

X-精子和 Y-精子的分離에 관한 研究 IV. Sephadex Gel濾過法과 Percoll重層遠心分離法の 竝用에 의한 牛 精子的 分離

李柱榮·鄭吉生·金鍾培

建國大學校 畜產大學

Separation of X-and Y-Bearing Spermatozoa IV. Separation of bull spermatozoa by the combination of density Gradient Centrifugation and Sephadex Gel filtration.

Lee, J. Y., K. S. Chung and J. B. Kim

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

Summary

These experiments were carried out to develop new techniques for in vitro separation of x-and Y-bearing spermatozoa.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. Following centrifugation of discontinuous percoll density gradient, population of spermatozoa increased progressively from low to high density. The highest concentration of spermatozoa was observed at the 4th fraction which included 36.6% of spermatozoa.
2. As increasing percoll concentration, the higher motility index was obtained and the highest motility index (74.2) was obtained at the 5th fraction.
3. The percentage of B-body bearing spermatozoa following percoll density gradient centrifugation was decreased from 39.7% to 25.6%.
4. The sperm population following chromatography by sephadex gel and percoll density gradient centrifugation was decreased in 1st, 5th and 6th fractions but the reverse was turn for 2nd, 3rd and 7th fractions, and the highest sperm concentration was observed at the 7th fraction which included 37.4% of spermatozoa.
5. Motility index of spermatozoa was increased from 77.6 to 79.4 after the sephadex gel filtration, however it was decreased at all fractions after percoll density gradient centrifugation. The lowest motility index (33.2) was obtained from the 7th fraction.
6. The rate of B-body bearing spermatozoa was shown the trend to decrease by the sephadex gel filtration and the trend was accelerated by the percoll density gradient centrifugation. The lowest percentage of B-body bearing spermatozoa, 12.0% was obtained from the 5th fraction.

I. 緒 論

體外에서 X-精子和 Y-精자를 分離하여 産子의 性을 支配하려는 研究는 오래전부터 多角的인 側面에서 試圖되어 왔다. Diasio(1971)와 Manarang (1971)은 X-精자와 Y-精자의 運動性이 水素이온濃

度에 따라 差異가 있다는 점을 이용하여, Bangham (1961), Sevinc(1968), Hefs등(1971) 및 白井등 (1973)은 X-精자와 Y-精자의 電氣的 性質의 차이점을 이용하여 兩者의 分離를 試圖하였으며, Stephan등(1984)은 兩 精자間의 走地性의 差異를 이용하여 X-精자와 Y-精자를 分離한후, 人工授精을 통하

여 73%의 雄性을 얻는데 성공 하였다고 보고 하였다.

한편, Goldberg등(1971)과 Bennett등(1973)은 X-精子和 Y-精자는 免疫學的 性質이 다르다는 점에 착안하여 精子에게 雄性特異抗原인 組織適合性-Y抗原(Histocompatibility-Y antigen: H-Y antigen)에 대응하는 H-Y抗体를 處理, 精子毒性實驗(Sperm cytotoxicity test)을 實施하여 X-精子和 Y-精자의 分離可能性에 대한 肯定的인 結果를 얻었으며, Quinlivan등(1982)은 Sephadex Gel-Column을 사용하여 精子 分劃을 實施 함으로써 X-精자의 純度を 74.0%까지 높이는데 성공 하였다. 또 Aanderson(1946)과 Lindahl등(1965)은 X-精子和 Y-精자는 그 比重에 差異가 있다는 사실을 報告한바 있는데, 이러한 報告를 근거로 하여 Rohde등(1975)은 Sucrose를 Shastry등(1977)은 Ficoll을, Luderer등(1982)은 Silicone과 Hydrocarbon을, 또 Kaneko등(1983)은 Percoll을 사용하여 濃度勾配에 따른 重層遠心分離를 實施함으로써 X-精자의 純度を 59.0~80.6%까지 높이는데 성공 하였다. 이러한 研究結果를 기초로하여, 本 研究에서는 不連續 percoll 重層遠心分離法과 Sephadex Column 過渡法을 並用하여 牛精液內的 X-精子和 Y-精자의 分離를 試圖 하였던바 그 結果를 報告한다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗 材料

1) 供試精液

도축장으로부터 도살직후 채취한 홀스타인 牝牛의 精巢上體尾部를 Tyrode液에 沈漬시킨후 精巢上體管을 細切함으로써 精子를 浮遊시켰다. 그후 浮遊液中の 精子濃度を 계산하여 精子濃度 20×10^6 /ml 이상, 生存指數 60 이상의 條件을 갖춘것 만을 선택하여 供試 하였다.

