

乳牛의 改良 및 繁殖效率 增進에 관한 研究

I. 햄스터 卵자를 利用한 乳牛精자의 受精 能力 評價에 관한 研究

鄭英彩 · 金昌根 · 尹鍾澤 · 方明杰

中央大學校 遺傳工學研究所

Studies on the Improvement of Performance and Reproductive Efficiency in Dairy Cattle

I. The Assesment on the Fertilizing Ability of Bull Sperm by Zona Free Ova

Chung, Y. C, C. K. Kim, J. T. Yoon and M. G. Pang

Institute of Genetic Engineering, Chung-Ang University,
Seoul, Korea

Summary

This experiment was undertaken to examine the effects of HIS treatment on the motility and acrosome reaction of frozen bovine spermatozoa and to test their abilities to interact with zona-free hamster eggs in vitro. Also, in vitro results were compared with those of bull's fertility in AI.

The frozen semen from four Holstein bulls were exposed to HIS-DM for 5 minutes after thawing and then preincubated for 60 minutes in DM prior to insemination. The hamster eggs were mounted, fixed and stained 6 hours after exposure to bovine spermatozoa and examined under a phase-contrast microscope.

1. The sperm motility expressed as a motility index dropped significantly from 60-75 to 12-24 after exposure to HIS-DM, but increased in 32 to 41 at insemination. Bull C showed a low motility index than those of the other bulls. The percentage of acrosome reaction by staining procedure were increased by HIS-DM treatment but did not change during 7 hours incubation period in DM.

2. The overall percentage of hamster eggs interacting with bull spermatozoa was 56.3%, 58.3%, 66.6% and 70.0%, respectively. Although there was no significant difference among bulls in the penetration rate of spermatozoa into hamster eggs, high proportions of eggs interacted with spermatozoa from Bull C and D than those from Bull A and B.

3. The conception rates (60-90 day RP) resulting from AI were 62.5%, 67.5% and 70.9% for Bull A, B and C, respectively. These results were in good agreement with the invitro results that the proportions of bull sperm-egg interaction were greater for Bull C than for Bull A and B.

II. 研究史

I. 緒 論

家畜의 生産性을 높이기 위하여는 能力이 우수한 家畜으로 改良하는 것이 필요하며, 이를 위하여 지금까지는 우수한 能力을 가진 種牡畜의 精液에 의한 授精方法으로 改良繁殖하여 왔다.

한편 種牡畜의 選拔評價는 血統, 精子數, 形態, 運動性 및 畸型 등 性狀으로 判定하였다.

그러나 이와같은 評價方法은 精子의 受精能力을 豫見할 수는 있으나 그 種牡畜 個體의 受精能力을 評價하는 指標로 삼는다는 受胎率과 比較하였을 때 어려움이 많다는 것이 최근의 견해이다.

따라서 種牡畜의 受精能力을 정확히 評價하기 위하여는 同種의 卵子에 精子를 授精시켜 卵子內에 浸入된 精子와 卵子의 活性化를 檢討하는 것이 直接的인 受精能力評價 方法이다.

그러나 動物의 種에 따라서는 成熟卵子를 얻기가 어렵고 많은 施設과 막대한 비용이 요구되기 때문에 많은 難點이 있다.

近年에 이르러 hamster 卵子의 透明帶를 除去하고 受精能力을 獲得한 異種精子를 結合시키면 受精의 種特異性이 상실되어 精子의 浸入을 받아 卵子內에서 活性化가 일어난다는 事實이 guinea pig(Yanagimachi, 1972) 에서 밝혀짐에 따라 牡畜의 受精能力을 評價할 수 있는 可能性이 提示되어 精子의 受精能力得의 間接的인 檢定과 受精能力 評價手段 으로 透明帶 除去 hamster 卵子를 利用하게 되었다.

그러나 우리나라에서는 아직까지 人工受精에 利用되고 있는 種牡畜의 選拔을 家畜의 血統, 外貌審査, 精液의 性狀 檢査만으로 결정하는 實情이다.

