

소 정자의 운동성에 영향을 미치는 난포액 성분에 관한 연구

박 영 식

경북대학교 농과대학

Study on Components of Bovine Follicular Fluid Affecting on Sperm Movement

Y. S. Park

College of Agriculture, Kyungbuk National University

SUMMARY

Follicular fluid influxed into the oviduct during ovulation may affect movement of sperm for fertilization. Thus, in this study, the effect of follicular fluid, obtained from follicles of 10mm in diameter, on number and quality of sperm recovered by swim-up separation was investigated and sperm-movement stimulating components extracted from follicular fluid with methanol and isooctane were separated by gel filtration with Sepadex G-10, G-25 and G-100 gels, and were isolated by electrophoresis with SDS-PAGE mini gel.

The results obtained were as follows;

1. Diluted follicular fluid stimulated sperm movement.
2. Sperm-movement stimulating factors were in methanol extract.
3. Sperm-movement stimulating effect of methanol extract appeared in fraction I among fractions recovered after gel filtration. And the fraction I contained proteins indicating 4 major bands as about 47, 43, 25 and 14 kilodaltons and 5 minor bands as about 67, 58, 23, 22 and 21 kilodaltons.
4. The fraction I recovered from G-100 gel showed significantly low percentage of motile sperm and had no protein indicating the band of 67 kilodaltons among the minor bands.

(Key words : follicular fluid, sperm, movement, proteins, bovine)

서 론

배란시 난관 내로 유입되는 난포액은 수정에 참여할 정자의 활성화에 관여한다. Ralt 등(1991)은 배란 전 난포로부터 회수한 난포액이 정자 유인능을 가지고 있어서 정자를 활성화시키고 수정에 참여하도록 유도한다고 하였으며, Villanueva-Diaz 등(1992)은 난포액의 정자유인능에 관한 실험에서 총 정자의 70%가 난포액이 들어있는 chamber로 이동하였으며, 20%는 반대방향으로 나머지는 그

자리에 머물렀다고 보고한 바 있다. 이와 같이 정자의 운동성에 영향을 미치는 난포액의 주요 구성분으로 배란 전 난포액에 함유되어 있는 progesterone (Sliwa, 1995; Vadillo-Ortega 등, 1994; Villanueva-Diaz 등, 1995; 박, 1996)과 펩타이드성 물질(Fetteroff 등, 1994)이 정자의 운동성에 영향을 미친다고 보고된 바 있다. 그러나 배란시 난자를 향하여 이동하는 정자의 이주와 관련한 연구는 거의 없으며, 또한 정자를 유인하는 난포액내 함유된 단백질 성분을 정확하게 규명하지 못하고 있다.

따라서 본 연구에서는 swim-up separation 방법

을 이용하여 난포액이 정자의 운동성에 미치는 영향을 조사하고, 나아가서 정자의 운동성에 영향을 미치는 난포액내 성분을 Sepadex gel을 이용한 gel filtration과 SDS-PAGE mini gel을 이용한 전기영동으로 분리 및 동정코자 한다.

재료 및 방법

1. 난포액의 준비

도축장(신영산업, 경산시)에서 구입한 소 난소내 난포 중 10mm의 난포로부터 난포액을 회수하여 2,000rpm으로 10분간 원심분리한 다음, 상등액을 회수하여 정자의 운동성에 대한 효과를 평가할 때까지 -20°C 에서 보존하였다.

2. 정자 선별용 용액

정자의 swim-up separation을 위해 사용한 정자 선별용 용액(medium for sperm separation; MSS)은 108mM NaCl, 4.5mM KCl, 1.71mM CaCl_2 , 1.19mM KH_2PO_4 , 1.19mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.15mM NaHCO_3 , 20.85mM HEPES, 23.28mM Na-lactate, 0.33mM Na-pyruvate 및 5.56mM glucose를 첨가하여 제조하였으며, pH가 7.0이 되도록 조정된 다음 0.22 μm pore size의 filter membrane을 이용 여과하여 사용하였다.

