

Albumin density gradient 방법에 의한 고활력 우정자 분리시의 정자두부크기의 비교 관찰

연세대학교 농업개발원, * 서울대학교 수의과대학
** 정순오 산부인과의원

金明哲 · *趙忠鎬 · **鄭淳五

-Abstract-

Effect of Isolation by Albumin Density Gradients on Head's Size of Bovine Sperm

Myung-Cheol Kim, Ph.D., Chung-Ho Jo*, Ph.D., Soon-O Chung**, Ph.D.

Institute of Agricultural Development, Yonsei University

*** College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

*** Chung's Clinic and Hospital*

In order to obtain high proportion of Y sperm the semen was laid over 6%, 10% and 20% bovine serum albumin.

Separated sperm were stained with quinacrine mustard in order to see F - body which could be seen in human Y sperm.

But we could't find F-body in the bull sperm. So sperm were compared with size of sperm head.

As a result of observation separated sperm was small in size of length and width of sperm head as compared with control sperm.

So it was found that the proportion of Y sperm showed a marked increase in separated layer.

Then the higher albumin density was, the higher the proportion of Y sperm which had smaller head and faster motility was.

But the higher albumin density was, the lower the recovery rate of sperm was.

So it was hard to separate Y sperm in oligospermia.

서론

1969년 Zech는 사람의 정액을 quinacrine mustard 색소로 염색하여 형광현미경하에서 관찰한 바 Y염색체는 밝고 흰 점 (fluorescent body, F - body) 을 나타낸다는 사실을 발견하였다.

그후 F-body의 관찰은 많은 연구자들에 의하여 이루어졌다 (Barlow 및 Vosa, 1970 ; Pearson 등, 1971 ; Sumner 등, 1971).

또한 Shettle(1960)은 사람의 정자에는 두 부가 크고 난원형인 X精자와 두부가 작고 원형인 Y精자의 두群이 있다고 보고하였으며, 山口 順(1982)은 사람의 경우 Y精자는 X精

자에 비해 최대횡경대 최대종경의 비가 크다고 보고한 바 있다.

Y정자는 X정자보다 운동성이 빠르다는 정자의 생리적인 성질 (Roberts, 1972) 을 이용하여 Ericsson 등 (1973) 은 사람의 정액을 점조도가 높은 bovine serum albumin 위에 층을 이루게 놓으면 Y정자가 원주의 바닥에 먼저 도달하며, 이 때에 원주의 바닥으로부터 회수된 정자는 85%가 Y정자라고 보고한 바 있다.

그러나 Evans 등 (1975) 은 bovine serum albumin 으로 정자를 분리한 결과 분리층에는 오히려 대조군에 비해 Y정자비율이 약간 감소되었다고 보고하였으며, Ross 등 (1975) 은 bovine serum albumin 으로 정자를 분리한 결과 분리층의 정자의 운동성 및 정상정자율은 크게 증가하였으나, Y정자 비율에는 변화가 없었다고 보고하였다.

그후 Leslie 및 Quinlivan (1980) 은 bovine serum albumin 으로 정자를 분리하여 Y정자비율을 75~80%로 증가시켰다고 보고하였으며, Quinlivan 등 (1982) 도 bovine serum albumin 으로 Y정자비율을 74%로 증가시켰다고 보고하였다.

또한 bovine serum albumin 대신 human serum albumin 을 사용하여 Broer 등 (1977), Ericsson 및 Glass (1977), Broer 및 Dauber (1978), Dmowski 등 (1979), Sherman 및 Dmowski (1982) 등은 고효력정자를 분리하였으며, Beernink 및 Ericsson (1981, 1982) 등은 음성정자분리가 가능하였다고 보고한 바 있다.

한편 소정자를 사용하여 Faust 등 (1976) 은 6% bovine serum albumin 으로, Wall 등 (1980) 은 10% bovine serum 으로 분리한 결과 운동성이 증가되었다고 하였으며, Illyes 등 (1980) 은 소정자를 6% bovine serum albumin 으로 분리한 후 분리된 정자를 1년간 냉동보존한 후 융해하여 인공수정에 사용하였던 결과 높은 수태율을 나타내었다고 보고하였다.

