

Chromatography용 Paper, μ RPC Column 및 Superose Column을 이용한 정자의 이동을 자극하는 난포액 성분의 분리

박 영 식
경북대학교 농과대학

Separation of Follicular Fluid Components Stimulating Sperm Migration with Chromatographic Paper, μ RPC and Superose Columns

Y. S. Park
College of Agriculture, Kyungpook National University

SUMMARY

To efficiently separate a protein stimulating sperm swim-up migration and movement from follicular proteins, the effect of paper chromatography and liquid chromatography with reverse phase column and superose column on protein separation was examined. And the results obtained were as follows;

1. The band component that was separated with paper chromatography stimulated sperm migration and movement depending on its additional levels. Especially, band I component significantly increased sperm migration. But, all components of bands 1, 2 and 3 showed lower sperm migration and movement, compared to follicular fluid at the same additional level.
2. Among the components separated from follicular protein of 2~5mm follicles with reverse phase column (μ RPC), components at retention time (RT) of 3.33, 7.00, 13.87, and 16.6A minutes stimulated sperm migration within a limited range.
3. All components separated from follicular protein of 10mm follicles with μ RPC column didn't stimulate sperm migration and movement.
4. Among the components separated from follicular protein of 2~5mm follicles with superose column, components at retention volume (RV) of 1.35 and 0.82 ml significantly stimulated sperm migration and movement.

In conclusion, protein components stimulating sperm migration and movement were efficiently separated with superose column in Smart system. Especially, components of RV 1.35 and RV0.82 stimulated sperm swim-up separation.

(Key words: paper chromatography, liquid chromatography, reverse phase column, superose column, follicular fluid, protein, sperm selection, swim-up migration, movement, capacitation, sucrose layer)

본 연구는 학술진흥재단에서 지원하는 연구비(1997)로 수행되었음.

서 론

난포액은 정자의 활력 (Chao 등, 1991; Nichol 등, 1997), 운동속도 (Falcone 등, 1991), 및 이동 (Arnal 등, 1983)을 자극할 뿐아니라 수정능획득 정자를 유인하는 것으로 알려져 있다 (Cohen-Dayag 등, 1994; Ralt 등, 1991; Villanueva-Diaz 등, 1992; 박, 1997).

난포액 성분에 관한 연구로서 Ralt 등 (1994)은 Centricon microconcentrator (Amicon, Danvers, MA)로 부분 분리하고 acetone으로 침적하여 회수한 비소수성의 10Kd 이하의 정자유인물질을 분리하였으며, Fetterolf 등 (1994)은 thin layer chromatography와 C18 reverse phase column을 이용하여 정자의 운동을 자극하는 1Kd 이하의 단백질을 보고하였다. 또한 Ramsoondar 등 (1995)은 gel filtration column을 이용 난포액으로부터 정자유인물질을 분리하였다. Ravnik 등 (1992)은 여러 단계의 sepharose column과 cellulose column을 이용하여 정자 유인능을 가진 지질수송 단백질을 분리하였으며, Lee 등 (1992)은 heparin-agarose column을 이용 정자의 운동과 화학적 주성을 유발하는 antithrombin III를 돼지 난포액으로부터 분리하였다. 한편 박 (1997)은 sephadex column을 이용 난포액내 정자운동 자극물질을 동정한 바 있다.

정자의 이동과 운동을 자극하고 수정능획득 정자를 유인하는 난포액 성분에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 정자의 양적 선별에 요구되는 난포액 성분의 분리를 위한 연구는 없었으며, 따라서 본 연구에서는 chromatography용 paper (3MM, Whatman Co.), reverse phase chromatography (RPC) column 및 superose column을 이용 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리를 유도할 수 있는 난포액내 단백질 성분을 분리하고 분리된 성분이 정자의 선별에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 정자 선별용 기초용액의 준비

정액의 회석과 정자의 세척 및 배양을 위하여 NaCl 108mM, 4.5mM KCl, 1.0mM KH_2PO_4 , 4.15mM NaHCO_3 , 20.85mM HEPES, 3.0mM CaCl_2 , 0.9mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 23.28mM Na-lactate, 0.3mM Na-pyruvate, 5.0mM glucose를 첨가하고 pH 7로 조정된 정자선별용 기초용액 (basic medium for sperm selection, bMSS)을 준비하였다.

2. 난포액의 회수와 보존

신선한 난소에 있는 직경이 2~5mm인 난포와 직경이 10mm인 성숙난포로부터 난포액을 회수하여 2,000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리후 상등액만을 회수하여 실험에 사용할 때까지 -40°C 에서 동결 보존하였다.

3. 단백질성분의 추출

동결보존된 난포액을 용해하여 0°C 로 냉각하였다. 냉각한 난포액에 5배의 methanol을 점점이 첨가한 다음 methanol의 2배가 되도록 isoctane을 추가하고 충분히 혼합하였다. 혼합액을 30분간 냉장실에 보관하여 층 분리를 유도한 다음 단백질이 함유되어 있는 methanol층만을 회수하여 $0.45 \mu\text{m}$ 공극의 filter로 여과하였다. 여과액내 methanol을 질소가스로 충분히 휘발시킨 다음 여과액을 저온건조기에서 건조하였다. 건조된 분말을 난포액 원액의 1/10배가 되도록 bMSS로 희석한 다음 실험 1의 계획에 따라 직접 사용하거나, 실험 2와 실험 3의 계획에 따라 $0.45 \mu\text{m}$ 공극의 filter을 이용 여과한 다음 사용하였다.