3. 실험계획

1) 실험 1. 난포액의 첨가농도가 정자의 운동성에 미치는 영향

MSS에 난포액을 각각 0, 5, 10 및 20%를 첨가한 다음 0.45 μm pore size의 filter membrane으로 여과하여 1ml씩 원심분리관에 넣고 항온수조(36°C)에서 온도평형을 유도하였다.

한편 소 동결정액(축척중앙회 유우개량사업소)을 36°C 에서 20초간 용해한 다음, 원심분리관에 넣고 2ml의 MSS를 첨가하여 정액을 희석하였다. 희석한 동결정액을 1,500rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하고, 80 μl 의 MSS를 첨가하여 정자펠렛을 재부유하였다.

세척 후 재부유한 동결정액 20 μl 를 미리 준비한

원심분리관 저면에 침지하고 36°C 에서 30분간 배양하여 정자의 swim-up을 유도하였으며, 배양 후 상등액 0.5ml를 회수하여 정자의 수와 생존성을 조사하였다. 또한 회수한 정자 중에서 수정능획득반응을 일으킨 정자의 비율을 평가하기 위해서 배양 후 회수한 용액에 5 μM 의 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)를 첨가하여 36°C 에서 30분간 배양한 다음 정자의 침모반응율을 조사하였다.

2) 실험 2. 난포액내 지질성분과 단백질성분이 정자의 운동성에 미치는 영향

동결 보존된 난포액을 용해한 후 0°C 항온수조에 담겨 온도의 평형을 유도하였다. 난포액에 methanol을 5배 점적하고, 이어서 10배의 isooctane을 첨가하여 혼합한 다음 냉장실에 정치하여 층 분리를 유도하였다. 분리된 isooctane layer와 methanol layer를 각각 회수한 다음 0.45 μm pore size의 filter membrane을 이용하여 여과한 후, 여과액을 동결 진공 건조하였으며, 각각의 분말을 ddH₂O로 원래의 난포액 용량으로 희석하였다. 이렇게 준비된 시료를 10%의 난포액과 비교하기 위하여 MSS로 10배 희석한 다음 실험 1의 방법에 따라 정액의 성장에 미치는 효과를 조사하였다.

3) 실험 3. 단백질성분 중 정자 운동성에 영향을 미치는 물질의 분리와 정자의 운동성에 미치는 영향

Sepadex G-10과 G-25는 각각 1mM HEPES 완충용액(pH 7.0)에 적량 첨가하고 25°C 에서 3시간 동안 swelling을 유도하였으며, G-100은 동일 완충용액에 적량 첨가하고 100°C 항온수조에서 5시간 동안 가온하여 swelling을 유도하였다. 충분히 가수된 gel을 진공상태에서 탈기시킨 후 상등액을 제거하고 빠르게 침전하는 입자만을 회수하여 column에 장착하고 10분간 정치하여 gel을 안정화시킨 다음, gel의 높이가 $8.8 \pm 0.1\text{cm}$ 가 되도록 잉여의 gel을 제거하고 완충용액을 흘려 20분간 gel을 세척하였고, flow rate가 시간 당 35ml가 되도록 조정하였다. 실험 2의 방법으로 회수하여 여과한 다음 동결 진공 건조한 methanol layer의 분말을 ddH₂O로 원래 난포액 용량의 2배가 되게 농축하여 sample을 준비하였으며, column내 완충용액을 배출시켜 gel

의 뒷면이 노출되면 0.5ml의 sample을 주입하고 동일 완충용액을 흘려 유출되는 용액을 0.5ml씩 회수하였다. 회수한 용액을 완충용액으로 10배 희석한 다음 254nm의 파장에서 흡광도를 조사하여 Fig. 1을 얻었다. 이로부터 동일영역의 여과액을 혼합하여 동결 건조한 다음, 사용한 난포액 용량의 10배가 되도록 MSS로 희석하였으며, 실험 I의 방법에 따라 희석한 용액이 정자의 운동성에 미치는 영향을