2) 緩衝液

Sephadex Gel-Column의 溶出과 percoll重層液의 製造 및 精子洗滌등에는 다같이 Tyrode液을 調製하여 使用하였다.

3) Percoll

不連續重層遠心分離를 위해서는 Percoll(Pharmacia, Sweden)을 供試하였다.

4) Sephadex Gel

精子分劃用 Column을 製造하기 위해서는 Sephadex G-50 Fine(Pharmacia, Sweden)을 供試하였다.

實驗 方法

1) Sephadex Gel-Column의 製造

Sephadex Gel-Column의 제조는 李등(1988)의 方法에 準하여 實施하였다.

2) 不連續 Percoll重層의 製造

滲透壓調整用 Tyrode液은 通常의 Tyrode液에 72 mg/ml의 Sodium Chloride와 0.1mg/ml의 Streptomycin Sulfate 및 0.03mg/ml의 Penicillin을 첨가하여 제조 하였는데, 이때의 滲透壓은 2700 ± 10 mOsm/Kg이었다. 이와같이 10倍로 濃縮된 Tyrode液과 autoclave에 의해 滅菌된 Percoll을 1:10의 比率로 혼합 하여 Percoll의 최종 滲透壓을 290 ± 10 mOsm/Kg으로 調整 하였다. 이어 이렇게 調整된 Percoll液의 比率가 각각 30, 50, 65, 80 및 95%가 되도록 調整하였다. 이렇게 調整된 各 溶液의 比重은 각각 1.04, 1.06, 1.08, 1.10 및 1.11이었다. 이러한 比重이 相異한 5個의 溶液을 比重이 무거운 것부터 1ml씩 차례로 遠心管(10×1.5 cm)에 加注함으로써 Percoll重層을 만들었다.

3) Sephadex Gel Column에 의한 精子分劃의 實施

Sephadex Gel-Column에 의한 精子分劃은 李등(1988)의 方法에 準하여 실시 하였다. 溶出된 各 劃分 중 5~7 번째 劃分の 精子를 1ml로 濃縮시킨후 精子濃度, 生存指數 및 B-小體를 갖는 精子의 比率등을 조사하여 Percoll과의 並用に 사용 하였다.

4) 不連續 Percoll 重層遠心分離의 實施

不連續 Percoll 重層上部에 준비된 精液 1ml을 加注한뒤 $300 \times g$ 에서 15分間 遠心分離를 實施한후 各 比重別로 分離된 精子를 回收하여 回收된 各 劃分에 대해서는 精子濃度, 精子生存指數 및 B-小體를 갖는 精子의 比率등을 조사 하였다(Fig. 1).

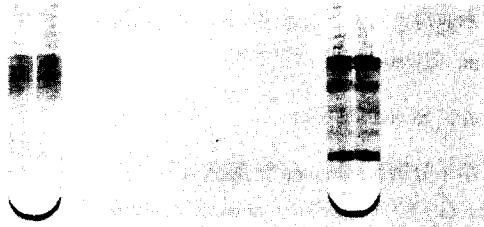


Fig. 1. Diagram showing the percoll density gradient centrifugation of spermatozoa. Left tube; before separation in percoll Right tube; after separation in percoll

5) Sephadex Gel 慮過와 Percoll重層遠心分離의 竝用.

Sephadex Gel-Column을 이용한 分割에 의하여 얻어진 5~7번 劃分을 混入한 다음 이것을 1ml로 濃縮시켰다. 이어 滲透壓이 調整된 溶液의 比率를 50, 60, 65, 75, 80 및 90%로 調整함으로써 比重이 各各 1.06, 1.07, 1.08, 1.09, 1.10 및 1.11로 調整된 6個의 相異한 溶液을 比重이 무거운것부터 1ml씩 차례로 加注하여 Percoll重層을 만들었다. 이 Percoll重層의 上部에 前述한 바와같이 Sephadex Gel 慮過에 의하여 얻어진 1ml의 精子 浮遊液을 加注하고 450×g에서 20分間 遠心分離를 實施하였다. 遠心分離가 끝나면 分離된 精子를 回收하여, 各 劃分の 精子濃度, 生存指數, B-小體를 갖는 精子의 比率등을 조사하였다.

