 하층인 20.1 및 22.5%에 비해서 현저히 낮은 수치를 나타냄으로써 각 처리군에 있어서 모두 tyrode층에 있어서의 총정자기형율이 현저히 낮았음을 알 수 있었다(Table 15).

이러한 성적은 기형정자가 운동성이 약하거나 없기 때문에 tyrode液으로 유영을 잘못하는 것과 관련이 있

을 것으로 생각된다. tyrode액층에 운동성이 없는 精자가 간혹 발견되는 이유는 운동성이 좋은 精자가 pellet로부터 tyrode液쪽으로 游泳하여 나올 때 같이 붙어서 나오기 때문인 것으로 추측된다. 따라서 tyrode液을 사용하면 高活力精자를 분리할 수 있음과 동시에 畸形精자를 제거하는 효과도 얻을 수 있다는 사실이 입증되었다.

tyrode液을 이용한 先人들의 실험보고에는 아직 접한 바 없으므로 본 실험과 비교 검토를 할 수 없으나, 이상의 결과를 총괄할 때 본 실험에서 tyrode液을 사용하여 분리된 정자는 運動性, 運動性精자數, 前進運動性, 正常精자率에 있어서 현저히 높은 성적을 나타내었으며 畸形率은 낮았다. 이와 같은 성적은 본 실험에서 bovine serum albumin을 사용하여 高活力精자를 분리한 성적보다도 우수한 결과였으며, 특히 bovine serum albumin을 사용하여서는 冷凍精液의 분리가 불가능하였으나, tyrode液을 사용할 경우에는 一般市販 冷凍精液에 대해서도 高活力精자를 분리할 수 있었다. 따라서 受胎率을 향상시키고 동시에 正常分娩率을 높이기 위해서는 tyrode液을 사용하여 高活力精자를 분리할 수 있으며 이 방법은 실용화할 수 있는 방법이라고 생각된다.

結 論

소의 繁殖效率을 증가시키기 위한 기초실험으로서 6%, 10% 및 20%의 bovine serum albumin을 사용한 선인들의 방법과 tyrode액을 사용하여 시도한 저자의 방법으로 소의 原精液, 稀釋精液 및 一般市販 冷凍精液으로부터 高活力精자를 분리수집하여 精자의 각종 성상과 광학현미경적 및 전자현미경적 형태를 비교 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 原精液으로부터 bovine serum albumin을 사용하여 분리한 精자는 대조군에 비하여 運動性, 運動性精자數, 正常精자率 및 前進運動性이 현저히 높았고 精자回收率은 6%일 때 가장 높았다.
2. 原精液으로부터 bovine serum albumin을 사용하여 高活力精자를 분리한 후 냉동한 정액의 정자운동성 정상정자율 및 전진운동성은 대조군에 비하여 현저히 높았고, 이러한 현상은 bovine serum albumin의 농도가 20%일 때에 가장 현저하게 나타났다.
3. bovine serum albumin을 사용하여 분리한 高活力精자의 냉동전 및 냉동후의 광학현미경적인 畸形率은 대조군에 비하여 현저히 낮았다.
4. bovine serum albumin을 사용하여 분리한 高活力精자는 전자현미경적으로 細胞膜의 擴張 및 空胞形

成, acrosome의擴張과 density loss의變形率이 대조군에 비하여 낮았다.

5. 一般市販 冷凍精液으로부터의 고효력정자의 분리에는 bovine serum albumin을 사용할 때는 어려웠으나, tyrode액을 사용한 이 실험에서는 가능하였다.

6. 原精液, 稀釋精液 및 冷凍精液의 고효력정자회수율은 tyrode액을 이용하여 80분간 정지하였을 때 현저

히 높았다.

7. tyrode액을 이용하여 原精液, 稀釋精液 및 冷凍精液으로부터 분리된 고효력정자의 운동성, 전진운동성 및 정상정자율은 대조군에 비하여 현저히 높았다.