Absorbance (254nm)

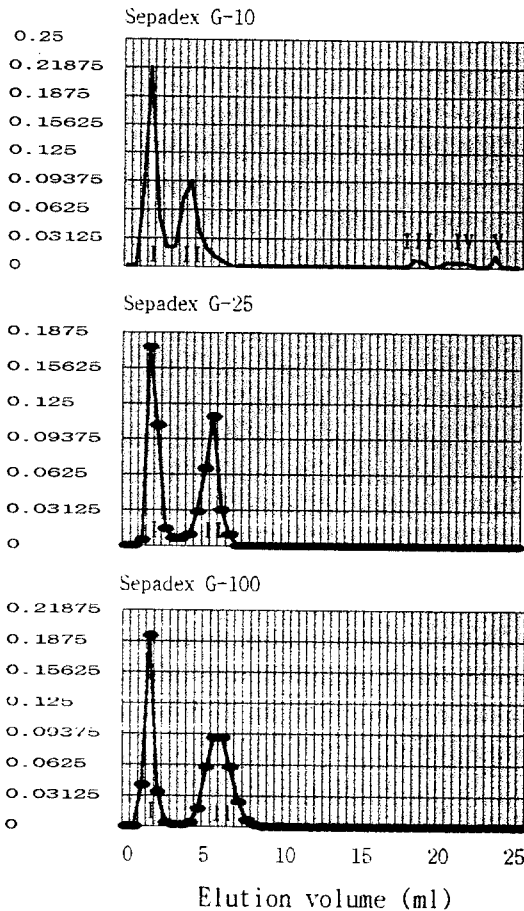


Fig. 1. Fractionation of methanol extract of follicle fluid on Sepadex columns(1x9cm) with G-10, G-25 and G-100 gels: eluants 1mM HEPES(pH 7.0, 35ml/h). The labels of I, II, III, IV and V indicate the fractions for Table 3.

비교 조사하였다.

4) 실험 4. 정자 운동성에 영향하는 분획의 분자량을 측정

난포액으로부터 methanol로 추출한 단백질성분으로부터 Fig. 2와 같이 두 개의 분획(Fraction I과 II)을 얻었다. 이들 분획 I과 II, 단백질성분 및 HMW와 LMW calibration kits(Pharmacia Biotech)의 단백질을 sodium dodesyl sulfate(SDS)로 처리한 다음 10% acrylamide을 함유한 gel에 주입하고 40mA의 constant current에서 35분간 전기영동하였다. 각 분획의 band 양상을 보기 위하여 standard Coomassie brilliant blue staining(Wilson, 1983)과 Silver staining(Morrissey, 1981)을 하였으며, 나타난 bands를 이용하여 분자량을 추정하였다. 단백질의 분자량 추정을 위하여 사용된 HMW (high molecular weight proteins)는 myosin(212

Absorbance (254nm)

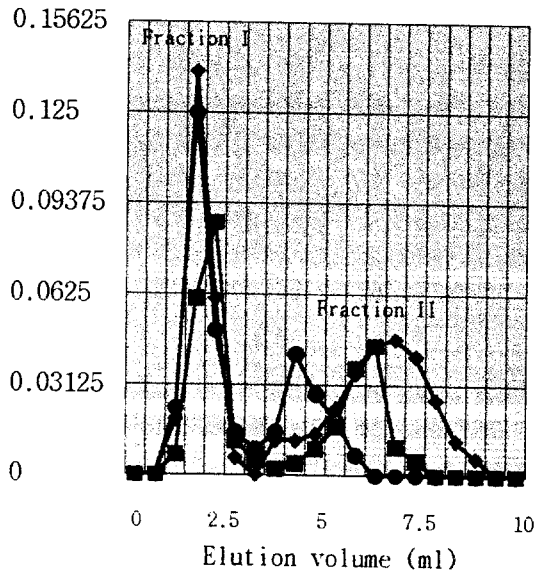


Fig. 2. Separation of methanol extract with (●-●) Sepadex G-10 column (■-■) Sepadex G-25 column (◆-◆) Sepadex G-100 column: eluant 1mM HEPES(pH 7.0). The fractions, I and II, are labels for SDS-PAGE mini gel electrophoresis.