6) 精子濃度, 生存指數 및 B-小體의 檢査

分割實施 前後의 精子에 대한 生存指數 및 濃度は 鄭 등(1984)의 方法에 準하여 檢査하였다. B-小體의 檢査는 Battacharaya (1976)의 方法에 準하여 檢査 하였다. 즉 Quinacrine mustard(0.05%)로 處理된 精子를 螢光顯微鏡下에서 觀察하면, 精子는 全體的으로 螢光을 띠며 그중 Y-精子는 특히 강하게 빛나는 圓形의 小斑點, 즉 B-小體(B-body)를 나타낸다. 이러한 사실을 근거로 하여 各 劃分당 200個 以上の 精子를 無作爲로 觀察하여 B-小體의 有無를 확인 그 出現率을 計算하였다.

III. 結果 및 考察

1. Percoll 重層遠心에 의한 分割

1) 劃分別 精子의 分布

Percoll重層上部에 $316 \times 10^6 \sim 1185 \times 10^6$ 의 精子를 加注하여 遠心分離했을때 各 劃分에 있어서의 精子 回收率은 Table 1에서 보는 바와 같았다. 즉 精漿層에는 精子가 回收되지 않았으며 1번 劃分부터는 精子가 回收되었고 그 濃度は 점차 높아졌으며, 4번 劃分에 있어서의 回收率은 36.6%로 가장 높았다. 이러한 結果는 Kaneko 등(1983)의 경우 下層劃分에서 가장 많은 回收率이 얻어졌다는 보고와는 달랐는데 그것은 分離前 精子를 4~5회 세척 했음에도 불구하고 精巢上體尾部の 組織으로 보이는 미세한 物質들이 제거되지 않아 遠心分離할때 이 物質들이 주로 4번층에서 응집되고, 그결과 그 층에서 精子가 정체되는 경향이 있기 때문인 것으로 思

Table 1. Population of sperm in various fractions after density gradient centrifugation in percoll

Fractions	Sperm concentration($\times 10^4$) in				Mean	Recovery rate(%)
	each experiment					
	1	2	3	4		
Seminal plasma	-	-	-	-	62	
1(-1.04)	7	102	15	126	230	1.17
2(1.04-1.06)	172	216	198	334	487	4.29
3(1.06-1.08)	283	626	356	685	1,966	9.09
4(1.08-1.10)	1,021	1,840	985	4,019	1,447	36.68
5(1.10-1.11)	826	1,225	720	3,020	1,166	27.01
6(1.11-)	685	930	638	2,412	1,166	21.76

料된다.

2) 劃分別 生存指數

Percoll重層遠心分離에 따른 劃分別 精子生存指數의 變化는 Table 2에서 보는바와 같았다. 原精液의 生存指數는 평균 72.1이었으나 遠心分離後의 그것은 Percoll濃도가 높을수록 좋아지는 경향을 보여 5번 劃分에서는 74.2로써 가장 좋았다. 이러한 結果는 Kaneko등(1983)의 결과와도 일치하는 것이었다.

3) 劃分別 B-小体の 出現率

Percoll重層遠心分離에 의한 X-및 Y-精子的純度變化를 보면 Table 3과 같았다. 分離前의 B-小体出現率은 39.7%였던것이 劃分後에는 1번 劃分에서 54.0%로 높아졌으나 그다음 劃分부터는 낮아

지는 경향을 보여 6번 劃分에서는 25.6%로 떨어졌다. 즉 Percoll의 濃도가 높은 劃分에서는 X-精子的比率이 높아지는 傾向을 보였으며, Percoll의 濃도가 낮은 劃分에서는 Y-精子的比率이 높아지는 傾向을 보였다. 이러한 結果는 Rohde등(1975)과 Kaneko등(1983)의 結果와도 일치하는 것이었다.