이에 本 研究 에서는 透明帶除去 hamster 卵子를 利用한 種牡畜의 選拔 可能性을 確認하고 現在 血統, 外貌審査 또는 精液性狀 등으로 選拔導入되어 乳牛種牡牛로 사용되고 있는 乳牛精液의 受精能力을 評價하기 위하여 4頭의 乳牛 種牡牛를 대상으로 精液의 性狀과 透明帶除去 hamster 卵子에의 精子의 浸入과 卵子의 活性化를 實驗에 의하여 評價하고 同一한 精液으로 각 農家에 人工授精한 후 3頭의 種牡乳牛에 대한 受胎率을 調査하여 實驗室에서의 成績과 比較 檢討하였다.

Yanagimachi와 Noda (1970) 는 透明帶除去 hamster 卵子와 受精能 獲得精子는 곧 融合하지만, 受精能을 獲得하지 못한 精子는 절대로 浸入하지 못한다고 하였고, Niwa와 Chang(1974 a, b)은 흰쥐에서 精子의 受精能獲得은 精巢上體精子를 稀釋하여 前培養하여야 이리진다고 하였으며, 1975년에는 精子의 受精能獲得은 前 培養時間에 따라 점차 이루어져 6~7時間 後면 透明帶除去 hamster 卵子에 100% 浸入한다고 報告하였다. Hanada 등(1972)은 透明帶除去 hamster 卵子에 흰쥐精子를 소의 卵胞液 또는 흰쥐 血清에 1~12時間 前 培養하였을 때 8.7~26%의 浸入率을 보였다고 한다.

또 Toyoda와 Chang (1968) 은 trypsin 으로 透明帶를 除去한 흰쥐 卵子에는 受精能獲得精子나 未受精能獲得精子 모두가 浸入 가능하다고 하였다.

Hanada 등(1972) 은 마우스에서 排卵된 卵子를 hyaluronidase 와 trypsin 또는 pronase 로 처리하여 顆粒膜細胞와 透明帶를 除去하면 흰쥐와 hamster 精子에 의하여 浸入되는 比率이 1.3~5.0%에 불과 하였으나, 透明帶除去 흰쥐卵子와 hamster 卵子에는 마우스精子가 각각 95%와 73%가 浸入되어 培養時間에 따라 雄性前核으로 發達하였다고 하며 Pavolk와 McLaren (1972)은 마우스卵子의 體外受精에서 卵丘細胞와 透明帶의 역할을 究明 하면서 마우스精子의 受精能獲得은 단지 透明帶를 透入하는데 필요하며 卵黃內에 浸入하기 위한 것은 아니라고 하였다.

Imai 등 (1977) 은 돼지精子는 m-KRB에 의하여 前培養하더라도 透明帶除去 hamster 卵子에 浸入하기는 어렵으나 돼지의 生殖器導內에서 前培養하면 10~30%가 浸入된다고 하였고, 이들은 다시 成熟未經産 돼지子宮과 卵管을 적출하여 돼지卵子를 前培養하여 透明帶除去 hamster 卵子에 授精시킨 결과 子宮에서 4.0~4.5시간 前培養 하는 것이 浸入率이 높았다고 報告하였다. (Imai 등 1979). Iri-tani 등 (1978) 은 이러한 돼지精子는 體外에서 培養 成熟된 卵胞卵을 浸入할 수 있다고 하였다. Hanada 등 (1981) 은 돼지精子를 成熟한 암토끼로부터 적출한 子宮內에서 일정시간 培養한 것과 imidazole을 添加한 것을 透明帶除去 hamster 卵子에 授精시킨 결과 子宮內에서 3時間 前培養 한 것은 浸入率이

높았으나 imidazole의 添加 効果는 認定되지 않았다고 하였다. Smith 등(1983)은 未受精能獲得精子에 ionophore-A 23187을 添加했을 경우 透明帶除去 hamster 卵子에의 精子의 浸入率이 13~33%을 나타냈다고 한다.

Kim 등(1980)은 山羊 精子를 암돼지로부터 적출한 子宮과 卵管内에서 5.0~5.5 時間 培養하여 透明帶除去 hamster 卵子에 授精시켰을 때 浸入率은 授精後 1 時間에 子宮내에 培養한 것은 17.0%였고, 卵管内에서 培養한 것은 0.0%였으며, 2 時間 後에는 각각 59.0%와 58.0%였고, 3~5 時間 後에는 각각 52.0~63.0%와 38.0~76.0% 였다고 한다. Kato 등(1984)은 적출한 hamster 子宮내에 前培養하여 授精시켰을 때의 透明帶除去 hamster 卵子에의 浸入率은 60.0~100.0%였다고 한다.