kd), α_2 -merroglobulin(170kd), beta-galactosidase(116kd), transferrin(76kd) 및 glutamic dehydragenase(53kd)를 함유하고 있으며, LMW(low molecular weight protein)은 phospholipase b(94kd), BSA(67kd), ovalbumin(43kd), carbonic anhydrase(30kd), soybean trypsin inhibitor(20.1kd) 및 α -lactoalbumin(14.4kd)을 함유하고 있다.

4. 통계처리

얻어진 결과는 분산분석(ANOVA)에 의하여 통계처리하였으며, Duncan 다중검정에 따라 처리간 차이의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 난포액의 첨가농도가 정자의 운동성에 미치는 영향

난포액이 함유된 용액에서 swim-up separation에 의해 회수한 정자의 수와 운동정자 비율 및 침모 반응율은 Table 1과 같다.

난포액이 각각 0, 5, 10 및 20%가 첨가된 정자선별 용액에서 swim-up에 의해 회수된 정자의 수는 각

각 10.5 ± 3.2 , 128.5 ± 8.0 , 146.6 ± 14.4 및 $177.0 \pm 13.8 (\times 10^4)$ 였으며, 이 중 운동성을 가지고 있는 정자는 각각 62.4 ± 6.6 , 97.0 ± 1.2 , 97.1 ± 1.3 및 $92.8 \pm 2.0\%$ 였다. 한편 회수한 정자내 수정능획득정자 비율을 측정하기 위하여 조사한 침모반응율은 각각 68.7 ± 3.2 , 78.8 ± 4.3 , 85.1 ± 2.0 및 $83.6 \pm 3.5\%$ 였다.

정자의 회수율은 대조구에 비하여 난포액 처리구에서 높았으며, 난포액의 첨가수준이 증가할수록 높았으나 처리구간에는 유의한 차이가 없었다. 운동능을 가진 정자의 비율은 대조구에 비하여 처리구에서 높았으며, 처리구간에는 유의한 차이가 없었다. 침모반응율은 대조구에 비하여 10과 20%의 난포액 처리구가 유의하게 높았으며, 처리구간에는 유의한 차이가 없었다.

2. 난포액내 지질 및 단백질 성분이 정자의 운동성에 미치는 영향

난포액에서 추출한 지질성분과 단백질성분이 함유된 용액에서 swim-up separation에 의해 회수된 정자의 수, 운동정자 비율 및 침모반응율은 Table 2와 같다.

Table 1. Effect of bovine follicle fluid on number and quality of sperm recovered by swim-up separation

FF (%)	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)	Percentage of sperm acrosome-reacted (%)
0	10.5 ± 3.2^b	62.4 ± 6.6^b	68.7 ± 3.2^d
5	128.5 ± 8.0^a	97.0 ± 1.2^a	78.8 ± 4.3^{cd}
10	146.6 ± 14.4^a	97.1 ± 1.3^a	85.1 ± 2.0^c
20	177.0 ± 13.8^a	92.8 ± 2.0^a	83.6 ± 3.5^c

a, b : Significantly different at $p < 0.01$ in the same column.

c, d : Significantly different at $p < 0.05$.

Table 2. Effect of components in follicle fluid on number and quality of sperm recovered by swim-up separation

Treatment	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)	Percentage of sperm acrosome-reacted (%)
FF(10% ; control)	106.3 ± 10.5^c	93.4 ± 1.8^a	86.6 ± 3.5^a
Isooctane layer	10.1 ± 1.7^e	60.2 ± 4.3^b	74.5 ± 2.6^{ab}
Methanol layer	66.0 ± 7.1^d	85.8 ± 4.6^a	68.0 ± 3.3^b

a, b : Significantly different at $p < 0.01$ in the same column.

c, d, e : Significantly different at $p < 0.05$.