또한 鄭 (1984) 은 사람에서 10% bovine

serum albumin 을 사용하여 정자를 분리한 결과 운동성이 62%에서 82%로 증가하였으며 운동성정자회수율은 32%이었다고 하였다. 그리고 Ericsson 은 사람의 불임증치료를 위한 고효력정자의 분리에는 6% 및 10% bovine serum albumin 이 적합하고, Y정자분리에는 20% bovine serum albumin 이 적합하였다고 한 바 있다.

따라서 고효력정자를 분리하기 위한 bovine serum albumin 의 농도와 음성정자를 분리하기 위한 bovine serum albumin 농도의 차이는 결과적으로 수정율에도 어떠한 영향을 줄 수 있다고 사료된다.

그러나 저자들은 우선 20% bovine serum albumin 을 사용하여 우정액에서 수정에 적합한 정자수를 얻게된 결과 분리된 정자에서의 Y정자비율을 관찰하기 위하여 quinacrine mustard 로 염색하여 F-body 를 관찰하려고 시도하였으나 소의 정자에서는 F-body 가 관찰되지 않았으므로, Y정자의 비율을 정자두부크기의 계측으로 알아보려고 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin 으로서 분리한 분리층과 비분리층에서 두부크기를 관찰한 결과 의의있는 지견을 얻었기에 보고한다.

재 료 및 방 법

1. 공시정액

공시정액은 한우-사로레 1代雜種 種牡牛중 임상적소견과 임상병리학적인 검사에 의하여 건강하다고 인정된 3세의 종모우 5두로부터 人工鑿法에 의해 채취된 原精液을 사용하였다.

2. bovine serum albumin

25% bovine serum albumin (Sigma Co) 을 Tyrode 液으로 bovine serum albumin 농도가 각각 6%, 10% 및 20%가 되도록 희석하여 사용하였다.

3. Tyrode 液

이 실험에 사용한 Tyrode 液은 Wade (1977) 에 준하였다.

4. 6% bovine serum albumin을 사용한 Faust 방법

Tyrode 液을 사용하여 원정액 1.5 ml를 1:1로 희석하였고, 3000rpm으로 3분간 원심분리한 후, 상청액을 제거하고 Tyrode 液을 사용하여 3분간 원심분리한 후, 상청액을 제거하고 Tyrode 液을 사용하여 精子數가 ml當 100 × 10⁶ 이 되도록 희석하였다. 4개의 시험관 (13 × 125 mm)을 시험관 받침대에 수직으로 세워 놓고, 각 시험관에 6% bovine serum albumin을 6 ml씩 관벽을 따라 주입하였다. Tyrode 液으로 희석한 정자 (精子數 100 × 10⁶ ml) 2 ml를 시험관내 bovine serum albumin 위에 올려 놓고 1시간동안 실온에서 정치시켰다. 각 시험관의 상층액은 상층액끼리, 치층액은 하층액끼리 모아서 精子의 性狀들을 관찰하였다.

5. 10% bovine serum albumin을 사용한 Ericsson 방법

Tyrode 液을 사용하여 원정액 1.5 ml를 1:1로 희석하였고 3000 rpm으로 원심분리한 후, 상청액을 제거하고 Tyrode 液을 사용하여 精子數가 ml當 20 × 10⁶ 이 되도록 희석하였다. 80개의 시험관 (6 × 75 mm)을 시험관 받침대에 세워 놓고, 각 시험관에 10% bovine serum albumin을 1 ml씩 관벽을 따라 주입하였다.

Tyrode 液으로 희석한 정자 0.5 ml를 시험관내 bovine serum albumin 층 위에 올려 놓고 1시간동안 실온에서 정치시켰다. 각 시험관의 상층액은 상층액끼리, 하층액은 하층액끼리 모아서 精子의 성상을 관찰하였다.

6. 20% bovine serum albumin을 사용한 Ericsson 방법

Tyrode 液을 사용하여 원정액 1.5 ml를 1:1로 희석하였고, 3000 rpm으로 원심분리한 후, 상청액을 제거하고 Tyrode 液을 사용하여 精子數가 ml當 80 × 10⁶ 이 되도록 희석하였다. 20개의 시험관 (6 × 75 mm)을 시험관 받침대에 수