Hanada 등(1981)은 소 精子를 成熟한 암토끼로부터 적출한 子宮내에서 일정시간 培養하거나 imidazole을 添加하여 培養하였을 때 透明帶除去 hamster 卵子에 浸入되어 imidazole의 效果를 認定하였으며 적출한 토끼 子宮내에서 5 時間 前培養하였을 때 40~87% 浸入率을 나타냈다고 한다. Bousquet와 Brackett(1981)은 人工授精에서 受胎率이 확인된 種牡牛 2 頭의 동결 精液으로 HIS-DM을 처리하여 透明帶除去 hamster 卵子에 授精시킨 결과 한마리는 80%, 다른한마리는 63%의 前核形成을 보였다고 하며, 1982년에는 같은 方法으로 94.5%와 68.2%의 浸入率을 나타냈다고 하였다.

또한 Brackett 등(1982)은 BWB 培養液에서 18~26 時間 前培養하여 透明帶除去 hamster 卵子에의 浸入率과 雄性前核 形成과의 比較로 精子의 受精能力을 評價하는 可能性을 보고한 바 있다.

Graham과 Foote(1985)는 牛精子의 受精能力檢査를 위하여 phospholipid liposome 으로 처리한 精子가 7 分만에 尖體反應을 完成하여 透明帶除去 hamster 卵子和 受精反應이 進行되어 精子浸入이 이뤄지고 精子頭陪의 膨大가 이뤄졌다고 하며 精子로 dilauoyl phosphatidylcholine(PC-12) liposomes을 6.3 μ mol 농도로 하였을 때 透明帶除去 hamster 卵子에 100% 浸入하였다고 報告하여 이 方法에 의한 牛精子의 受精能力 評價의 可能性을 提示하였다. 또 Yanagimachi(1972)는 사람의 精子에 대한 實驗에서 精子의 前培養時間과 授精後의 培養時間의

增加에 따라 精子의 浸入率이 높아진다고 하여 透明帶除去 hamster 卵子로 사람精子의 受精能力을 評價할 수 있는 可能性을 提示하였다.

Guelman 등(1981)은 不妊男性 36명과 受胎가 증명된 9명의 精子로 透明帶除去 hamster 卵子에의 浸入을 比較檢討하여 臨床的 適用에의 可能性을 示唆하였다.

Wolf 등(1983)은 體外授精 및 受精卵 移植에 參與하는 24명의 精子로 27회에 걸친 實驗에서 단 2 건만이 否定的인 結果를 나타내었을 뿐으로, 사람에 있어서 體外受精에 이용되는 精子의 受精能力과 透明帶除去 hamster 卵자를 利用한 受精能力 評價間에는 높은 相關關係가 있는 것으로 報告하였다. 또 Chan 등(1983)은 17 β -E₂ 처리는 不妊男性 精子가 透明帶除去 hamster 卵子에의 浸入率을 增加시키는 것으로 보아 사람의 體外受精時에도 受精能力을 增加시킬 수 있을 것으로 보고하였다.

Ⅲ. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 供試動物 및 精液

本 試驗에 採卵을 위하여 供試된 動物은 本大學 實驗動物 飼育室에서 飼育되고 있는 10~20 週令(體重 100~150g)된 Golden hamster (Mesocricetus auratus) 암컷으로 點燈時間은 14 時間(午前 7시부터 午後 9시까지), 消燈時間은 10 時間(午後 9시부터 午前 7시까지)으로 하였으며 飼料는 마우스類用 펠렛飼料를 사용하였다.

供試精液은 현재 우리나라에서 人工授精에 利用되고 있는 乳牛 種牡牛 4 頭를 임의 선발하여 현장에서 使用하고 있는 것과 같은 凍結精液을 供試하였다.

2) 培養液

培養液은 Brackett 등(1975)이 사용한 defined medium(DM)과 high ionic strength(HIS) DM으로 그 組成은 表 1 과 같다.

DM은 pH가 7.8, 滲透壓이 300 mOsm/kg이며, HIS-DM은 DM에 NaCl을 添加하여 滲透壓이 380 mOsm/kg로 調整하였으며 38°C의 恒溫室에서 5% CO₂, 95% air의 條件下에서 15분 이상 平衡시켜 使用하였다.