난포액(대조구)과 난포액으로부터 추출한 isooc-tane layer의 지질성분과 methanol layer의 단백질 성분을 함유한 용액에서 회수된 정자의 수는 106.3 ± 10.5 , 10.1 ± 1.7 및 $66.0 \pm 7.1 (\times 10^4)$ 였으며, 운동 정자의 비율은 93.4 ± 1.8 , 60.2 ± 4.3 및 $85.8 \pm 4.6\%$ 였으며, 점도반응정자의 비율은 각각 86.6 ± 3.5 , 74.5 ± 2.6 및 $68.0 \pm 3.3\%$ 였다.

정자 회수율은 단백질 성분 처리구가 대조구에 비하여 유의하게 낮았으며, 지질 성분 처리구에 비하여 유의하게 높았다. 운동정자의 비율은 단백질 성분 처리구가 대조구에 비하여 낮았으나 유의한 차이는 없었으며, 지질 성분 처리구에 비하여 유의하게 높았다. 점도반응율은 단백질 성분 처리구가 대조구에 비하여 유의하게 낮았으며 지질 성분 처리구에 비하여 낮았으나 유의한 차이가 없었으며, 한편 지질 성분 처리구는 대조구에 비하여 낮았으나 이들간에 유의한 차이는 없었다.

3. 단백질 성분 중 정자운동성에 영향을 미치는 물질의 분리와 정자의 운동성에 미치는 영향

난포액으로부터 추출한 단백질성분을 Sepadex G-10, G-25 및 G-100 gel로 여과하여 회수한 각 분

획을 함유하고 있는 용액에서 swim-up separation에 의해 회수한 정자의 수와 운동정자 비율은 Table 3과 같다.

G-10 Sepadex column을 이용하여 분리한 fraction(분획) I, II, III, IV, V 및 control에서 회수된 정자의 수는 각각 53.1 ± 6.2 , 7.3 ± 1.6 , 6.5 ± 0.8 , 4.1 ± 0.5 , 3.5 ± 0.6 및 $50.0 \pm 5.7 (\times 10^4)$ 로서 대조구와 분획 I이 다른 분획들에 비하여 유의하게 높았으며, 운동정자의 비율은 각각 90.2 ± 2.9 , 40.7 ± 5.1 , 41.1 ± 6.7 , 47.3 ± 5.1 , 32.6 ± 11.8 및 $86.7 \pm 2.6\%$ 로서 역시 대조구와 분획 I이 다른 분획에 비하여 유의하게 높았다. 한편 두 조사항목에 있어서 분획 I과 대조구간에는 유의한 차이가 없었다.

G-25 Sepadex column을 이용하여 분리한 분획 I과 II 및 control에서 회수한 정자의 수는 각각 39.8 ± 2.4 , 3.9 ± 1.4 및 $32.2 \pm 1.6 (\times 10^4)$ 로서 대조구와 분획 I은 분획 II에 비하여 유의하게 높았으며, 운동정자의 비율은 82.6 ± 2.0 , 15.7 ± 3.0 및 $76.6 \pm 2.5\%$ 로 역시 분획 I과 대조구가 분획 II에 비하여 유의하게 높았다. 한편 두 조사항목에 있어서 분획 I과 대조구간에는 유의한 차이가 없었다.