4. 실험설계

1) 실험 1; Paper chromatography (PC)에 의한 난포액 단백질 성분의 분리와 분리성분의 효과 직경이 2~5mm인 난포로부터 추출하여 농축 ($10\times$)한 단백질 추출물을 chromatography용 paper (3MM, Whatman, Co.)에 점적하고 질소가스로 건조한 다음 propanol-25% acetic acid (2:1) 용액에서 1시간 동안 전개한 후 질소가스로 건조시켰다. 건조된 paper의 양단을 절단하여 0.3g ninhydrin을 100ml의 ethanol에 용해하고 3ml의

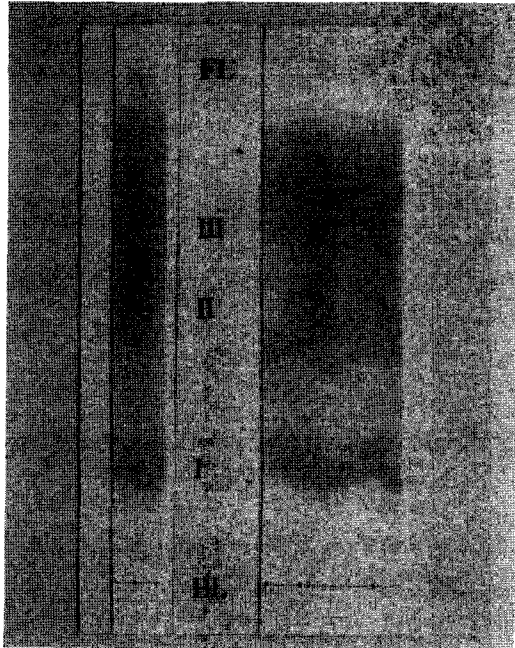


Fig. 1. Separation of proteins obtained from follicular fluid with paper chromatography. Methanol extract on chromatographic paper (3MM, Whatman) was propagated with propanol-25% acetic acid (2:1) for 1.5 hours. Bands I, II, and III were shown between frontal line (FL) and basal line (BL) after ninhydrin staining. Protein extracts of Bands I, II, and III were examined about their effects on sperm swim-up separation in experiment 1. The result was shown in Table 1.

acetic acid을 첨가하여 제조한 ninhydrin 염색용액을 분무하고 질소가스로 건조시킨 다음 hot plate 위에서 band가 발현되도록 가열하였다 (Fig. 1). 확인된 band들을 고려하여 남은 paper에서 동일한 부위를 절단하고 20% methanol 용액으로 3회 세척하여 단백질 성분을 회수하였으며, 회수한 성분을 질소가스로 건조한 다음 bMSS로 회석하였다. 이때, 난포액으로부터 분리한 단백질 성분이 첨가수준에 따라 정자의 swim-up 분리에 미치는 효과를 조사하기 위하여, 5% 난포액에 해당하는 각 band 성분이 첨가된 bMSS (세부실험 I), 10% 난포액에 해당하는 각 band 성분이 첨가된 bMSS (세부실험 II), 20% 난포액에 해당하는 각 band 성분이 첨가된 bMSS (세부실험 III), 및 10%의 난포액과 10% 난포액에 해당하는 band 1, 2, 및 3의 성분이 모두 첨가된 bMSS (세부실험 IV)를 준비하였다.

준비된 용액을 15ml 원심분리관에 각각 980 μ l를 주입하고 36 $^{\circ}$ C에서 10분간 온도를 평형시켰다. 한편, 액체질소에서 동결 보존된 소 정액을 공기 중에서 7초간 방치한 다음 36 $^{\circ}$ C 항온수조에서 20초간 용해하였다. 용해한 정액을 15ml 원심분리관에 옮기고 bMSS로 5배 희석하였다. 희석한 정액을 1500rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 10mM의 sucrose가 함유된 bMSS 60 μ l를 첨가하여 정자펠릿을 재부유하였다. 재부

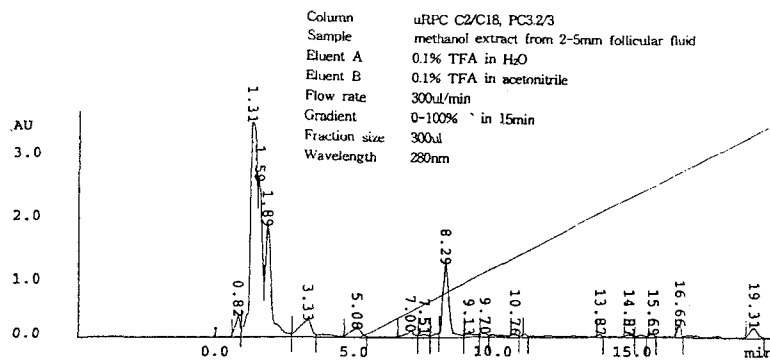


Fig. 2. Separation of proteins obtained from ϕ 2-5mm follicles with μ RPC C2/18. Protein fractions of major peaks were examined about their effects on sperm swim-up separation in experiment 2. The result was shown in Table 2.

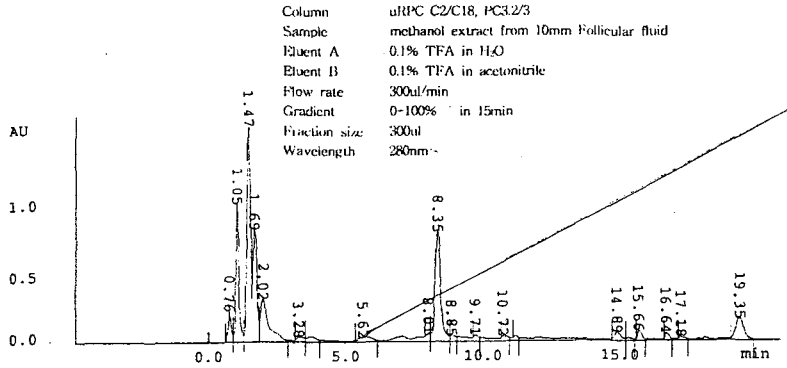


Fig. 3. Separation of proteins obtained from ϕ 10mm follicles with μ RPC C2/18. Protein fractions of major peaks were examined about their effects on sperm swim-up separation in experiment 2. The result was shown in Table 3.