培養液은 3×증류수를 사용하였고 抗生物質(Na-Penicillin 50IU/ml)을 添加하여 제조한 후에 0.22μ millipore filter (Gelman Science, Inc. U.S.A)로 濾過하였으며 사용할 때까지 4℃에 보관하였다.

2. 實驗方法

1) 精液의 處理

液體室素 (-196℃)에 保管되어 있는 0.5 ml straw의 凍結精液을 신속히 꺼내어 38℃ 恒溫水槽에서 30秒동안 融解한 다음 恒溫室에서 實驗 사용하였다.

Table 1. Composition of DM and HIS-DM

Components	Concentration
Stock solution	mM
NaCl	112.00
KCl	4.02
CaCl ₂	2.25
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.52
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.83
Penicillin G	50 IU/ml
Defined medium (DM)	mg/100ml stock solution
D-glucose	250.00
BSA fatty acid free	300.00
NaHCO ₃	310.00
Na-Pyruvate	13.75
HIS DM	
34mg NaCl/10ml of DM, pH 7.8, 380 mOsm/Kg	

100μl 정도는 精子의 運動性, 生存率 및 尖體를 評價하는데 사용하였다. 融解된 精液은 4.5 ml의 HIS-DM을 添加하여 5分間 38℃ 恒溫室에서 培養한 다음 1,500 rpm으로 5分間 遠心分離한 후 上層液을 버리고 DM으로 최종 1 ml가 되도록 稀釋하였다. 이 중에서 200μl은 精子數, 運動性, 生存率, 및 尖體를 다시 調査하는데 使用하고 나머지 800μl은 38℃ 恒溫室에서 60分間 前培養하였다.

2) 精液의 性狀檢査

精液의 性狀은 凍結精液을 融解하였을 때, HIS-DM으로 處理하였을 때, 그리고 hamster 卵子에 授精 시킬 때에 각각 실시하였다.

(1) 精子의 數

精子의 數 측 농도는 10% formol-saline 으로서 精子를 固定하여 Neubauer chamber 를 이용 하여 算定하였다.

(2) 精子의 生存率과 運動性

38℃의 恒溫室內에서 顯微鏡에 장치된 精液 性狀檢査板을 이용하여 150×하에서 精子의 生存率과 運動性을 檢査하였다.

3) 尖體檢査

凍結精液을 融解한 후 精液 5μl 에 2.9% sodium citrate dihydrate 50μl 을 混合하고 1分間 38℃에 定置한 후 1,500 rpm으로 5分間 遠心分離하여 slide에 塗抹乾燥하였으며, 處理精子는 각 處理마다 精液 5μl 에 染色液 5μl 을 添加하여 38℃에서 1分間 定置한 후에 塗抹乾燥하였다.

尖體의 評價는 處理當 2개의 塗抹標本을 만들어 Wells-Awa stain(wells 등, 1970) 으로 染色한 후 1,000×顯微鏡下에서 100個의 精子를 算定하여 正常尖體精子 및 尖體消失精子로 分類하여 受精能獲得을 評價하고 百分率로 表示하였다.

4) 卵자의 準備

(1) 過排卵誘起 및 採卵

成熟(10~12週, 體重100~150g)된 암 hamster에 午後 6時에 首當 PMSG 25IU를 1回 腹腔內에 注射하고, 48時間後에 同一한 方法으로 HCG 25IU를 注射하였다.

卵자의 採取는 HCG 投擧後 14 時間에 頸椎逸脫로 hamster를 희생시켜 開腹後 卵管을 分離한 다음 난관팽대부로 부터 채란하였다.

(2) 透明帶의 除去

卵자와 함께 採取된 卵丘細胞塊는 實體顯微下에서 觀察하면서 hyaluronidase(275 NF unit/ml; Type I: Sigma Chemical Co.)로 약 5分間 處理하여 卵자주위의 顆粒膜細胞를 除去하고 新鮮한 培養液으로 3回 反復 洗滌한 後 trypsin(10,000 BAEE unit/ml; Type III: Sigma Chemical Co.)溶液에 數分間 露出示킨 後 實體顯微鏡下에서 透明帶의 消失狀態를 觀察하면서 透明帶가 軟化, 거의 消失될 때 新鮮한 培養液에 옮겨 3回 洗滌하여 透明帶를 除去하였다.