2. Sephadex Gel 濾過와 Percoll重層遠心分離의 竝用

1) 劃分別 精子的 分布

Table 4는 Sephadex Gel 濾過에 의해 分離된 $141 \times 10^6 \sim 385 \times 10^6$ 의 精자를 6個의 Percoll 重層上部에 加注하여 遠心分離했을때 各 劃分에 있어서의 精子回收率이다. 中間層에서의 精子回收率은 낮았고 上層과 下層에서는 비교적 높은 回收率을 보였다.

Table 2. Motility index of sperm in various fractions after density gradient centrifugation in percoll

Fractions	Motility index in each experiment				Mean±SD
	1	2	3	4	
Intact semen	72.0	78.1	65.4	73.0	72.1±2.4
Seminal plasma	-	-	-	-	-
1(-1.04)	32.0	28.6	25.0	40.2	31.4±2.8*
2(1.04-1.06)	48.2	43.3	48.0	45.0	46.1±0.9*
3(1.06-1.08)	54.2	56.2	61.0	52.0	55.8±1.6±
4(1.08-1.10)	74.0	65.1	67.4	73.0	69.8±1.8
5(1.10-1.11)	74.4	79.1	67.0	76.4	74.2±2.2
6(1.11-)	41.3	76.5	65.0	72.0	71.2±2.0

*Significantly different from intact semen at $p < 0.01$

Table 3. Percentage of B-body bearing spermatozoa in various frctions after density gradient gradient centrifugation in percoll

Fractions	B-body bearing sperm in each experiment (%)				Mean±SD
	1	2	3	4	
Intact semen	38.5	37.3	42.1	41.0	39.7±0.9
Seminal plasma	-	-	-	-	-
1(-1.04)	-	52.0	-	56.0	54.0±1.4
2(1.04-1.06)	-	53.2	56.2	45.4	51.6±2.6
3(1.06-1.08)	47.1	51.3	50.0	43.0	47.8±1.5
4(1.08-1.10)	36.5	42.0	36.6	38.3	38.3±1.1
5(1.10-1.11)	32.3	32.1	30.5	26.3	30.3±1.2
6(1.11-)	28.0	26.3	30.1	18.3	25.6±2.2

*Significantly different from intact semen at $p < 0.01$.

다. 즉 精漿層에서는 精子가 거의 回收되지 않았고 1번, 5번, 6번 劃分에서 5.0~7.2%의 精子가 回收되는데 비해 2번, 3번, 7번 劃分에서는 13.6~37.4%의 精子가 回收되었으며, 이중 7번 劃分에서의 回收率이 37.4%로써 가장 높았다.

2) 劃分別 生存指數

Sephadex Gel-Column과 percoll重層을 竝用하여 分離한 後の 劃分別 精子生存指數는 Table5에서 보는데와 같다. 分離前 77.6이었던것이 1次로, Se-

phadex Gel-Column으로 分離한 後の 精子生存指數는 평균 79.4였다. 그러나 Percoll重層遠心 分理後에는 평균 33.2~61.7로써 全 劃分에 걸쳐 낮았으며, 특히 Percoll濃도가 높을수록 精子生存 指數는 낮아져 7번 劃分の 경우 33.2로 가장 낮았다.

3) 劃分別 B-小体の 出現率

Sephadex Gel-Column과 Percoll重層의 竝用에 의한 劃分別 X- 및 Y-精子의 純度變化는 Table6에서 보는데와 같았다. 즉 分離前의 B-小体 出現率

Table 4. Population of sperm in various fractions separated by both sephadex gel column filtration and percoll density gradient centrifugation

Fractions	Sperm concentration (x10 ⁴) in			Mean	Recovery rate (%)
	each experiment				
	1	2	3		
Intact semen	3,028	5,243	2,012	3,427	-
First treated sperm	2,282	3,854	1,410	2,514	73.4
Seminal plasma	-	-	-	-	-
1(-1.06)	112	120	96	109	5.0
2(1.06-1.07)	195	508	169	290	5.0
3(1.07-1.08)	361	617	205	394	13.6
4(1.08-1.09)	268	402	134	268	18.2
5(1.09-1.10)	194	168	108	156	12.4
6(1.10-1.11)	167	144	84	131	6.1
7(1.11-)	607	1,402	418	808	37.4