G-100 Sepadex column을 이용하여 분리한 분획

Table 3. Effect of fractions obtained from methanol layer on number and movement of sperm recovered by swim-up separation

Sepadex for gel filtration	Fractions	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)
G-10	I	53.1 ± 6.2^a	90.2 ± 2.9^a
	II	7.3 ± 1.6^b	40.7 ± 5.1^b
	III	6.5 ± 0.8^b	41.1 ± 6.7^b
	IV	4.1 ± 0.5^b	47.3 ± 5.1^b
	V	3.5 ± 0.6^b	32.6 ± 11.8^b
	Control*	50.0 ± 5.7^a	86.7 ± 2.6^a
G-25	I	39.8 ± 2.4^c	82.6 ± 2.0^a
	II	3.9 ± 1.4^e	15.7 ± 3.0^b
	Control	32.2 ± 1.6^d	76.6 ± 2.5^a
G-100	I	54.1 ± 2.6^a	72.6 ± 3.0^d
	II	20.5 ± 2.8^b	48.5 ± 6.4^e
	Control	46.7 ± 6.2^a	83.3 ± 2.3^c

* Control : Extract of methanol layer.

a, b : Significantly different at $p < 0.01$ in the same column and the same Sepadex gel.

c, d, e : Significantly different at $p < 0.05$ in the same column and the same Sepadex gel.

I 과 II 및 control에서 회수한 정자의 수는 각각 54.1 ± 2.6 , 20.5 ± 2.8 및 $46.7 \pm 6.2 (\times 10^4)$ 로서 분획 I 과 대조구가 분획 II에 비하여 유의하게 높았으며 분획 I 과 대조구간에는 유의한 차이가 없었다. 운동정자의 비율은 각각 72.6 ± 3.0 , 48.5 ± 6.4 및 $83.3 \pm 2.3\%$ 로서 분획 I은 대조구에 비하여 유의하게 낮았으나, 분획 II보다 유의하게 높았다.

G-10, G-25 및 G-100 gel을 이용하여 분리한 분획 I은 다른 분획들에 비하여 정자의 회수율과 운동 정자의 비율이 높았으며, methanol layer의 단백질 성분(대조구)과 유사한 운동 활성효과를 나타내었다. 단 G-100 gel을 이용하여 회수한 분획 I에서 만 대조구에 비하여 운동정자비율이 유의하게 낮았다.

4. 단백질 추출물과 gel filtration 분획의 전기영동상

난포액로부터 회수한 methanol 추출물과 Sepadex G-10, G-25 및 G-100 gel을 이용하여 얻은 각각의 분획 I 과 II를 전기영동하여 얻은 결과는 Figs. 3, 4와 같다.

Coomassie brilliant blue staining에서 분획 I로부터 약 47, 43, 25와 14 kilodaltons의 4 bands를 얻



Fig. 3. Proteins of follicle fluid were separated in 0.75mm thick SDS-PAGE gel and stained according to Coomassie brilliant blue staining protocol. Standard proteins, HMW and LMW, show their sizes in kilodaltons. The arrows in the photograph indicate major bands.

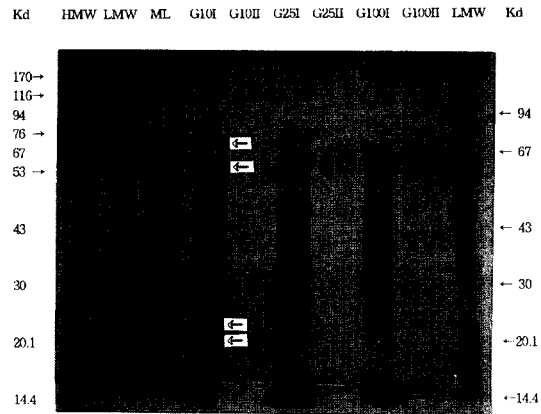


Fig. 4. Proteins of follicle fluid were separated in 0.75mm thick SDS-PAGE gel and stained according to Silver staining protocol. Standard proteins, HMW and LMW, showed their sizes in kilodaltons. The arrows in the photograph indicate minor bands.