5) 體外受精

透明帶가 除去된 hamster 卵자를 培養접시(Falcon plastics, #1006, U.S.A)에 培養液 0.4 ml을 넣어 滴을 만들고 여기에 卵자를 5~10個씩 넣고 $1 \sim 2 \times 10^6$ 精子가 浮遊되도록 精液을 0.05ml點滴한 다음에그위에 paraffin油를 덮어서 38°C, 5% CO₂, 95%air 條件下에서 6時間 培養시켰다. 이때 사용된 paraffin oil은 150°C에서 40分間 滅菌한 다음 사용하기 전에 38°C, 5% CO₂, 95%air 條件下에서 15分 이상 平衡시켜 사용하였다.

6) 卵자內 精子浸入 및 活性化檢査

6時間 培養된 卵자는 新鮮한 培養液으로 2回 洗滌하여 卵자 表面에 弱하게 부착되어 있는 精子를 除去하고 slide glass 위에 培養液과 함께 卵자를 놓고 cover glass에 vaseline-paraffin混合液을 발라서 덮은 다음 acetic alcohol 混合液으로 30分間 固定하고 0.25% acetic lacmoid로 30分間 染色한 다음 氷醋酸으로 洗滌한 後 位相差顯微鏡下에서 精子의 浸入, 卵黃內 精子頭部の 膨大, 雄性前核 形成卵자로 區分하여 受精을 判定하였으며 未受精卵이 活性化되어 單位生殖하는 경우가 있으므로 精子尾部의 同伴與否를 확인하여 受精의 증거로 삼았다.

7) 種牡牛의 受胎率 調查

供試된 4頭의 乳牛 種牡牛의 精液으로 각 農家 牧場에 人工授精한 後 受胎率을 調查하기 위하여 全國의으로 精液을 供給 人工授精한 다음 2.0~3.0 個月 後에 現地踏査, 直腸檢査(RP)에 의하여 妊娠 如否를 判定하였으며 그 結果를 實驗室에서의 成績과 比較檢討하였다.

IV. 實驗成績 및 考察

1. HIS-DM 處理에 따른 精子活力과 尖體反應 變化

현재 AI用으로 활용되고 있는 4頭의 乳牛種牡牛 동결정액을 응해시켜 HIS-DM으로 회석후 5分間培養에서의 정자의 活力指數를 비교한 結果는 表 2와 같다.

精液融解 직후의 活力指數는 63~76이던 것이 HIS-DM 處理後 5分에서 ABD 3頭의 種牡牛에서는 22~24로 떨어졌고, 種牡牛C는 12까지 저하되었다. 그러나 後후 원심분리로 HIS-DM을 제거하고 DM으로 회석하여 1시간동안 38°C에서 前培養했을 때도 種牡牛C에서 다소 낮기는 하나, ABD 種牡牛에서는 38~41로 HIS-DM처리후보다 크게 向上되었다. 그리고 卵자培養液에 精子注入後 6시간까지의 시간별 活力指數의 變化를 보면 4頭 種牡牛에서 모두 精子注入時보다 다소 낮아지기는 하였으나 25~35로 유지됨을 알 수 있었다.

이상의 結果는 Bousquet와 Brackett(1982)이 乳牛凍結精液을 HIS-DM으로 처리후 운동성을 가진 精子中 약 20%가 죽는다고 보고한 結果와 비교할 때 정도의 차이는 있었으나 HIS-DM처리가 精子活力의 저하원인이 됨을 확인할 수 있었다. 그리고 6時間 배양동안의 活力變化도 그들의 結果와 거의 유사하였다.

특히 種牡牛C에서 HIS-DM처리 직후 精子活力指數가 크게 저하되었다가 後후 회복되는 것으로 보아 HIS-DM에 대한 反應이 다른 3頭의 種牡牛보다 더 민감한 것 같았다.

表 3은 HIS-DM處理에 따른 尖體反應과 後후 DM에서 7시간 培養에 따른 尖體反應의 變化를 染色方法으로 조사한 結果이다. 응해 후 尖體가 소실된 精子比率이 平均 17% 이던 것이 HIS-DM處理

Table 2. Sperm motility index of frozen bull semen after HIS treatment and 1 h-preincubation and during 6 h-incubation at 38°C.