유한 정액 20 μ l를 미리 준비한 용액 980 μ l의 아래에 주입한 다음 36 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 배양후 상층액 500 μ l를 회수하여 장액성상검사판을 이용 정자의 수와 운동정자의 비율을 측정하였다.

2) 실험 2: μ RPC column을 이용한 난포액 단백질 성분의 분리와 분리성분의 효과

직경이 2~5mm 및 10mm인 난포로부터 추출하여 농축(10 \times)한 단백질 추출물을 0.45 μ m 공극을 이용하여 여과한 다음 μ RPC C3/18 column이 장착된 Smart system (Pharmacia, Sweden)에 30 μ l를 주입하였다. 두 종류의 관류액을 분당 300 μ l 속도로 흘려 구성분을 분리하였는데, 먼저 Eluent 1 (0.1% TFA, ddH₂O로 용해)을 5분간 관류시킨 다음 15분간에 걸쳐 Eluent 2 (0.1% TFA, acetonitril로 용해)를 0%에서 100%까지 점차 농도를 증가시키면서 관류시켰다. 단백질 성분은 peak (Fig. 2과 Fig. 3)에 따라 자동 분획되었으며, 회수된 분질은 저온에서 진공 건조하였다. 건조된 분말은 10% 난포액에 해당하도록 bMSS로 용해하였으며, 실험 1과 동일한 방법으로 각 peak 성분이 정자의 swim-up 분리에 미치는 효과를 조사하였다.

3) 실험 3: Superose column (SC)을 이용한 난포액 단백질 성분의 분리와 분리성분의 효과

직경이 2~5mm인 난포로부터 추출하여 농축(10 \times)한 단백질 추출물을 0.45 μ m 공극을 이용하여 여과한 다음 superose 12 column이 장착된 Smart system에 30 μ l를 주입하였다. 관류액 (0.05M Na₂HPO₄, pH 7.4, 0.15M NaCl)을 분당 40 μ l 속도로 관류하여 단백질 성분을 분리하였는데, 분리된 구성분은 peak (Fig. 4)에 따라 자동 분획되었으며, 회수된 분질은 저온에서 진공 건조하였다. 건조된 분말은 10% 난포액에 해당하도록 bMSS로 용해하였으며, 실험 1과 동일한 방법으로 각 peak 성분이 정자의 swim-up 분리에 미치는 효과를 조사하였다.

5. 통계처리

반복처리에 의해 얻어진 결과는 분산분석 (ANOVA)에 의해 통계 처리하여 mean \pm SE (standard error)로 표시하였으며, Dunkun 다중검정에 의해 처리간 차이의 유의성을 검정하였다. 이러한 유의성 검정의 결과는 p<0.05 또는 p<0.01로 표기하였는데, 이는 처리간에 5% 또는 1% 수준에서 유의한 차이가 있음을 의미한다.

결과 및 고찰

1. Chromatograph용 paper를 이용 난포액에서 분리한 band 성분의 효과

난포액에서 추출한 단백질성분을 chromato-

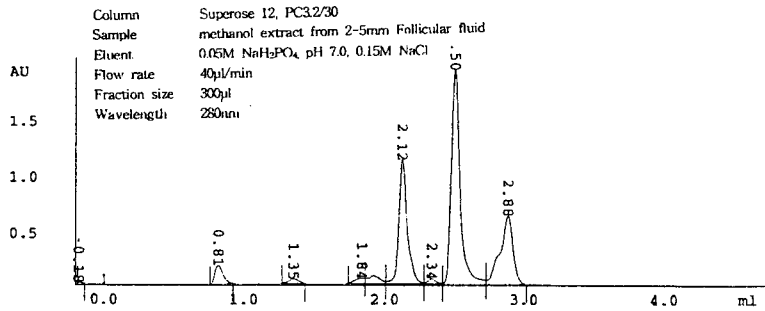


Fig. 4. Separation of proteins obtained from ϕ 2~5mm follicles with superose 12 column. Protein fractions of major peaks were examined about their effects on sperm swim-up separation in experiment 3. The result was shown in Table 4.

graph용 paper로 분리하여 회수한 band내 성분이 첨가농도에 따라 정자의 swim-up 분리에 미치는 영향을 조사하였던 바 얻어진 결과는 Table 1과 같다.

세부실험 I에서 bMSS (control), 5% 난포액에 해당하는 Band 1, Band 2, 및 Band 3 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 7.7 ± 2.5 , 22.0 ± 9.3 , 14.5 ± 5.6 , 및 $10.5 \pm 7.8 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 46.5 ± 15.8 , 61.0 ± 0.9 , 77.6 ± 10.9 , 및 $72.7 \pm 14.6\%$ 였다. 회수된 정자의 수는 Band 1 첨가구가 가장 높았으나 다른 첨가구 또는 대조구와 유의한 차이는 없었다. 또한 회수된 정자중에서 운동정자의 비율도 Band 성분의 첨가구가 대조구보다 높았으나 유의한 차이는 없었다. 즉, 5%의 난포액 수준으로 첨가된 Band 1, 2, 및 3 성분은 정자의 이동과 운동성을 유의하게 자극하지 않았다.