직으로 세워 놓고, 각 시험관에 6% bovine serum albumin을 1 ml씩 관벽을 따라 주입하였다. Tyrode 液으로 희석한 정자 0.5 ml를 시험관내 bovine serum albumin 층 위에 올려 놓고 1시간동안 실온에서 정치시켰다. 각 시험관의 상층액을 모아서 정자의 성상들을 관찰하고, 각 시험관의 하층액을 모아서 3000 rpm으로 원심분리한 후 상청액을 제거하고 Tyrode 液으로 정자수가 ml當 60 × 10⁶ 이 되도록 희석하였다. 각 시험관에 20% bovine serum albumin 0.5 ml와 12% bovine serum albumin 1 ml를 층을 이루게 놓고, 그 위에 희석된 정자 0.5 ml씩을 올려 놓고 1시간 동안 실온에서 정치시켰다. 그리고 각 시험관의 상층액을 제거하고, 30분후에 다시 중간층을 제거하고, 하층액은 하층액끼리 모아서 精子의 성상들을 관찰하였다.

본 항목의 대조군은 bovine serum albumin을 사용하지 않은 정액으로 하였다.

7. 精子性狀의 관찰 및 정자두부크기의 계측

정자성상의 관찰 :

총정자수, 운동성 정자수 및 운동성의 관찰은 Soresen 方法 (1979)에 준하였다.

정자두부크기의 계측 :

정액 한방울을 slide에 도말시킨 후, absolute ethyl alcohol로 고정하였으며, hematoxylin - eosin으로 염색한 다음, 1000배의 광학현미경하에서 사진촬영하여 micro-meter의 사진을 기준으로 caliper로 각 slide마다 50 ~ 100개의 정자의 두부를 계측하였다.

결 과

소정액중에서 Y精子比率을 증가시킬 수 있는지를 알기 위하여 bovine serum albumin을 각각 6%, 10% 및 20%로 만든 실험액을 사용하여 정자분리실험을 시도한 바, 각각

분리된 정자의 운동성, 회수율, 두부의 최대종경, 최대횡경 및 최대횡경 대 최대종경의 비율 관찰한 결과는 다음과 다음과 같다.

사용한 실험군의 총정자회수율이 다른 군에 비하여 현저하게 높았다 ($P < 0.01$).

1. 운동성 및 회수율

6%, 10% 및 20%의 농도가 다른 bovine serum albumin을 사용하여 원정액으로부터 분리된 정자의 운동성 및 회수율은 Table 1과 같다.

운동성정자 회수율 :

최초운동성별로 구분해서 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin으로 정자를 분리한 결과 분리된 정자의 운동성정자 회수율은 각각 평균 52.9 ± 6.83 , 43.8 ± 6.48 및 14.7 ± 2.40 으로서 6% bovine serum albumin을 사용한 실험군의 총정자 회수율이 다른 군에

Table 1. Motility and sperm recovery of raw bovine semen passed through bovine serum albumin. (mean + S.D.).

Initial motility (%)	Number of trials	Motility (%)			Total sperm recovery (%)			Motile sperm recovery (%)		
		6% BSA	10% BSA	20% BSA	6% BSA	10% BSA	20% BSA	6% BSA	10% BSA	20% BSA
11-20	3	69.4 +8.32	73.1 +7.56	93.7 +4.82	11.9 +3.54	9.4 +2.87	2.3 +0.73	55.0 +6.57	45.8 +5.24	14.9 +1.98
21-30	6	80.7 +6.52	84.6 +6.38	93.8 +3.76	15.7 +4.36	11.9 +3.93	4.1 +1.40	50.6 +7.89	40.3 +7.03	15.2 +2.85
31-40	6	85.2 4.07	88.5 +5.09	95.1 +3.58	22.0 +2.85	17.4 +3.85	5.6 +1.32	53.5 +6.40	43.9 +6.32	15.1 +2.54
41-50	5	88.5 +3.53	90.7 +4.36	96.7 +2.06	28.9 +3.67	23.1 +4.52	6.8 +1.74	56.8 +6.26	46.5 +6.51	14.5 +2.71
51-60	5	91.7 +2.41	94.3 +3.71	98.3 +1.01	29.7 +3.91	25.5 +4.71	7.7 +1.86	49.6 +6.81	43.8 +7.31	13.8 +2.31
Total	25	84.2 +8.21	87.3 +8.03	95.6** +3.40	22.2** +7.51	17.9 +7.06	5.5 +2.24	52.9** +6.83	43.8 +6.48	14.7 +2.40

BSA : Bovine serum albumin

** : P 0.01

운동성 :

최초운동성별로 구분해서 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin으로 정자를 분리한 결과 분리된 정자의 운동성은 각각 평균 84.2 ± 8.21 , 87.3 ± 8.03 및 95.6 ± 3.40 %로서 3가지 실험군의 정자운동성은 모두 대조군에 비해 현저히 높았으며, 분리실험군중에서는 20% bovine serum albumin에 의한 정자가 가장 높은 성적을 나타내었다 ($P < 0.01$).