8. tyrode액을 이용하여 原精液, 稀釋精液 및 冷凍精液으로부터 분리한 고효력정자의 광학현미경적畸形率は 대조군에 비하여 현저히 낮았다.

Legends for figures

Fig. 4. Normal sperm($\times 1,000$)

Fig. 5. Microcephalic sperm($\times 1,000$)

Fig. 6. Macrocephalic sperm($\times 1,000$)

Fig. 7. Absent sperm head($\times 1,000$)

Fig. 8. Amorphous sperm($\times 1,000$)

Fig. 9. Double-tailed sperm($\times 1,000$)

Fig. 10. Sperm with tail abnormality($\times 1,000$)

Fig. 11. Immature sperm($\times 1,000$)

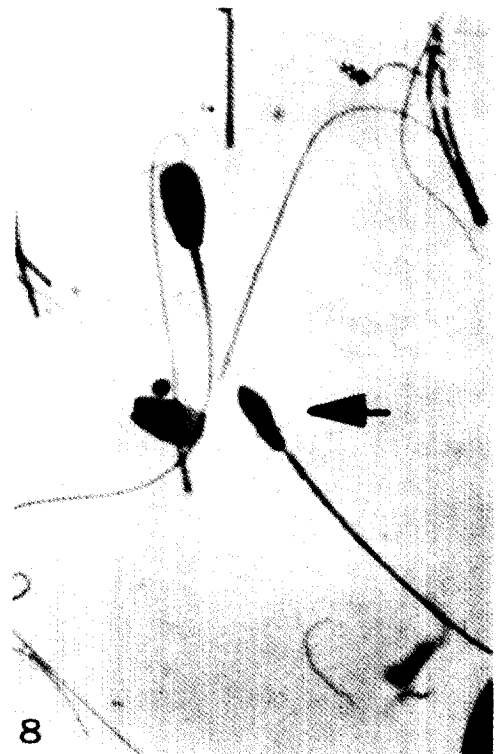
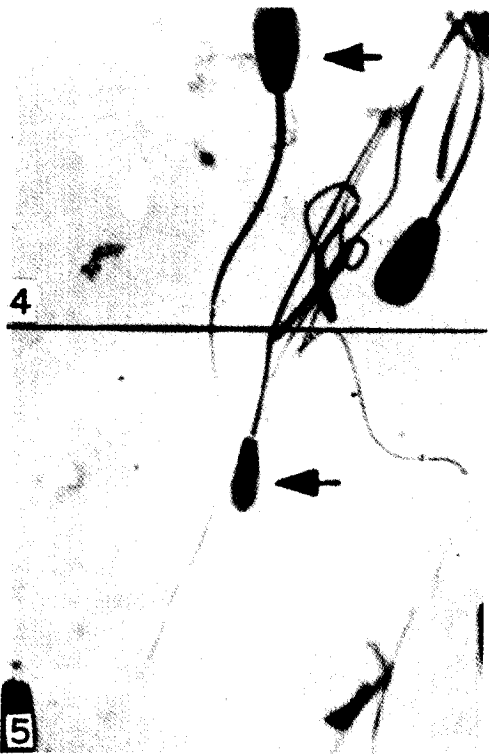
Fig. 12. Sperm with normal cell membrane and normal acrosome($\times 30,000$)