었으나, 분획 II에서는 전혀 band를 얻지 못하였다 (Fig. 3). 한편, Silver staining에서는 분획 I로부터 Coomassie blue 염색에서는 나타나지 않았던 약 67, 58, 23, 22 및 21 kilodaltons의 5 bands가 더 얻어졌으며, 분획 II에서도 68~58 kilodaltons 사이에 흐린 band의 영역이 나타났다(Fig. 4).

Sepadex G-10, G-25 및 G-100 gel에서 회수한 분획 I에서 모두 동일한 major band를 나타내었다. 한편 minor band에 있어서 G-10과 G-25 gel의 분획과는 달리 G-100 gel를 이용한 분획 I에서 67 kilodaltons 부근의 band가 결여되었다.

고 찰

체내 수정시 예상되는 정자의 이동을 고려하여 swim-up separation방법을 이용한 본 연구에서 난포액이 회수된 정자의 수와 운동 정자 비율 및 수정능 획득 정자의 비율을 증가시켰다. 이러한 결과는 배란 전 난포액이 정자를 활성화하고 유인하는 능력을 가지고 있다고 보고한 Ralt 등(1991)과 Villan-

ueva-Diaz 등(1992)의 결과와 일치한다. 이러한 난포액의 정자활성 능력은 희석정도에 따라 활성화에 차이가 있었는데, 이 중에서 10%의 난포액 처리가 정자의 회수율, 운동 정자 비율 및 수정능 획득 정자 비율을 고려할 때 정자의 선별에 가장 효과적인 것으로 나타났다. Ralt 등(1994)도 난포액이 정자 유인 효과를 직접하게 발휘하기 위해서는 정자를 전배양하여 수정능 획득을 유도하고 난포액을 적절히 희석하여야 한다고 보고한 바 있다.

난포액으로부터 추출한 methanol layer에서 회수한 단백질 성분이 isoctane layer에서 회수한 지질성분에 비하여 높은 정자 회수율과 운동정자의 비율을 나타냄으로서, 난포액으로부터 methanol에서 추출된 단백질 성분은 정자의 운동을 촉진하는 것으로 추론할 수 있다. 한편, 난포액에 비하여 추출한 단백질 성분에서 정자 활성 효과가 다소 저하되었는데, 이는 methanol 추출과정에서 단백질이 변성되었거나 여과하는 과정에서 일부 성분이 제거되었기 때문인 것으로 사료된다. 한편 isoctane layer 추출물의 처리에서 정자의 회수율과 활력은 낮았으나 침모반응율이 높게 나타났는데, 이는 직경 10mm 내외의 난포로부터 회수한 난포액내에 함유되어 있는 지질성분에 의한 것으로 추론되며, 박(1996)은 지질성분중 progesterone이 수정능 획득한 정자를 유인효과가 있다고 보고한 바 있다.

난포액의 단백질성분으로부터 단백질성분의 정자 운동활성능을 모두 함유하고 있으며, 전기영동 후 1 ug까지 측정 가능한 Coomassie brilliant blue staining에서 4개의 major band가 나타났고, 2~5 ng까지 측정 가능한 Silver staining에서 5개의 minor band가 더 얻어졌다. 따라서 난포액의 단백질 성분으로부터 분리한 분획 I은 9종 이상의 단백질로 구성되어 있으며, 이들은 정자의 운동성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

분획 I의 정자 운동 활성능이나 전기영동상에 있어서 Sepadex G-10, G-25 및 G-100 gel간에 차이가 있었다. 즉, G-100 gel에서 회수한 분획 I에서의 운동 정자 비율은 단백질성분에 의한 운동 정자 비율보다 유의하게 낮았으며, G-100 gel의 분획 I은 67 kilodaltons의 band에 해당하는 단백질을 함유하고 있지 않았다. 따라서 이 band에 해당하는 단백질은 정자의

운동 활성화와 관련이 있는 것으로 추론된다.