총정자 회수율 :

최초운동성별로 구분해서 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin으로 정자를 분리한 결과 분리된 정자의 총정자 회수율은 각각 평균 22.2 ± 7.51 , 17.9 ± 7.06 및 5.5 ± 2.24 로서 6% bovine serum albumin을

비하여 현저하게 높았다 ($P < 0.01$).

2. 정자두부의 최대종경

소정자를 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin을 사용하여 활동성이 높은 정자를 분리한 후 정자두부의 최대종경을 측정한 결과는 각각 8.48 ± 0.29 , 8.44 ± 0.43 및 8.28 ± 0.42 로서 분리전인 대조군의 8.59 ± 0.38 에 비해 모두 작았으며 분리실험군중에서는 20% bovine serum albumin에 의해 분리된 정자두부의 최대종경이 가장 작았다 ($P < 0.05$).

한편 상층의 정자는 최대종경이 모두 대조군에 비해 컸다 (Table 2).

Table 2. Comparison of head's length of bovine spermatozoa during BSA isolation.
(n = 6; mean \pm S.D.).

	Upper layer	BSA layer	Control
6% BSA	8.60 ± 0.37 (7.65 - 9.55)	8.48* ± 0.29 (7.22 - 9.43)	
10% BSA	8.61 ± 0.35 (7.75 - 9.60)	8.44 ± 0.43 (7.56 - 9.25)	
20% BSA	8.69 ± 0.36 (7.73 - 9.58)	8.28 ± 0.42 (7.45 - 9.15)	
Control			8.59 ± 0.38 (7.65 - 9.65)

BSA : Bovine Serum Albumin

* : P 0.05

() : range

Table 3. Comparison of head's width on bovine spermatozoa during BSA isolation.
(n = 6 ; mean \pm S.D.).

	Upper layer	BSA layer	Control
6% BSA	4.20 ± 0.24 (3.67 - 4.92)	4.02* ± 0.22 (3.35 - 4.50)	
10% BSA	4.18 ± 0.23 (3.65 - 4.95)	3.97 ± 0.21 (3.32 - 4.45)	
20% BSA	4.20 ± 0.25 (3.38 - 4.80)	3.82 ± 0.24 (3.20 - 4.43)	
Control			4.13 ± 0.24 (3.50 - 4.90)

BSA : Bovine Serum Albumin

* : P 0.05

() : range

3. 정자두부의 최대횡경

6%, 10% 및 20% bovine serum albumin을 사용하여 분리된 소정자두부의 최대 횡경은 각각 4.02 ± 0.22 , 3.97 ± 0.21 및 3.82 ± 0.24 로서 분리군인 대조군의 4.13 ± 0.24 에 비해 모두 작았으며, 분리실험군 중에서는 20% bovine serum albumin에 의한 정자가 가장 작았다 ($P < 0.05$).

한편 상층의 정자는 최대횡경이 모두 대조군에 비해 컸다 (Table 3).

4. 정자두부의 최대횡경 대 최대종경의 비

소정자를 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin으로 분리한 후 정자두부의 최대횡경 대 최대종경의 비를 산출한 결과 분리군은 각각 2.11 ± 0.10 , 2.13 ± 0.10 및 2.17 ± 0.14 로서 분리전인 대조군의 $2.08 \pm$

0.11 보다 높았으며, 분리실험군중에서는 20% bovine serum albumin군이 가장 높았다 ($P < 0.05$).

한편 상층의 정자는 최대횡경 대 최대종경의 비가 대조군에 비해 모두 낮았다 (Table 4).

고 찰

Ericsson 등 (1973)은 사람의 原精液을 사용하여 6%, 10% 및 20%의 농도를 달리한 bovine serum albumin으로 정액을 처리한 결과 20%에서 정자운동성이 다른 처리군에 비하여 가장 높았으며, 정자회수율은 6%일 때 높았다고 보고하였다. 그러나 소에 대한 고 활력정자분리를 위하여 6% bovine serum albumin (Faust 등, 1976; Illyes 등, 1980), 10% bovine serum albumin (Wall 등, 1980; White 등, 1982)을 사용한 보문에는 접한 바 있었으나, 20% bovine serum albumin을 사용한 보고는 아직 접한 바 없

Table 4. Comparison of ratio between head's length and width on bovine spermatozoa during BSA isolation. (n = 6; mean \pm S.D.).