세부실험 II에서 bMSS (control), 10% 난포액에 해당하는 Band 1, Band 2, 및 Band 3 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 7.3 ± 5.9 , 39.0 ± 7.0 , 32.3 ± 12.2 , 및 $14.3 \pm 6.9 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 28.1 ± 25.1 , 80.0 ± 5.7 , 45.6 ± 23.0 및 $84.6 \pm 4.4\%$ 였다. 회수된 정자의 수는 Band 1 성분의 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, Band 2와 Band 3 성분 첨가구보다 높았으나 유의한 차이가 없었다. 운동정자의 비율은 Band 1 과 Band 3 성분의 첨가구가 Band 2 성분 첨가구

와 대조구에 비하여 높았으나 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이상의 결과로부터 10% 난포액 수준으로 첨가한 Band 1 성분은 정자의 이동을 유의하게 자극하였다.

세부실험 III에서 bMSS (control), 난포액 20% 수준의 Band 1, Band 2, 및 Band 3 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 1.8 ± 0.9 , 39.7 ± 4.3 , 20.7 ± 3.4 및 $22.2 \pm 3.6 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 42.2 ± 21.2 , 73.6 ± 5.9 , 77.7 ± 3.6 및 $70.8 \pm 1.5\%$ 였다. 회수된 정자의 수는 각 Band 성분의 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, 첨가구중에서 Band 1 성분 첨가구가 유의하게 높았다. 운동정자의 비율은 Band 성분의 첨가구가 대조구에 비하여 높았으나 유의한 차이는 없었다. 즉, Band 1, 2 및 3 성분을 난포액 20% 수준으로 첨가하였을 때, 각 성분은 정자의 이동을 유의하게 자극하였으며, 특히 정자의 이동을 자극하는 물질은 Band 1에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 추론된다.

세부실험 IV에서 bMSS (control), 10% 난포액을 함유한 bMSS (FF), 및 난포액 10% 수준에 해당하는 Band 1, Band 2, 및 Band 3 성분을 모두 첨가한 bMSS (Bands)로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 3.3 ± 2.4 , 73.3 ± 4.4 , 및 $11.2 \pm 2.9 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 20.8 ± 11.0 , 97.5 ± 1.2 및 $78.2 \pm 7.7\%$ 였다. 회수된 정자의 수는 병용첨가구 (Bands)가 대조구

Table 1. Effect of bands 1, 2 or/and 3 seperated from methanol extract of follicular fluid with paper chromatography (PC) on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration at the same additional levels as 5% (I), 10% (II, IX), 20% (III) follicular fluid

Trials	Treatment	No. of sperm recovered($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)
I	Control	7.7 \pm 2.5	46.5 \pm 15.8
	Band 1	22.0 \pm 9.3	61.0 \pm 0.9
	Band 2	14.5 \pm 5.6	77.6 \pm 10.9
	Band 3	10.5 \pm 7.8	72.7 \pm 14.6
II	Control	7.3 \pm 5.9 ^c	28.1 \pm 25.1
	Band 1	39.0 \pm 7.0 ^d	80.0 \pm 5.7
	Band 2	32.3 \pm 12.2 ^{cd}	45.6 \pm 23.0
	Band 3	14.3 \pm 6.9 ^{cd}	84.6 \pm 4.4
III	Control	1.8 \pm 0.9 ^e	42.2 \pm 21.2
	Band 1	39.7 \pm 4.3 ^c	73.6 \pm 5.9
	Band 2	20.7 \pm 3.4 ^d	77.7 \pm 3.6
	Band 3	22.2 \pm 3.6 ^d	70.8 \pm 1.5
IV	Control	3.3 \pm 2.4 ^b	20.8 \pm 11.0 ^d
	FF	73.3 \pm 4.4 ^a	97.5 \pm 1.2 ^c
	Bands	11.2 \pm 2.9 ^b	78.2 \pm 7.7 ^c

*Superscripts ^a and ^b mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.01$.

**Superscripts ^{cd} and ^e mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

(control)에 비하여 높았으나 유의한 차이가 없었으며, 난포액 첨가구 (FF)에 비하여 유의하게 낮았다. 운동정자의 비율은 병용첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며 난포액 첨가구에 비하여 낮았으나 유의한 차이는 없었다. 즉, 난포액과의 비교에서 PC로 분리한 성분들은 정자의 이동을 충분히 자극하지 않았으나 정자의 운동을 자극하였으며, 따라서 PC로 분리된 난포액성분에는 정자의 운동성을 자극하는 성분이 난포액 수준으로 함유되어 있는 것으로 추론된다. 한편, 세부실험 I, II, III 및 IV 대조구에서 운동정자 비율의 표준오차가 크게 나타났는데, 이는 정자의 운동성을 평가하기 위해 회수된 정자의 수가 적었기 때문인 것으로 사료된다.

결론적으로 chromatography용 paper로 분리한 난포액 단백질 성분에는 정자의 이동과 운동성을 자극하는 성분이 있으나, 각 band에 함유되어 있는 이들의 농도는 난포액에서보다 매우 적었으며, 즉, 분리과정에서 소실되거나 변형되는 것으로 추

론된다. 따라서, 난포액내 정자 유인물질을 분리하는 데 있어서 paper chromatography는 적절하지 않는 것으로 사료된다.

2. Micro reverse phase column (μ RPC)을 이용 분리한 2~5mm 난포액 성분의 효과

직경이 2~5mm인 난포의 난포액으로부터 추출한 단백질성분을 μ RPC으로 분리하여 회수한 각 성분이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up분리에 미치는 영향을 조사하였던 바, 얻어진 결과는 Table 2와 같다.