Table 5. Motility index of sperm in various fractions separated by both sephadex gel column filtration and percoll density gradient centrifugation

Fractions	Motility index in each experiment			Mean ± SD
	1	2	3	
Intact semen	75.6	78.2	75.0	76.3 ± 0.8
First treated sperm	76.6	78.6	83.0	79.4 ± 1.5
Seminal plasma	-	-	-	-
1(-1.06)	52.3	47.2	65.0	54.8 ± 4.3*
2(1.06-1.07)	55.6	61.2	68.5	61.7 ± 3.0*
3(1.07-1.08)	48.1	58.0	65.1	57.0 ± 4.0*
4(1.08-1.09)	45.0	56.0	58.3	53.1 ± 3.3*
5(1.09-1.10)	39.4	52.2	55.1	48.9 ± 3.8*
6(1.10-1.11)	30.2	47.0	42.0	39.7 ± 4.0**
7(1.11-)	28.0	30.1	41.5	33.2 ± 3.4**

*, **, Significantly different from intact semen at p<0.05 and p<0.01

Table 6. Percentage of B-body bearing spermatozoa in various separated by both sephadex gel column filtration and percoll density gradient centrifugation

Fractions	B-body bearing sperm in each experiment (%)			Mean±SD
	1	2	3	
Intact semen	36.3	35.2	42.0	37.8±1.7
First treated sperm	19.0	23.0	22.5	21.5±1.0*
Seminal plasma	-	-	-	-
1(-1.06)	-	28.5	-	28.5±0.0**
2(1.06-1.07)	30.0	32.0	26.0	29.3±1.4**
3(1.07-1.08)	21.2	25.0	19.3	21.8±1.3*
4(1.08-1.09)	16.7	18.3	23.5	19.5±1.7*
5(1.09-1.10)	13.5	12.0	10.6	12.0±0.6*
6(1.10-1.11)	-	11.8	-	11.8±0.0*
7(1.11-)	12.0	13.0	15.5	13.5±0.8*

*, **, Significantly different from intact semen at $p < 0.01$ and $p < 0.05$

은 37.8%였으나 1次로, Sephadex Gel-Column 여과에 의해分離한 후의 B-小体 出現率은 21.5%로 낮아졌고, 이어 Percoll重層遠心分離로 分離한 후의 B-小体 出現率은 1~3劃分과같은 예외도 있었으나 전반적으로 더욱 낮아 졌으며 5번劃分の 그것은 12.0%로 가장 낮았다. 이러한 結果는 Percoll의 濃도가 낮을수록 B-小体 出現率은 높았고, Percoll의 濃도가 높을수록 B-小体 出現率은 낮아진다는 것을 보여준다.

以上の 結果들을 종합하여 考察할때 牛 精子를 percoll重層遠心分離로 處理하면 精子의 生存指數는 分離前과 같게 유지하면서도 X-精子의 純度は 尤의하게 높일 수 있으며, Sephadex Gel-Column 濾過法과 Percoll重層遠心分離法을 竝用하면 精子의 生存指數는 현저히 낮아지지만 X-精子의 純度は 더욱 높일 수 있는 것으로 판단 된다.

IV. 摘要

本 試驗은 Sephadex Gel-Column濾過法과 不連續 Percoll重層遠心分離法의 竝用に 의해 X-精子와 Y-精子를 分離하는 方法을 開發할 目的으로 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 不連續Percoll重層遠心分離에 따른劃分別 精子分布는 Percoll의 濃도가 높을수록 높아지는 傾向을 보였으나 4번째劃分の 精子回收率이 36.6%로 가장 높았다.

2. 精子의 生存指數는 Percoll의 濃도가 높아질수록 높아지는 傾向을보여 5번째劃分の 그것은 74.2로 가장 높았다.

3. Percoll重層遠心分離前의 B-小本出現率은 39.7%였는데 비하여 遠心分離後에는 Percoll의 濃도가 높을수록 낮아지는 傾向을 보였으며 6번째劃分の 그것은 25.6%로 가장 낮았다.

4. Sephadex Gel-Column濾過法과 Percoll 重層遠心分離法을 竝用했을때의劃分別 精子回收率은 1번, 5번및 6번劃分에서의 그것은 5.0~7.2%로 낮았으나 2번, 3번및 7번劃分에서의 그것은 13.6~37.4%로 높았다. 가장높은 回收率은 37.4%로써 7번째劃分에서 얻어졌다.