한편 Table 3에서 제시한 것처럼 G-100gel 분획 I은 대조구보다 운동 정자 비율이 낮았으나 분획 II 보다 높았다. 따라서 67 kilodaltons 단백질 이외의 다른 band에 해당하는 단백질도 정자의 운동성에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 따라서 분획 I의 구성분 중 어떤 분자량의 단백질이 정자의 운동성에 직접 영향을 미치는지는 추후 더 연구되어야 하며, 아울러 Silver staining에서 band의 흔적만을 남기고 있는 분획 II에 대한 연구도 필요한 것으로 사료된다.

결론적으로 난포액에는 정자의 운동성에 영향을 미치는 단백질 성분을 함유하고 있으며, 이중 gel filtration에 의해 얻은 분획 I은 분획 II와 달리 정자의 운동을 자극하는 활성을 가지고 있으며, 4종의 major 단백질과 5종의 minor 단백질로 구성되어 있다. 특히 67 kilodaltons 부근의 단백질은 정자의 운동을 자극하는 활성이 있는 것으로 추정된다.

적 요

배란시 난관에 유입되는 난포액은 수정에 참여하는 정자의 운동성에 영향을 미칠 것이다. 따라서 본 연구에서는 10mm 직경의 난포에서 회수한 난포액이 swim-up separation에 의해 회수한 정자의 수와 질에 미치는 영향을 조사하였고, 나아가서 정자의 운동성에 영향을 미치는 난포액내 성분을 methanol과 isoctane으로 추출한 다음, Sepadex G-10, G-25 및 G-100 gel을 이용한 gel filtration으로 분리하였고 SDS-page mini gel을 이용한 전기영동으로 동정하였다.

얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 난포액은 적당 희석됨으로서 정자의 운동을 촉진하였다.
2. 난포액내 정자 운동 활성인자는 methanol 추출물에 함유되어 있다.
3. Methanol 추출물의 정자 활성 효과는 gel filtration에서 얻어진 분획 I에서 나타났다. 분획 I은 약 47, 43, 25 및 14 kilodaltons 등 4개의 major bands와 약 67, 58, 23, 22 및 21 kilodaltons 등 5개의 minor bands에 해당하는

단백질로 구성되어 있다.

4. Sepadex G-100 gel로 회수한 분획 I에서는 운동정자비율이 유의하게 낮았으며, 이 분획 I은 67 kilodaltons에 해당하는 단백질을 함유하고 있지 않았다.

참고문헌

- Fetterolf PM, Sutherland CS, Josephy PD, Casper RF and Tyson JE. 1994. Preliminary characterization of a factor in human follicular fluid that stimulates human spermatozoa motion. *Hum-Reprod.* 9(8):1505-11.
- Marrisey JH. 1981. Silver stain for proteins in polyacryamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117:307-310.
- Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Ben-Shlomo I, Makler A, Yuli I, Dor J, Blumberg S and Mashiach S. 1994. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol-Reprod.* 50(4):774-85.
- Ralt D, Goldenberg M, Fetterolf P, Thompson D, Dor J, Mashiach S, Garbers DL, Eisenbach M. 1991. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 88:2840-2844.
- Sliwa L. 1995. Effect of some sex steroid hormones on human spermatozoa migration *in vitro*. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 58(2):173-5.
- Vadillo-Ortega F, Villanueva-Diaz C, Arias-Martinez QB, Bermejo L and Bustos-Lopez H. 1994. Chemotactic factor for spermatozoa: a new biological function of progesterone. *Gynecol-Obstet-Mex.* 62:127-30.
- Villanueva-Diaz C, Arias-Martinez J, Bermejo-Martinez L and Vadillo-Ortega F. 1995. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil-Steril.* 64(6):1183-8.
- Wilson CM. 1983. Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods in Enzymol.* 41:236-247.
- 박영식. 1996. Progesterone과 BSA를 이용한 동결 정액내 정자의 선별. *한국수정란이식학회지.* 11:309-316.
-
- (접수일자 : 1997. 7. 30 / 채택일자 : 1997. 8. 24)