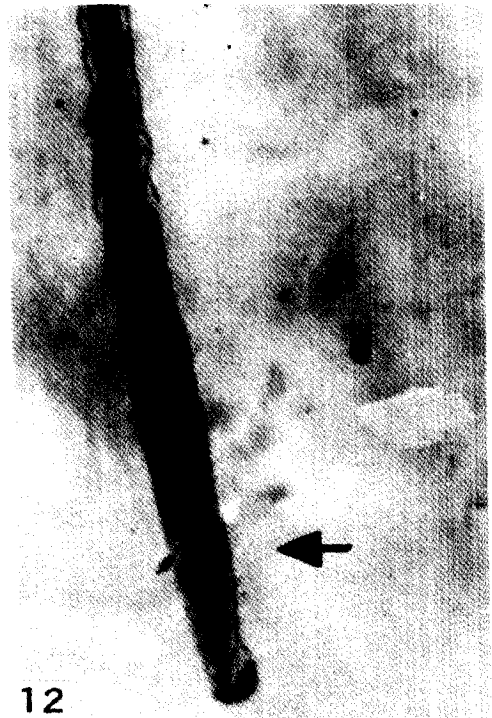
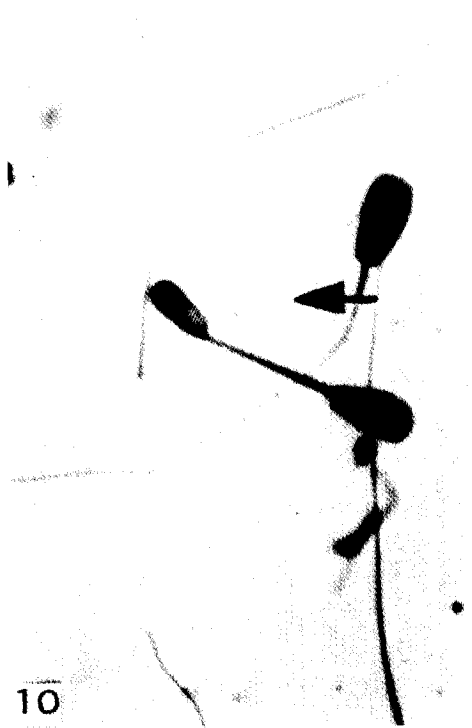
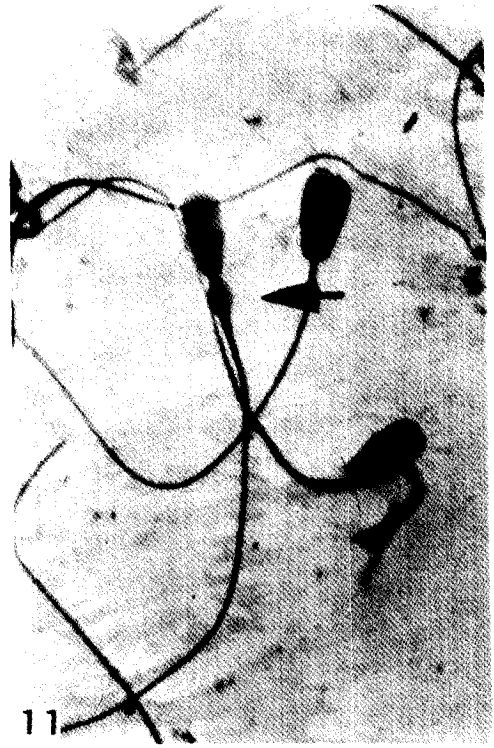
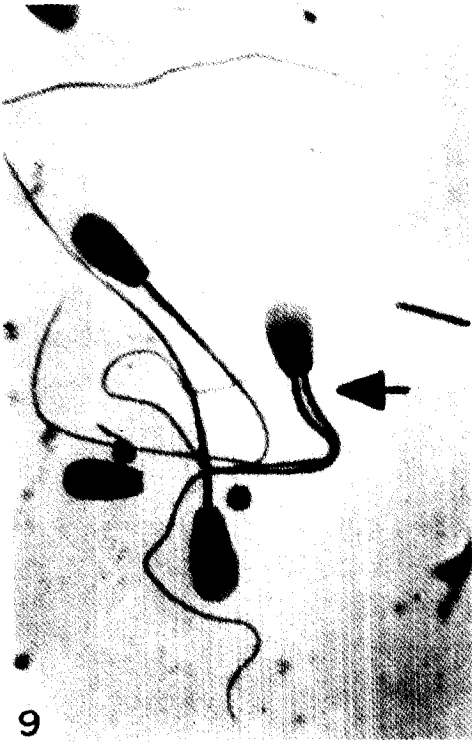
Fig. 13. Sperm with cell membrane dilatation($\times 42,500$)