세부실험 1에서 bMSS (control), RT0.82, RT 1.31, 및 RT1.59 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 3.0 \pm 1.5, 6.0 \pm 2.1, 6.7 \pm 1.8, 및 4.7 \pm 0.9 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 88.9 \pm 11.1, 86.7 \pm 8.3, 75.6 \pm 12.4, 및 71.1 \pm 4.4 % 였다. 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율에서 첨가구와 대조구간에 유의한 차이는 없었다. 즉, RT0.82, RT1.31 및

Table 2. Effect of protein fractions separated from methanol extract of 2~5mm follicular fluid with micro reverse phase column (μ RPC) on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration at the same additional level as 10% follicular fluid

Trials	Fraction	No. of sperm recovered (mean \pm SE)	Percentage of motile sperm (mean \pm SE)
I	Control	3.0 \pm 1.5	88.9 \pm 11.1
	RT0.82	6.0 \pm 2.1	86.7 \pm 8.3
	RT1.31	6.7 \pm 1.8	75.6 \pm 12.4
	RT1.59	4.7 \pm 0.9	71.1 \pm 4.4
II	Control	1.0 \pm 0.0 ^b	66.7 \pm 33.3
	RT1.89	2.3 \pm 1.3 ^{ab}	93.3 \pm 6.7
	RT3.33	3.3 \pm 0.3 ^a	77.8 \pm 11.1
	RT5.08	1.0 \pm 0.0 ^b	66.7 \pm 33.3
III	Control	1.7 \pm 0.3 ^d	94.5 \pm 5.3
	RT7.00	8.0 \pm 1.7 ^c	87.3 \pm 6.4
	RT7.51	2.0 \pm 1.0 ^d	70.0 \pm 30.0
	RT7.95	1.7 \pm 0.3 ^d	81.3 \pm 15.9
IV	Control	5.0 \pm 1.7	61.7 \pm 7.3
	RT8.29	7.0 \pm 1.0	85.0 \pm 7.6
	RT9.13	8.0 \pm 2.5	84.2 \pm 8.2
	RT9.70	1.6 \pm 0.3	83.3 \pm 16.7
V	Control	3.7 \pm 1.2 ^d	94.4 \pm 5.6
	RT10.76	6.3 \pm 1.5 ^{cd}	87.0 \pm 6.7
	RT11.15	8.0 \pm 1.7 ^{cd}	92.4 \pm 7.6
	RT13.87	9.0 \pm 1.2 ^c	76.1 \pm 7.8
VI	Control	4.7 \pm 2.7	94.9 \pm 5.1
	RT14.87	6.0 \pm 2.0	76.7 \pm 14.5
	RT15.26	4.3 \pm 0.9	77.8 \pm 14.7
	RT15.69	3.3 \pm 0.9	83.3 \pm 16.7
VII	Control	4.3 \pm 1.7 ^b	83.3 \pm 9.6
	RT16.6A	22.0 \pm 2.0 ^a	76.8 \pm 7.2
	RT16.6B	6.0 \pm 1.5 ^b	69.2 \pm 9.7
	RT19.31	8.0 \pm 0.6 ^b	80.0 \pm 1.5

* RT : Retention time (minutes)

** Superscripts ^a and ^b mean that treatments in the same column are significantly different at p<0.01.

*** Superscripts ^c and ^d mean that treatments in the same column are significantly different at p<0.05.

RT1.59 성분은 정자의 이동과 운동성에 영향을 미치지 않았다.

세부실험 2에서 bMSS(control), RT1.89, RT 3.33, 및 RT5.08 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 1.0 \pm 0.0, 2.3 \pm 1.3, 3.3 \pm 0.3 및 1.0 \pm 0.0 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 66.7 \pm 33.3, 93.3 \pm 6.7, 77.8 \pm 11.1 및 66.7 \pm 33.3 % 였다. 회수된 정자의 수는 RT3.33 성분 첨가구가 대조구에 비하여 유의

하게 높았으며, RT1.89와 RT5.08 성분 첨가구는 대조구와 유의한 차이가 없었다. 운동정자의 비율도 첨가구와 대조구간에 유의한 차이가 없었다. 즉, RT3.33 성분은 정자의 이동을 자극하였으나, 난포액의 효과에 비해 자극효과는 매우 적었다.

세부실험 3에서 bMSS (control), RT7.00, RT 7.51, 및 RT7.95 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 1.7 \pm 0.3, 8.0 \pm 1.7, 2.0 \pm 1.0, 및 1.7 \pm 0.3 $\times 10^4$ 였으며,

Table 3. Effect of protein fractions separated from methanol extract of 10mm follicular fluid with μ RPC on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration at the same additional level as 10% follicular fluid

Trial	Fraction	No. of sperm recovered (mean \pm SE)	Percentage of motile sperm (mean \pm SE)
I	Control	5.0 \pm 2.4	28.4 \pm 10.5
	*RT0.76	7.1 \pm 4.0	52.7 \pm 9.0
	RT1.05	8.9 \pm 6.6	33.7 \pm 14.1
	RT1.47	2.9 \pm 1.0	27.1 \pm 15.7
	RT1.69	4.0 \pm 2.2	20.8 \pm 7.9
	RT2.02	1.9 \pm 0.8	46.9 \pm 21.9
II	Control	10.3 \pm 2.7	50.8 \pm 7.5
	RT3.28	12.5 \pm 5.6	58.5 \pm 6.9
	RT3.77	5.1 \pm 1.3	55.4 \pm 8.6
	RT5.62	7.6 \pm 0.7	49.0 \pm 2.6
	RT7.09	11.1 \pm 3.6	44.8 \pm 5.4
	RT8.01	8.8 \pm 2.6	37.1 \pm 8.0
III	Control	21.3 \pm 2.9	47.4 \pm 3.7
	RT8.35	16.3 \pm 1.6	50.6 \pm 2.4
	RT8.85	12.0 \pm 2.6	53.6 \pm 6.3
	RT9.71	15.9 \pm 1.9	48.6 \pm 9.6
	RT10.72	14.0 \pm 2.6	51.1 \pm 4.6
	RT14.89	13.3 \pm 3.1	49.5 \pm 5.3
IV	Control	20.9 \pm 4.2 ^c	45.5 \pm 5.9 ^d
	RT15.30	12.9 \pm 2.8 ^d	51.6 \pm 3.6
	RT15.66	18.6 \pm 3.6 ^c	55.0 \pm 5.1 ^d
	RT16.64	16.1 \pm 2.3 ^c	57.4 \pm 4.0 ^d
	RT17.18	23.3 \pm 2.7 ^c	47.8 \pm 6.1
	RT19.35	21.3 \pm 3.2 ^c	59.3 \pm 5.1