Frozen semen	After thawing	After HIS	1 h-preincubation	6h-incubation after insemination		
				2 h	4 h	6 h
Bull A	76.3±4.8*	23.8±3.7	38.8±4.8	38.8±1.3	34.4±2.1	35.4±2.4
B	73.8±2.5	22.3±2.0	41.5±7.5	40.0±7.0	37.5±2.9	33.2±5.6
C	66.3±4.8	12.1±2.8	31.7±1.9	27.8±2.6	27.6±2.6	25.0±3.4
D	63.1±4.7	21.7±7.0	37.5±2.9	34.9±6.5	32.5±3.8	29.9±2.9

* Mean ± standard deviation.

Table 3. Percentage acrosome reaction of bull spermatozoa after HIS treatment and during incubation at 38°C.

Frozen semen	After thawing	After HIS	1h-preincubation (at insemination)	6h-incubation after insemination		
				2 h	4 h	6 h
Bull A	19*	26	23	21	27	32
B	13	28	24	30	24	23
C	20	24	28	32	33	29
D	16	27	31	32	33	33
Mean	17	26	27	29	29	29

* ; Percentage of acrosome-reacted sperm was determined by staining procedure.

후 26%로 증가되었고 이후 DM에서는 배양 7시간 까지 변화가 없었다. 앞에서 언급된 精子活力指數와 尖體反應率間에는 서로 반대되는 경향을 보여주었다.

HIS-DM處理後 活力指數가 저하되는 원인에 대하여 Bousquet와 Brackett(1981, 1982)는 HIS-DM 처리후 正常尖體를 가진 精子의 감소와 관련이 있다고 보고한 바 있다. 그러나 Foote 등(1985)은 牛 精子의 in vitro 수정능획득을 일으키기 위하여 liposome을 처리한 실험에서 處理後 15分以内に 90% 이상의 정자에서 尖體가 소실되고 반면에 精子活力이 급속히 低下됨을 보고하였는데 역시 HIS-DM 처리 후의 活力低下는 尖體變化와 관련이 있음을 추측할 수 있었다.

2. 透明滯除去 햄스터卵子内 精子侵入

HIS-DM處理後 1시간 동안 DM에서 前培養한 精子를 透明滯除去 햄스터卵子培養液에 주입후 6시간에 注入精子와 反應을 보인 卵子의 비율은 表 4와 같다.

種牡牛 A는 16個卵子 중 9개 種牡牛 B는 12개

중 7개, 種牡牛 C는 9개중 6개 그리고 種牡牛 D는 10개중 7개의 卵子가 각각 정자부착 또는 침입을 받아, 精子와 反應을 보인 卵子의 比率은 種牡牛 A, B, C 및 D가 각각 56.3, 58.3, 66.6 및 70.0%로서 種牡牛 A와 B보다 C와 D가 다소 높은 경향이었다. 그러나 核内에 雄性前核이나 雌雄後核 또는 2개의 전형적인 前核構造를 가진 卵子는 관찰되지 않았다. 본 실험에서 前核의 관찰이 불가능했던 원인은 精子注入後 6時間까지의 정자와 난자의 反應程度가 전반적으로 Bousquet와 Brackett (1981, 1982) 그리고 Brackett 등(1982)이 보고한 發達程度보다 다소 낮은 것으로 보아 배양조건의 차이에 기인된 것 같다.

透明滯除去 卵子内로의 정자침입율이 본 실험에서 56~70%였던 결과는 Brackett 등(1982)이 신선정자로 행한 實驗에서 15.4~28.5%였던 것보다 높았으나 凍結精液에서 얻어진 Bousquet와 Brackett (1982)의 47.0~66.0%와는 유사한 결과였다.

또한 Hanada 등(1981)이 토끼子宮内에서 5시간 배양으로 체내수정능을 획득시킨 精子로서 얻어진

결과와도 같았으며 소이외에 돼지 (Imai 등, 1977, 1978; Hanada 등, 1981 및 山羊 (Kim 등, 1980) 의 체내수정능획득 정자의 卵子浸入率과도 유사한 결과였다.