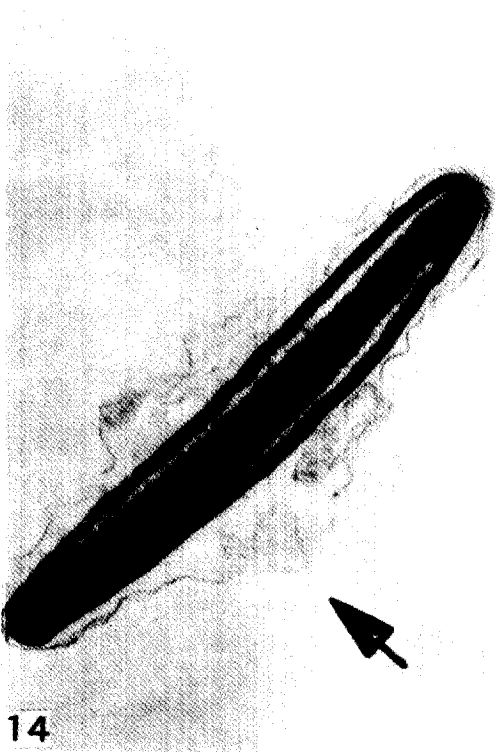
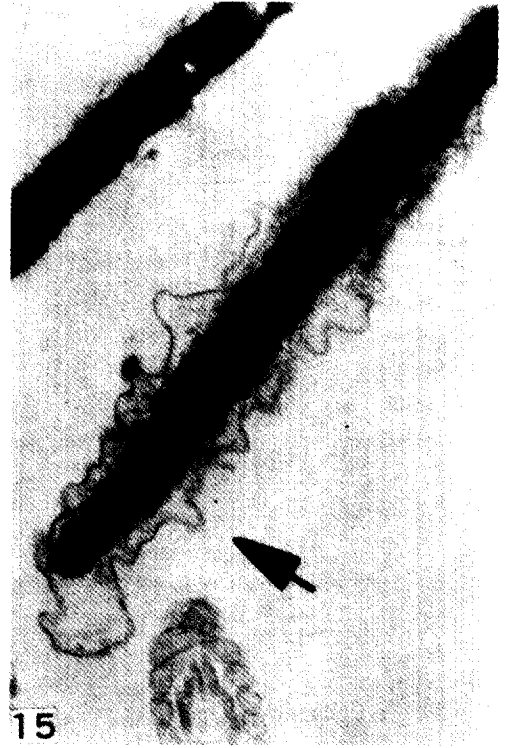
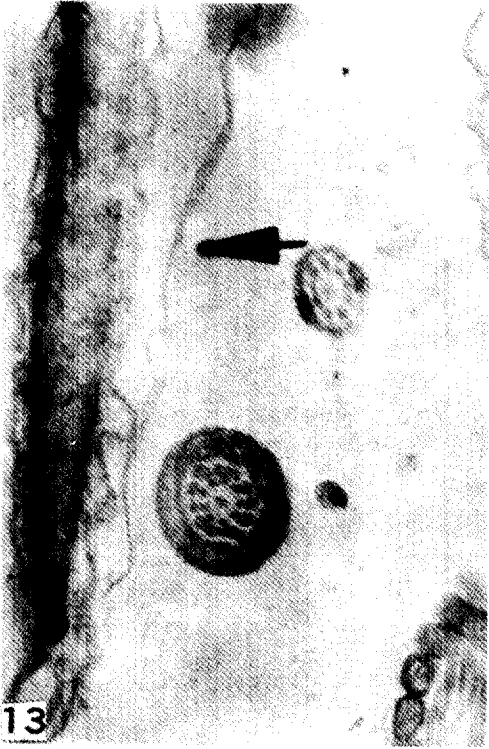
Fig. 14. Sperm with cell membrane vesiculation($\times 37,500$)