* RT: Retention time (minutes)

** Superscripts ^c and ^d mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

운동정자의 비율은 각각 94.5 \pm 5.3, 87.3 \pm 6.4, 70.0 \pm 30.0, 및 81.3 \pm 15.9 % 였다. 회수된 정자의 수는 RT7.00 성분 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, RT7.51과 RT7.95 성분 첨가구와 대조구간에는 유의한 차이가 없었다. 운동정자의 비율은 첨가구와 대조구간에 유의한 차이가 없었다. 즉, RT7.00 성분은 정자의 이동을 자극하였으나, 난포액의 효과에 비하여 자극효과는 매우 적었다.

세부실험 4에서 bMSS (control), RT8.29, RT9.13 및 RT9.70 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 5.0 \pm 1.7, 7.0 \pm 1.0, 8.0 \pm 2.5, 및 1.6 \pm 0.3 $\times 10^4$ 였으며,

운동정자의 비율은 각각 61.7 \pm 7.3, 85.0 \pm 7.6, 84.2 \pm 8.2 및 83.3 \pm 16.7 % 였다. 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율에서 첨가구와 대조구간에 유의한 차이는 없었다. 즉, RT8.29, RT9.13, 또는 RT9.70 성분은 정자의 이동과 운동성에 영향을 미치지 않았다.

세부실험 5에서 bMSS (control), RT10.76, RT11.15, 및 RT13.87 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 3.7 \pm 1.2, 6.3 \pm 1.5, 8.0 \pm 1.7, 및 9.0 \pm 1.2 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 94.4 \pm 5.6, 87.0 \pm 6.7, 92.4 \pm 7.6, 및 76.1 \pm 7.8% 였다. 회수된 정자의 수는 RT13.87 성분 첨가구가 대조구에 비하여 유

의하게 높았으나, RT10.76와 RT11.15 성분 첨가구와 대조구간에 유의한 차이가 없었다. 즉, RT13.87성분은 정자의 이동을 자극하였으나, 난포액의 효과에 비하여 자극효과는 매우 적었다.

세부실험 6에서 bMSS(control), RT14.87, RT15.26, 및 RT15.69 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 4.7 ± 2.7 , 6.0 ± 2.0 , 4.3 ± 0.9 , 및 $3.3 \pm 0.9 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 94.9 ± 5.1 , 76.7 ± 14.5 , 77.8 ± 14.7 , 및 83.3 ± 16.7 % 였다. 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율에서 첨가구와 대조구간에 유의한 차이는 없었다. 즉, RT14.87, RT15.26 또는 RT15.69 성분은 정자의 이동과 운동성에 영향을 미치지 않았다.

세부실험 7에서 bMSS(control), RT16.6A, RT16.6B, 및 RT19.31 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 4.3 ± 1.7 , 22.0 ± 2.0 , 6.0 ± 1.5 및 $8.0 \pm 0.6 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 83.3 ± 9.6 , 76.8 ± 7.2 , 69.2 ± 9.7 , 및 80.0 ± 1.5 % 였다. 회수된 정자는 RT16.6A 성분 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, RT16.6B와 RT19.31 성분 첨가구와 대조구간에는 유의한 차이가 없었다. 즉, RT16.6A 성분은 정자의 이동을 자극하였으나 자극효과는 매우 적은 것으로 추론된다.

결론적으로 RT3.33, RT7.00, RT13.87 및 RT16.6A 성분은 정자의 이동을 자극하였으나 난포액의 효과와 비교하면 이들 성분의 자극효과는 매우 적었다. 따라서 μ RPC를 이용한 난포액 성분의 분리에서 정자의 이동과 운동을 자극하는 성분이 소실되거나 변형되는 것으로 추론되며, 직경 2~5mm의 난포로부터 회수한 난포액에서 정자의 이동과 운동을 자극하는 단백질 성분을 분리하는데 있어서 RPC의 이용은 적절하지 않는 것으로 사려된다.

3. μ RPC를 이용 분리한 10mm 난포액 성분의 효과

직경이 10mm인 난포의 난포액으로부터 추출한 단백질성분을 μ RPC로 분리하여 회수한 각 성분이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리에

미치는 영향을 조사하였던 바, 얻어진 결과는 Table 3과 같다.

세부실험 1에서 bMSS(control), RT0.76, RT1.05, RT1.47, RT1.69, 및 RT2.02 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 5.0 ± 2.4 , 7.1 ± 4.0 , 8.9 ± 6.6 , 2.9 ± 1.0 , 4.0 ± 2.2 , $1.9 \pm 0.8 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 28.4 ± 10.5 , 52.7 ± 9.0 , 33.7 ± 14.1 , 27.1 ± 15.7 , 20.8 ± 7.9 , 및 46.9 ± 21.9 % 였다. 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율에서 첨가구와 대조구간에 유의한 차이는 없었다. 즉, RT0.76, RT1.05, RT1.47, RT1.69, 및 RT2.02 성분은 정자의 이동과 운동성에 영향을 미치지 않았다.