	Upper layer	BSA layer	Control
6% BSA	2.05 ± 0.12 (1.72 - 2.44)	2.11 ± 0.10 (1.94 - 2.40)	
10% BSA	2.06 ± 0.12 (1.82 - 2.38)	2.13 ± 0.10 (1.95 - 2.43)	
20% BSA	2.07 ± 0.12 (1.83 - 2.41)	2.17* ± 0.14 (1.85 - 2.47)	
Control			2.08 ± 0.11 (1.83 - 2.39)

BSA : Bovine Serum Albumin

* : P 0.05

() : range

었다.

6%, 10% 및 20% bovine serum albumin을 사용하여 고효율정자분리를 시도한 본 실험의 결과, 각 처리군의 운동성은 각각 평균 84.2 ± 8.21 , 87.3 ± 8.03 , 95.6 ± 3.40 으로서 20%일 때 가장 높은 성적을 나타냄 으로서 사람의 원정액을 사용하여 얻은 Ericsson 등 (1973)의 결과와 유사한 성적이었다. 운동성정자회수율은 각처리군에 있어서 각각 52.9 ± 6.83 , 43.8 ± 6.48 및 14.7 ± 2.40 %로서 6%일 때 가장 높았으며, 20% 일 때는 가장 낮았다. 따라서 20% bovine serum albumin을 사용한 분리는 정자운동성으 높으나, 회수율이 낮으므로 정액량, 농도 및 정자운동성이 좋은 경우에만 사용되도록 제한하여야 할 것으로 사료된다.

사람의 정자는 quinacrine 색소로 염색할 때 Y정자는 형광물질을 발하는 F-body가 있으므로 Y정자를 구별할 수 있다 (Zech, 1969; Barlow 및 Vosa, 1970; Pearson 등, 1971; Pearson, 1972).

그러나 F-body는 포유류의 경우 인간, 침판치 및 고릴라에서만 나타나며 이를 제외한 모든 다른 種에서는 나타나지 않는다고 한다 (Pearson 등, 1971).

저자들은 소정자에서의 F-body 검출을 시도하여 보았으나 소에서는 F-body가 검출되지 않는다는 사실을 알았다.

본 실험에서 6%, 10% 및 20% bovine serum albumin을 통하여 분리된 정자는 최대횡경과 최대종경이 각각 대조군 및 상층의 정자에 비하여 작았는데 이것은 Y정자가 X정자에 비하여 두부의 크기가 작다는 사실 (Shettle, 1960a, 1960b, 1960c; Glass 및 Ericsson, 1982)에 비추어 볼 때에 분리된 층에는 Y정자가 많은 것을 알 수 있었다.

또한 분리군에 있어서는 albumin의 농도가 높을수록 최대횡경과 최대종경이 각각 작았던 결과로 보아서 이것은 albumin의 농도가 높을수록 분리층에는 Y정자의 비율이 높아졌다는 것을 알 수 있었다.

본 실험에서 bovine serum albumin 으로

분리된 정자는 최대횡경 대 최대종경의 비가 대조군 및 상층에 비하여 컸으며 분리군 중에서는 bovine serum albumin의 농도가 높을수록 최대횡경 대 최대종경의 비가 컸던 사실은 山口 順 (1982)이 보고한 사람의 경우 Y정자가 최대횡경 대 최대종경의 비가 X정자에 비하여 크다는 보고와 일치하는 성적이었다.

결 론

1. 소의 정액에서 Y정자의 분리를 시도하기 위하여 6%, 10% 및 20%의 bovine serum albumin을 사용하여 정액을 분리한 후 quinacrine 염색으로 F-body를 관찰하려고 하였으나 F-body의 관찰은 되지 않았다.

2. 그러므로 정자두부의 크기로 비교한 결과 분리된 층에서의 정자의 두부 크기는 작았다.