Fig. 15. Sperm with acrosomal dilatation($\times 30,000$)

Fig. 16. Sperm with reduced acrosomal density($\times 30,000$)







References

1. Almquist, J.O. : A comparison of penicillin, streptomycin and sulphanilamide for improving the fertility of semen from bulls of low fertility. *J. Dairy Sci.* (1951) 34 : 819.
2. Almquist, J.O. : Diluters for bovine semen. V. A comparison of heated milk and egg yolk-citrate as diluters for semen from bulls of high and low fertility. *J. Dairy Sci.* (1954) 37 : 1308.
3. Almquist, J.O. and Wickersham, E.W. : Diluents for bovine semen XII, Fertility and motility of spermatozoa in skim milk with various levels of glycerol and methods of glycerolization. *J. Dairy Sci.* (1962) 45 : 782.
4. Bavister, B.D. : Properties of the sperm motility-stimulating component derived from human serum. *J. Reprod. Fert.* (1975) 43 : 363.
5. Beck, K.J., Herschel, S., Hungershofer, R. and Schwinger, E. : The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X- and Y-bearing human spermatozoa. *Fert. Steril.* (1976) 27 : 407.
6. Beernink, F.J. and Ericsson, R.J. : Male sex preselection through sperm isolation. *Fert. Steril.* (1981) 36 : 421.
7. Bernink, F.J. and Ericsson, R.J. : Male sex preselection through sperm isolation. *Fert. Steril.* (1982) 38 : 493.
8. Binor, Z., Rao, R., Vandervan, H. and Scommegna, A. : The effect of an albumin gradient and human serum on the longevity and fertilizing capacity of human spermatozoa using an in vitro fertilization model. *Fert. Steril.* (1976) 35 : 242.
9. Black, J.B., Peduto, J.C. and Servy, E.J. : Male factor infertility treated by isolation of progressively motile sperm. *Fert. Steril.* (1978) 29 : 241.
10. Broer, K.H. and Dauber, U. : A filtering method for cleaning up spermatozoa in cases of asthenospermia. *Int. J. Fert.* (1978) 23 : 234.
11. Broer, K.H., Dauber, U. and Kaiser, R. : In vitro penetration tests of separated X and Y spermatozoa. *Fert. Steril.* (1977) 28 : 328.
12. Broer, K.H., Dauber, U. and Kaiser, R. : A filtering method for cleaning up spermatozoa in cases of asthenospermia. *Fert. Steril.* (1977) 28 : 335.
13. Daniel, J.C. Jr. : Method in mammalian embryology. W.H. Freeman and Company, San Francisco. (1971) p. 305.
14. David, G., Jeulin, C., Boyce, A. and Schwartz, D. : Motility and percentage of Y- and Y-bearing spermatozoa in human semen samples after passage through bovine serum albumin. *J. Reprod. Fert.* (1977) 50 : 377.
15. Diasio, R.E. and Grass, R.H. : Effects of pH on the migration of X and Y sperm. *Fert. Steril.* (1971) 22 : 303.
16. Dixon, K.E., Songy, E.A. Jr., Thrasher, D.M. and Kreider, J.L. : Effect of bovine serum albumin on the isolation of boar spermatozoa and their fertility. *Theriogenology.* (1980) 13 : 437.
17. Dmowski, W.P., Gaynor, L., Lawrence, M., Rao, R. and Scommegna, A. : AIH with oligospermic semen separated on albumin columns. *Fert. Steril.* (1979) 31 : 58.
18. Dmowski, W.P., Gaynor, L., Rao, R., Lawrence, M. and Scommegna, A. : Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. *Fert. Steril.* (1979) 31 : 52.
19. Ericsson, R.J. : Isolation and storage of progressively motile human sperm. *Andrologia.* (1977) 9 : 111.
20. Ericsson, R.J., Langevin, C.N. and Nishino, M. : Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* (1973) 246 : 421.
21. Ericsson, R.J. and Glass, R.H. : Isolation of progressively motile sperm from infertile men. *Fert. Steril.* (1977) 28 : 330.
22. Evans, J.M., Douglas, T.A. and Renton, J.P. : Attempts to separate fractions rich in human Y sperm. *Nature* (1975) 253 : 352.
23. Faust, A.M., Kreider, J.L., Ericsson, R.J., Goodeaux, S.D. and Godke, R.A. : Isolation of progressively motile spermatozoa from bull semen. *J. Anim. Sci.* (1976) 43 : 283.