세부실험 2에서 bMSS(control), RT3.28, RT3.77, RT5.62, RT7.09, 및 RT8.01 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 10.3 ± 2.7 , 12.5 ± 5.6 , 5.1 ± 1.3 , 7.6 ± 0.7 , 11.1 ± 3.6 , 및 $8.8 \pm 2.6 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 50.8 ± 7.5 , 58.5 ± 6.9 , 55.4 ± 8.6 , 49.0 ± 2.6 , 44.8 ± 5.4 , 및 37.1 ± 8.0 % 였다. 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율에서 첨가구와 대조구간에 유의한 차이는 없었다. 즉, RT3.28, RT3.77, RT5.62, RT7.09, 및 RT8.01 성분은 정자의 이동과 운동성에 영향을 미치지 않았다.

세부실험 3에서 bMSS(control), RT8.35, RT8.85, RT9.71, RT10.72, 및 RT14.89 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 21.3 ± 2.9 , 16.3 ± 1.6 , 12.0 ± 2.6 , 15.9 ± 1.9 , 14.0 ± 2.6 및 $13.3 \pm 3.1 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 47.4 ± 3.7 , 50.6 ± 2.4 , 53.6 ± 6.3 , 48.6 ± 9.6 , 51.1 ± 4.6 및 49.5 ± 5.3 % 였다. 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율에서 첨가구와 대조구간에 유의한 차이는 없었다. 즉, RT8.35, RT8.85, RT9.71, RT10.72, 및 RT14.89 성분은 정자의 이동과 운동성에 영향을 미치지 않았다.

세부실험 4에서 bMSS(control), RT15.30, RT15.66, RT16.64, RT17.18 및 RT19.35 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 20.9 ± 4.2 , 12.9 ± 2.8 , 18.6 ± 3.6 , 16.1 ± 2.3 , 23.3 ± 2.7 및 $21.3 \pm 3.2 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 45.5 ± 5.9 , 51.6 ± 3.6 , $55.0 \pm$

Table 4. Effect of protein fractions separated from methanol extract of 2~5mm follicular fluid with superose column (SC) on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration at the same additional level as 10% follicular fluid

Fraction	Retention volume (ml, mean±SE, n=8)	No. of sperm recovered($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)
Control	-	1.3±0.3 ^c	-
RV0.82	0.816±0.003	30.0±1.8 ^b	55.9±5.8
RV1.35	1.354±0.005	49.2±2.0 ^a	68.0±2.9
RV1.84	1.842±0.002	2.7±1.7 ^c	-
RV1.93	1.928±0.004	1.3±0.6 ^c	-
RV2.13	2.130±0.003	2.0±0.6 ^c	-
RV2.36	2.358±0.005	1.8±0.6 ^c	-
RV2.54	2.544±0.013	1.1±0.2 ^c	-
RV2.85	2.852±0.007	2.2±1.2 ^c	-

* Superscripts ^{a,b} and ^c mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.01$.

5.1, 57.4±4.0, 47.8±6.1 및 59.3±5.1%였다. 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율에서 첨가구와 대조구간에 유의한 차이는 없었으나, 회수된 정자의 수에서 RT15.30 성분 첨가구가 RT17.18과 RT19.35 성분 첨가구보다 유의하게 낮았다. 그러나 대조구와 비교하였을 때, RT15.30, RT15.66, RT16.64, RT17.18 및 RT19.35 성분은 정자의 이동과 운동성에 영향을 미치지 않았다.

결론적으로 μ RPC로 회수한 성분 중에서 정자의 이동과 운동을 유의하게 자극하는 성분은 없었다. 따라서 직경 10mm의 난포로부터 회수한 단백질 성분에서 정자의 이동과 운동을 자극하는 성분을 분리하는데 RPC column의 이용은 적절하지 않는 것으로 사려된다.

실험 2와 3을 수행하여 정자의 이동과 운동을 자극하는 성분을 추출하지 못하였으며 난포액간에 유의한 차이를 발견하지 못하였다. RPC를 이용한 실험에서 Fetterolf 등(1994)은 1mM의 HEPES 관류액을 사용하여 난포액내 정자의 운동성을 증진시키는 단백질을 분리하였으며, 이는 1Kd 이하 저분자량의 단백질일 것으로 추론한 바 있다. 본 실험에서는 RPC를 이용 정자의 운동을 자극하는 성분을 분리하기 위하여 두 종류의 TFA 관류액을 경사지게 사용하였으나, 성분의 분리방법의 차이 때문에 동일한 결과를 얻을 수

있었다. 또한 난포액을 회수한 난포의 크기와 정자의 활력에 관한 연구에서 Chao 등 (1991)은 성숙난포로부터 회수한 난포액이 성숙전 난포로부터의 난포액에 비해 정자의 활력을 자극하는 것으로 보고한 바 있다. 이상의 결과로부터 2~5mm와 10mm 난포의 난포액으로부터 분리된 성분은 정자의 이동과 활력을 유의하게 자극하지 못하였으며, 따라서 난포액내 정자의 이동과 운동을 자극하는 성분을 분리하기 위해 RPC의 이용은 적절하지 않는 것으로 사려된다.

4. Superose column (SC)으로 분리한 난포액 성분의 효과

난소내 직경이 2~5mm인 난포의 난포액으로부터 추출한 단백질성분을 SC로 분리하여 회수한 각 성분이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리에 미치는 영향을 조사하였던 바, 얻어진 결과는 Table 4와 같다.