3. bovine serum albumin의 농도가 높을수록 크기가 작고 운동성이 빠른 Y精자가 많이 나왔으나 회수율은 적었다. 그러므로 정자감소증에서는 Y精자의 분리가 어려운 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Barlow, P. and Vosa, C.G.: *The Y chromosome in human spermatozoa. Nature*, 226: 961, 1970.
2. Beernink, F.J. and Ericsson, R.J.: *Male sex preselection through sperm isolation. Fert. Steril.*, 36: 421, abstr., 1981.
3. Beernink, F.J. and Ericsson, R.J.: *Male sex preselection through sperm isolation. Fert. Steril.*, 38: 493, 1982.
4. Broer, K.H. and Dauber, U.: *A filtering method for cleaning up spermatozoa in cases of asthenospermia. Int. J. Fert.*, 23: 234, 1978.
5. Broer, K.H., Dauber, U. and Kaiser, R.: *A filtering method for cleaning up spermatozoa in cases of asthenospermia. Fert.*

- Steril.*, 28: 335, abstr., 1977.
6. Chung, S.O.: *Unpublished data*, 1984.
 7. Dmowski, W.P., Gaynor, L., Lawrence, M., Rao, R. and Scommegna, A.: *AIH with oligospermic semen separated on albumin columns. Fert. Steril.*, 31:58, 1979.
 8. Ericsson, R.J. and Glass, R.H.: *Isolation of progressively motile sperm from infertile men. Fert. Steril.*, 28: 330, abstr., 1977.
 9. Ericsson, R.J., Langevin, C.N. and Nishino, M.: *Isolation of fractions rich in human Y sperm. Nature*, 246: 421, 1973.
 10. Evans, J.M., Douglas, T.A. and Renton, J.P.: *An attempt to separate fractions rich in human Y sperm. Nature*, 253: 352, 1975.
 11. 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.*, 43: 283, abstr., 1976.
 12. Glass, R.H. and Ericsson, R.J.: *Getting pregnant in the 1980s: New advances in infertility treatment and sex preselection. Univ. California Press, Berkeley*, 113, 1982.
 13. 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*, 51:38, abstr., 1980.
 14. Leslie, W. and Quinlivan, G.: *Separation of X and Y spermatozoa. Fert. Steril.*, 34: 307, abstr., 1980.
 15. Pearson, P.: *The use of new staining techniques for human chromosome identification. J. Medical Genetics*, 9: 264, 1972.
 16. Pearson, P.L., Bobrow, M., Vosa, C.G. and Barlow, P.W.: *Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes. Nature*, 231: 326, 1971.
 17. Quinlivan, W.L.G., Preciado, K., Long, T.L. and Sullivan, H.: *Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and Sephadex chromatography. Fert. Steril.*, 37: 104, 1982.
 18. Roberts, A.M.: *Gravitational separation of X and Y spermatozoa. Nature*, 238: 223, 1972.
 19. Ross, A., Robinson, J.A. and Evans, H.J.: *Failure to confirm separation of X and Y bearing human sperm using BSA gradients. Nature*, 253: 354, 1975.
 20. Sherman, J.K. and Dmowski, W.P.: *Effect of isolation by albumin density gradients on ultrastructure of human spermatozoa. Fert. Steril.*, 38: 460, 1982.
 21. Shettles, L.B.: *Nuclear morphology of human spermatozoa. Nature (London)*, 186: 648, 1960a.
 22. Shettles, L.B.: *X and Y spermatozoa. Nature (London)*, 187: 254, 1960b.
 23. Shettles, L.B.: *Nuclear structure of human spermatozoa. Nature (London)*, 188: 918, 1960c.
 24. Sorensen, A.M. Jr.: *A laboratory manual for animal reproduction. 4th. American press, Boston*, 53, 1979.
 25. Sumner, A.T., Robinson, J.A. and Evans, H.J.: *Distinguishing between XY and YY-bearing human spermatozoa by fluorescence and DNA content. Nature New Biology*, 229: 231, 1971.
 26. Wade, A.: *Martindale the extra pharmacopocia. 27th ed. Pharmaceutical press, London*, 1452, 1977.
 27. 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*, 22: 94, abstr., 1980.
 28. 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. Meeting*, 688: 400, abstr., 1982.
 29. Yamaguchi, J.: *Studies on the separation of human X and Y bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. Keio University Medicine*, 59(6): 769, 1982.
 30. Zech, L.: *Investigation of metaphase chromosome with DNA-binding fluorochromes. Exp. Cell Res.*, 58: 463, 1969.