3. 精子浸入率과 種牡牛 受胎率과의 比較

본 실험에서 使用된 凍結精液을 제공한 種牡牛 3頭에 대한 AI후 野外 受胎率을 조사한 結果는 表 5와 같으며 3회까지 수정시킨 암소의 受胎率에

Table 4. Proportions (%) of zona-free hamster eggs interacting with bull spermatozoa in vitro.

Frozen semen	Number of zona-free eggs	Sperm-egg interaction	
		No. of eggs with stuck or penetrated sperm (number/%)	No. of eggs with pronucli (number/%)
Bull A	16	9/56.3	0/0
B	12	7/58.3	0/0
C	9	6/66.6	0/0
D	10	7/70.0	0/0

근거한 자료이다.

種牡牛 A, B 및 C의 受胎率은 각각 62.9, 67.5 및 70.6%였다. 종모우의 수태율을 가급적 비슷한 조건하에서 조사한 탓으로 조사된 대상 암소의 수가 적어 이 3頭的 種牡牛간 에 수태율의 통계적 차이를 비교하지는 않았으나 대체로 種牡牛 A가 가장 수태율이 낮았고 種牡牛 C가 높은 편이었다. 이 結果를 이미 앞에서 考察된 精子侵入成績과 비교해 볼 때 種牡牛 C가 다른 종모우보다 受胎率이 높았던 점은 in vitro 結果와 일치하는 결과라 하겠다.

이상 결과로 體外受精能 獲得 精子의 透明滯除去 hamster卵子内에의 侵入率이 實際 受胎率과 어느 정도 관계가 있음을 확인할 수 있었다.

Bousquet와 Brackett (1981) 그리고 Brackett 등 (1982)이 凍結精子에서 受胎率이 높은 종모우의 精子가 hamster卵子에 침입율이 높았다는 결과와 같은 경향이였다. Foote 등 (1985)도 liposome을 처리한 牛精子를 이용한 실험에서 精子浸入率이 높은 精子를 근거로 하여 種牡牛의 受胎能力을 간접적으로 評價할 수 있다는 결과를 보고한 바 있다.

Table 5. Conception rates at 60 to 90 days after AI in 3 bulls

Bull	Cow	1st AI	2nd AI	3rd AI	Total (average)
A	Total	87	33	13	132
	Pregnant	54	23	6	83
	Conception rate (%)	62.1	69.7	46.2	(62.5)
B	Total	53	15	12	80
	Pregnant	38	11	5	54
	Conception rate (%)	71.7	73.3	41.7	(67.5)
C	Total	57	16	6	79
	Pregnant	43	11	2	56
	Conception rate (%)	75.4	68.8	33.3	(70.9)

V. 摘 要

本實驗은 牛凍結液에 HIS-DM處理가 精子活力과 尖體反應에 미치는 영향과 이들 精子의 透明帶除去 hamster卵子內 侵入率을 조사하기 위하여 실시되었으며 아울러 *in vitro* 結果와 種牡牛의 AI受胎率과를 比較하고자 실시하였다.

Holstein種牡牛 4頭로 제조된 凍結精液을 溶해 후 5分間 HIS-DM으로 처리한 다음 精子注入前 1시간동안 前培養하였다. 캄스터卵子는 精子注入後 6時間에 固定染色하여 位相差顯微鏡으로 檢査하였다.

1. 活力指數로 계산된 精子活力은 HIS-DM 處理後 60~75에서 12~24로 크게 低下되었으나 精子注入時에는 32~41로 向上되었다. 種牡牛C는 다른 種牡牛보다 낮은 活力指數를 보였다. 尖體反應率은 HIS-DM處理後 증가되었으며, 그후 DM에서 7時間 培養하는 동안에는 큰 變化가 없었다.

2. 牛精子와 反應을 보인 hamster卵子의 比率은 種牡牛 A, B, C 및 D가 각각 56.3%, 58.3%, 66.6% 및 70.0%였다. 卵子內로의 精子侵入率은 種牡牛間에 유의적인 차이는 없었으나 種牡牛C와 D가 種牡牛 A와 B보다 높았다.

3. AI를 근거로 한 種牡牛의 受胎率(60~90日 RP)은 種牡牛A, B 및 C가 각각 62.5%, 67.5% 및 70.9%였으며 이 結果는 精子-卵子反應率이 種牡牛 A와 B보다 種牡牛 C가 높았던 *in vitro* 結果와 일치하였다.