난포액으로부터 methanol로 추출한 단백질성분을 SC를 이용 반복 분리한 8개의 구성분의 retention volume (RV)은 각각 0.82, 1.35, 1.84, 1.93, 2.13, 2.36, 2.54 및 2.85 ml였다. 한편 bMSS (control), RV0.82, RV1.35, RV1.84, RV1.93, RV2.13, RV2.36, RV2.54 및 RV2.85 성분이 10% 난포액 수준으로 첨가된 bMSS로 swim-up 분리

를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 1.3 ± 0.3 , 30.0 ± 1.8 , 49.2 ± 2.0 , 2.7 ± 1.7 , 1.3 ± 0.6 , 2.0 ± 0.6 , 1.8 ± 0.6 , 1.1 ± 0.2 및 $2.2 \pm 1.2 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 RV0.82과 RV1.35 성분 첨가구에서 각각 55.9 ± 5.8 와 68.0 ± 2.9 %였다.

회수된 정자의 비율은 RV1.35 성분 첨가구가 RV0.82 성분 첨가구보다 유의하게 높았으며, RV0.82 성분 첨가구는 RV1.84, RV1.93, RV2.13, RV2.36, RV2.54 및 RV2.85 성분 첨가구와 대조구에 비하여 유의하게 높았으나, RV1.84, RV1.93, RV2.13, RV2.36, RV2.54 및 RV2.85 성분 첨가구와 대조구간 유의한 차이가 없었다. 회수된 정자의 수가 적어 운동정자의 비율을 판정하기 어려운 RV1.84, RV1.93, RV2.13, RV2.36, RV2.54 및 RV2.85 성분 첨가구와 대조구를 제외한 RV0.82와 RV1.35 첨가구의 비교에서, 운동정자의 비율은 RV1.35 성분 첨가구가 RV0.82에 비해 높았으나 유의한 차이가 없었다.

이상의 결과를 고찰할 때, SC를 이용 2~5mm 난포로부터 회수한 난포액에서 분리한 단백질성분 중 RV1.35성분과 RV0.82는 정자의 이동과 운동을 유의하게 자극하였으며, 따라서 난포액내 정자운동자극인자의 추출에는 SC를 이용한 분리체계가 적절한 것으로 사료된다.

적 요

난포액내 함유되어 있는 단백질성분 중에서 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 이동을 자극하는 성분을 분리하기 위하여 paper chromatography (PC) 및 reverse phase column (RPC) 과 superose column (SC)를 이용한 액체 chromatography의 분리효과를 조사하였던 바 결과는 다음과 같다.

1. Chromatography용 paper로 분리한 각 band의 성분은 첨가농도가 증가할수록 정자의 이동과 운동을 자극하였으며, 특히 band 1 성분은 정자의 이동을 유의하게 증가시켰다. 그러나, 동일 첨가수준에서 bands 성분의 정자 이동과 운동자극효과는 난포액의 효과에 비하여 유의하게 낮았다.

2. μ RPC를 이용 2~5mm 난포로부터 분리한 성분중 RT3.33, RT7.00, RT13.87 및 RT16.6A 성분은 정자의 이동을 자극하였으나, 자극효과는 매우 적었다.
3. μ RPC를 이용 10mm 난포로부터 분리한 성분은 정자의 이동과 활력을 자극하지 않았다.
4. SC를 이용 2~5mm 난포로부터 분리한 성분 중 RV1.35 성분과 RV0.82 성분은 정자의 이동과 운동을 유의하게 자극하였다.

결론적으로 난포액내 정자의 이동과 운동을 자극하는 단백질 성분은 superose column을 이용하여 효과적으로 분리할수 있으며, 분리된 RV1.35 성분과 RV0.82 성분은 정자의 swim-up 분리를 자극하였다.

참고문헌

- Arnal F, Humeau C, Hedon B, and Catayee G. 1983. Selection of motile spermatozoa from human sperm by migration in follicular fluid. C. R. Seanes. Soc. Biol. Fil., 177:65-72.
- Chao HT, Ng HT, Kao SH, Wei YH, and Hong CY. 1991. Human follicular fluid stimulates the motility of washed human sperm. Arch. Androl., 26:61-65.
- Cohen-Dayag A, Ralt D, Tur-Kaspa I, Manor M, Makler A, Dor J, Mashiach S, and Eisenbach M. 1994. Sequential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa. Biol. Reprod., 50(4): 786-90.
- Falcone L, Gianni S, Piffaretti-Yanez A, Marchini M, Eppenberger U, and Balerna M. 1991. Follicular fluid enhances sperm motility and velocity *in vitro*. Fertil. Steril., 55:619-623.
- 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.
- Lee SL, Kuo YM, Kao CC, Hong CY, and Wei YH. 1992. Purification of a sperm motility

- stimulator from porcine follicular fluid. *Comp. Biochem. Physiol.*, [B] 101:591-594.
- Nichol R, Hunter RH, de Lamirande E, Gagnon C, and Cooke GM. 1997. Motility of spermatozoa in hydrosalpingeal and follicular fluid of pigs. *J. Reprod. Fertil.*, 110: 79-86.
- Ralt D, Goldenberg M, Fetterolf P, Thompson D, Dor J, Mashiach S, Garbers DL, and Eisenbach M. 1991. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 88:2840-2844.
- Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, Turkaspa 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.
- Ramsoondar J, Khalil W, and Downey BR. 1995. Partial purification and characterization of a protein in porcine follicular fluid which restricts sperm-egg interaction *in vitro*. *Can. J. Vet. Res.*, 59:8-14.
- Ravnik SE, Zarutskie PW, and Muller CH. 1992. Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, 47:1126-1133.
- Villanueva-Diaz C, Arias-Martinez J, Bustos-Lopez H, and Vadillo-Ortega F. 1992. Novel model for study of human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril.*, 58(2):392-395.
- 박영식. 1997. 소 정자의 운동성에 영향을 미치는 난포액성분에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 12:219-226.

(접수일자 : 1998. 11.30/채택일자 : 1998. 12. 23)