5. 精子生存指數는 分離前의 77.6에서Sephadex Gel濾過 후에는 79.4로 높아졌지만, Percoll重層遠心分離後에 全劃分에서 낮아졌으며 7번째劃分の 精子生存指數는 33.2로써 가장 낮았다.

6. B-小体の 出現率은 處理前에는 37.8%였으나 Sephadex Gel濾過에 의해서 21.5%까지 낮아졌으며, Percoll重層遠心分離後에는 더욱 낮아지는 傾向을 보였는데 5번째劃分の 그것은 12.0%로 가장 낮았다.

References

1. Anderson, J. 1946. The buffer capacity and the specific gravity of bull semen. J. Agr. Sci. 36: 258-259.

2. Bhattacharya, B.C. 1958. Sex control in mammals. *Z. Tierz. Zücht. Biol.*, 72: 250-254.
3. Bhattacharya, B.C. 1962. Die verschiedene Sedimentations geschwindigkeit der Z-und Y-spermien und die frage der willkurllichen gescelecht-bestimmung. *Z. Wiss. Zool.*, 196: 203-250.
4. Branham, J.M. 1970. Separation of rabbit semen into two populations of spermatozoa by contrifugation. *J. Reprod. Fert.* 22: 469-482.
5. Boyse A. edward. 1973. Sex ration in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. *Nature*. 246: 308-309.
6. Goldberg. H. ellen, Edward A. boyse, Dorothea bennett, Margrit scheid and Elizabeth A. Carswell. 1971. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouie sperm. *Nature*. 232: 478-480.
7. Kaneko, S., J. Yanagimachi., T. Kobayashi and R. Lizuka. 1983. Separation of human X-and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *Fertil. Steril.* 40: 661-665.
8. Kaneko, S., S. Oshio, T. Kobayashi, H. Mohri and R. Iziuka. 1984. Selective isolation of human X-bearing sperm by differential velocity sedimentation in Percoll density gradients. *Biomed. Res.* 5: 187-194.
9. Luderer. A.A., W.W. Dean, A.R. Zine, D.M. Hess, R.H. Foote and R.J. Wall. 1982. Separation of bovine spermatozoa by density on water insoluble newtonian gels and their ues for insemination *Bio. Reprd.* 26: 813-824.
10. Quinlivan, W.L.G., K. Preciado, T.L. Long and H. Sullivan. 1982. Separation of human X-and Y-spermatozoa by Albumin gradients and Sephadex chromatography. *Fertil.* 37: 104-107.
11. Rohde. W., T. Porstmann, S. Prehn and G. Dörner. 1975. Gravitational pattern of the Y. bearing human spermatozoa in density gradient centrifugation. *J. Reprod. Fert.* 42: 587-591.
12. Sharstry, P.R., V.C. Hegde and S.S. Rao. 1977. Use of Ficoll sodium metrizoate density gradient to separate human X-and Y-bearing spermatozoa. *Nature*, 269: 58-60.
13. Sorensen, A.M. Jr. 1979. A laboratory manual for animal reproduction 4th. Edition. American press, Boston.
14. Stephen L. Corson, Frances R. Batzer, Nancy J. Alexander Shelden Schlaff and Chari Otis, 1984. Sex selection by sperm Separation and insemination. *Ferti. Steril.*
15. 李柱榮·嚴基鵬·高大煥·金鍾培·鄭吉生. 1988 X-精子和 Y-精子的分離에 관한 研究 III. Sephadex Gel濾過에 의한 牛精子的分離. 韓國家畜繁殖學會誌12(1): 11-14.
16. 嚴基鵬·李柱榮·高大煥·鄭吉生. 1988. X-精子和 Y-精子的分離에 관한 研究 II. Percoll重層遠心分離法에 의한 人間精子的分離. 韓畜誌30(5): 285~291.
17. 鄭吉生 外 7名 1984. 改訂 家畜人工授精. 鄉文社: 137-153.