本 研究은 1984年度 文教部의 研究費 支援에 의한 것임.

REFERENCES

1. Bousquet, D. and B.G. Brackett. 1981. Penetration of zonafree hamster ova by bull sperm after frozen storage. *Theriogenology*, 15:117.
2. Bousquet, D. and B.G. Brackett. 1982. Penetration of zonafree hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. *Theriogenology*, 17: 199-213.
3. Brackett, B.G., M.A. Cofone, M.L. Boice and D. Bousquet. 1982. Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertilizing ability of bull and stallion. *Gamete Res.*, 5:217-227.
4. Chan, S.Y.W., L.C.H. Tang, and H.K. Ma. 1983. Stimulation of the zona-free hamster ova penetration efficiency by human spermatozoa after 17- β estradiol treatment. *Fert. and steril.* 39:80-84.
5. Foote, R.H., J. Graham and P.A. Oltenacu. 1985. Controlled laboratory tests for ranking bulls on the basis of fertility. Progress report: unpublished.
6. Graham, J. and R.H. Foote. 1985. Capacitating bull sperm and predicting their fertility in a "Test tube". *Ad. Anim. Br.*, 1:6.
7. Guelman, B.E., L. Blasco, and D.P. Wolf. 1981. Zona-free hamster eggs and human sperm penetriaton capacity. *Fert. and steril.* 36:771-777.
8. Hanada, A. and M.C. Chang. 1972. Penetration of zona-free hamster eggs by spermatozoa of different species. *Biol. Reprod.*, 6:300-309.
9. Hanada, A. and M.C. Chang. 1976. Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with a special reference to sperm capacitation. *J. Refrod. Fert.*, 46:329-241.
10. Hanada, A. an H. Nagase. 1981. Effects of sperm preincubation in rabbit uterus and of imimidazole on the penetration of zonafree hamster eggs by bull and boar spermatozoa in vitro. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 27:113-118.
11. Imai, H., K. Niwa and A. Iritani. 1977. Penetration in vitro of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 51:495-497.
12. Iritani, A., K. Niwa, and H. Imai. 1978. Sperm penetration in vitro of pig follicular

- oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:379-383.
13. Niwa, K. and M.C. Chang, 1974a; Effect of sperm concentration on the capacity of rat spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 189:353-356.
 14. Niwa, K. and M.C. Chang. 1974b. Optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa for fertilization in vitro of rat eggs. *J. Reprod. Fert.*, 40:471-474.
 15. Kato, S., H. Kusunoki, N. Miyake, T. Yasui and J. Karita. 1984. Utility of isolated hamster uterus as the capacitation environment of goat spermatozoa. *Jap. Soc. Zootech. Sci., Ann. Meet. Abstr.*, p.114.
 16. Kim, C.I., K. Niwa, H. Imia and A. Iritani. 1980. Penetration of zona-free hamster eggs in vitro by goat spermatozoa preincubated in the reproductive tract isolated from a maturing gilt. *J. Exp. Zool.*, 213:181-183.
 17. Pavok, A. and N. McLaren. 1972. The role of cumulus cell and zona pellucida in fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 29:91-97.
 18. Quinn, P., C. Barros, and D.G. Whittingham's. 1982. Preservation of hamster oocyte to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66:161-168.
 19. Smith, M., R.N. Peterson and L.D. Russell. 1983. Penetration of zona-free hamster eggs by boar sperm treated with the Iono-phore A-23187 and inhibition of penetration by antiplasma membrane antibodies. *J. Exp. Zool.*, 225:157-160.
 20. Toyoda, Y. and M.C. Chang, 1968. Sperm penetration of rat eggs in vitro after dissolution of zona pellucida by chymotrypsin. *Nature (London)* 220:589-591.
 21. Wells, M.E. and O.A. Awa. 1970. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 53:227-232.
 22. Wolf, D.P., J.E. Sokoloski, and M.M. Quigley. 1983. Correlation human in vitro fertilization with the hamster egg bioassay. *Fert. and steril.* 40:53-59.
 23. Yanagimachi, R., Y.D. Noda. 1970. Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to membrane fusion between sperm and egg cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 31: 486-493.
 24. Yanagimachi, R. 1972. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 28:477-480.
 25. Yanagimachi, R., H. Yanagimachi and B.J. Rogers. 1976. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 15:471-476.