24. Foote, R.H., Young, D.C. and Dunn, H.O. : Fertility of bull semen stored one and two days at 5°C. In 20 percent yolk citrate-glycine-glucose extenders. *J. Dairy Sci.* (1958) 41 : 732.
25. Foote, R.H. and Dunn, H.O. : Motility and fertility of bull semen extended at high rates in yolk extender containing catalase. *J. Dairy Sci.*, (1962) 45 : 1237.
26. Glass, R.H. and Ericsson, R.J. : Intrauterine insemination of isolated motile sperm. *Fert. Steril.* (1978) 29 : 535.
27. Glass, R.H. and Ericsson, R.J. : Getting pregnant in the 1980s: New advances in infertility treatment and sex preselection. Univ. California Press, Berkeley. (1982) p.113.
28. Glaub, J.C., Mills, R.N. and Katz, D.F. : Improved motility recovery of human spermatozoa after freeze preservation via a new approach. *Fert. Steril.* (1976) 27 : 1233.
29. Goodall, H. and Roberts, A.M. : Differences in motility of human X-and Y-bearing spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* (1976) 48 : 433.
30. Goodeaux, S.D. and Kreider, J.L. : Motility and fertility of stallion spermatozoa isolated in bovine serum albumin. *Theriogenology* (1978) 10 : 405.
31. Herman, H.A. : Artificial insemination is used worldwide. *Hoard's Dairyman*, Jan. 10th Issue. (1965) p.32.
32. Illyes, D.R., Warren, W.R., Baham, A., Kreider, J.L. and Godke, R.A. : Freezing separated bovine spermatozoa. *J. Anim. Sci. Suppl.* 1(1977) 45 : 171.
33. Illyes, D.R., Kreider, J.L., Baham, A. and Godke, R.A. : AI of beef heifers with frozen, BSA-separated semen from dairy bulls. *J. Anim. Sci. Suppl.* 1(1980) 51 : 38.
34. Jeulin, C. : Motility of human spermatozoa after migration in bovine serum albumin. In: *Human artificial insemination and semen preservation*. Eds. David & W.S. Price, Plenum, New York. (1980) p.565.
35. Koper, A., Evans, P.R., Witherow, R.O.N., Flynn, J.T., Bayliss, M. and Blandy, J.P. : A technique for selecting and concentrating the motile sperm from semen in oligospermia. *Brit. J. Urol.* (1979) 51 : 587.
36. Leslie, W. and Quinlivan, G. : Separation of X and Y spermatozoa. *Fert. Steril.* (1980) 34 : 307.
37. Lipshultz, L.I. : Beyond the routine semen analysis. *Fert. Steril.* (1982) 38 : 153.
38. Luft, J.H. : Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cyrol.* (1961) 9 : 409.
39. McEntee, K., Hughes, D.E. and Gilman, H.L. : Prevention of vibriosis in inseminated heifers by treating the semen from vibrio-infected bulls with penicillin, streptomycin and sulphanilamide. *Cor. Vet.* (1954) 44 : 395.
40. Melrose, D.R. : Skim milk powder as a semen diluent. *Proc. 3rd Internat. Congr. on Reprod.*, Cambridge, Sect. (1956) 3 : 68.
41. Orthey, A.E. and Gilman, H.L. : The antibacterial action of penicillin and streptomycin against *Vibrio fetus* including concentrations found in naturally infected semen. *J. Dairy Sci.* (1954) 37 : 416.
42. Phillips, P.H. and Lardy, H.O. : A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.* (1940) 23 : 399.
43. Polge, C. and Rowson, L.E.A. : Long term storage of bull semen frozen at very low temperatures (-79°C). *Rept. 2nd Internat. Congr. of Physiol. and Path. of An. Peprod. and of Art. Insem.* (1952) 3 : 90.
44. Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. : Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* (1949) 164 : 666.
45. Quinlivan, W.L.G., Preciado, K., Long, T.L. and Sullivan, H. : Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradient and Sephadex chromatography. *Fert. Steril.* (1982) 37 : 104.
46. Rapatz, G.L. : What happens when semen is frozen. *Proc. 1st Techn. Confer. on Art. Insem. and Bovine Reprod.*, Nat. Assoc. of Animal Breeders. (1966) p.45.
47. Reynolds, E.S. : The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron mi-

- croscopy. *J. Cell. Biol.* (1963) 17 : 208.
48. Roberts, S.J. : *Veterinary obstetrics and genital diseases*, 2nd. Ithaca, New York, (1971) p. 726.
 49. Ross, A., Robinson, J.A. and Evans, H.J. : Failure to confirm separation of X-and Y-bearing human sperm using BSA gradients. *Nature* (1975) 253 : 354.
 50. Rutherford, B. : Gets more bull calves and better conception. *Gelbvieh country* (1982) 9 : 31.
 51. Salisbury, G.W., Fuller, H.K. and Willett, E.L. : Preservation of bovine spermatozoa in yolk citrate diluent and field results from its use. *J. Dairy Sci.* (1941) 24 : 905.
 52. Schoenfeld, C., Amelar, R.D., Dubin, L.D. and Amelar, S. : A new staining technique for the rapid determination of the morphologic characteristics of sperm. *Fert. Steril.* (1981) 36 : 408.
 53. Shapiro, S.S., Kooistra, J.B., Schwartz, D., Yunginger, J.W. and Haning, R.V. : Induction of pregnancy in a woman with seminal plasma allergy. *Fert. Steril.* (1981) 36 : 405.
 54. Sherman, J.K. and Dmowski, W.P. : Effect of isolation by albumin density gradients on ultrastructure of human spermatozoa. *Fert. Steril.* (1982) 38 : 460.
 55. Singer, R., Sagiv, M., Barnet, M., Allalouf, D., Landau, B., Segenreich, E. and Servadio, C. : Properties of spermatozoa from normospermic and oligospermic human semen fractionated on columns of discontinuous gradients of albumin. *Int. J. Fert.* (1980) 25 : 51.
 56. Sorensen, A.M. Jr. : *A laboratory manual for animal reproduction*, 4th. American press, Boston. (1979) p. 53.
 57. Thacker, D.L. and Almquist, J.O. : Diluters for bovine semen fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. *J. Dairy Sci.* (1953) 36 : 173.
 58. VanDemark, N.L. and Bartlett, F.D. Jr. : Prolonged survival of bull sperm in the Illini variable temperature diluent. *J. Dairy Sci.* (1958) 41 : 732.
 59. VanDemark, N.L. and Sharma, U.O. : Preliminary fertility results from the preservation of bovine semen at room temperatures. *J. Dairy Sci.* (1957) 40 : 438.
 60. Wade, A. : *Martindale the extra phamacopocia*, 27th ed. Phamaceutical press, London. (1977) p. 1452.
 61. Wall, R.J., Jerrard, D.A. and Foote, R.H. : Separation of rabbit and bull spermatozoa on bovine serum albumin gradients. *Biol. Reprod. Suppl. 1.* (1980) 22 : 94.
 62. Weeda, A.J. and Cohen, J. : 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.* (1982) 37 : 817.
 63. White, L.M., Beal, W.E., Saacke, R.G. and Bame, J.H. : Isolation of highly motile, morphologically normal bovine spermatozoa. *Amer. Soc. Anim. Sci. Metting.* (1982) 688 : 400.