

소 정자의 새로운 수정능 획득방법에 관한 연구

박영식

경북대학교 농과대학 낙농학과

Study on New Capacitation-method of Bovine Sperm

Y. S. Park

Dairy Sci., Coll. Agri., Kyoung-pook Natl. Univ.

Summary

This study was aimed to develop the new method for bovine sperm capacitation through testing and combining factors relating to sperm capacitation. For verifying the efficiency of this method on inducing capacitation, *in vitro* fertilization was carried out. The results obtained were as follows:

When pHs of HBS /PR for sperm-washing were 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45 and 8.83, variances between light absorbance differences obtained from sperm pre-washing solution and post-washing solution(VADs) were 0.000, 0.001, -0.001, -0.005, -0.005, -0.021, -0.017, -0.016, and -0.036, respectively. There were significant decreases of VADs in pH 7.69 and pH 8.83.

When sperm were firstly, secondly, and thirdly washed with HBS /PR, VADs were -0.024, -0.006, and -0.004, respectively. There was significant decrease of VAD in 1st sperm-washing.

When washed-sperm were secondly washed with HBS /PR supplemented with no(control), heparin, CSA, PC12, and BSA, VADs were 0.009, -0.024, -0.008, -0.009, and 0.014, respectively. When the sperm were thirdly washed with HBS /PR with no(control), heparin, CSA, PC12 and BSA, VADs were 0.020, -0.007, 0.005, 0.006, and 0.019, respectively. Only heparin treatment showed the negative values of VADs in 2nd and 3rd sperm-washing.

Of oocytes cultured with sperm which were repeatedly washed with heparin and high pH, 52%(57/110) were cleaved over 2 cell stage. However, percent of oocytes parthenogenetically divided was 5%(2/42).

서 론

수정능 획득반응은 정자가 자성 생식도관에서 일정 시간 체류하는 동안 정자막이 물리적 화학적으로 변화함으로써 난자와 수정할 수 있는 능력을 획득

하는 현상이다. 침모반응의 전단계로서 수정능획득반응은 침모반응유발이나 수정유를 통해서 간접적으로 입증되어 왔다. 침모반응유발요인으로 보고된 바 있는 정자배양액의 pH, 정자의 반복세척, 수소개체, heparin, CSA, BSA 및 PC12에 대해 살펴보면 다음과

같다.

정자배양액의 조건은 정자의 생존뿐만 아니라 침모 반응과 난자와의 체외수정에 영향을 미치는 데, 특히 정자배양액의 높은 pH는 정자가 수정능력을 획득하는데 소요되는 시간을 단축시키고(Murphy와 Yanagimachi, 1984), 정자의 침모반응을 촉진시켰다(Hyne과 Garbers, 1981). 또한 높은 삼투압과 pH로 정자를 세척하였을 때, 체외수정율이 높게 얻어졌다고 보고된 바 있다(Brackett과 Oliphant, 1975).

자성생식도관에 사정된 정자는 자성생식도관 분비액에 의해 정장으로부터 분리되면서 수정능 획득반응을 수행하게 된다. 체외수정에서는 정장으로부터 정자를 분리하기 위하여 반복해서 세척하는 데, 반복된 정자의 세척으로 정장뿐만 아니라 정자 두부를 피복하고 있는 물질이 제거된다. 정자막의 피복물질은 높은 pH에 의한 침모반응의 유발을 저해한다. 그러므로 정자 두부에 피복되어 있는 정장에서 유래된 물질의 제거는 수정능 획득의 중요한 과정이다(Fraser, 1984).

한편 정자의 침모반응을 수행하는 능력은 수소개체간에 차이가 있으며, 정자의 침모반응율과 수소의 NRR간에 상관관계가 있다고 보고된 바 있다(Graham과 Foote, 1984). 이러한 정자의 침모반응수행능력에 있어서 수소개체간의 차이는 정자 원형질막의 구조적 차이 또는 정장내 수정을 억제하는 피복물질의 차이에 기인한 것이며, 이러한 정자막구조나 피복물질의 차이는 수소개체간 수정능 획득반응의 차이를 초래하게 된다.

사정된 정자는 자성생식도관내 환경으로부터 영향을 받는 데, 특히 자성생식도관 분비액내 존재하는 glycosaminoglycans(Lee와 Ax, 1984)중에서 heparin(Handrow 등, 1982; Parrish 등, 1985)과 chondroitin sulfate A(Lenz, et al, 1986)는 정자의 침모반응을 유발하며, 난관액이나 난포액내 함유된 알부민도 정자표면성분을 제거하며(Fraser, 1985), 정자막의 지방산과 글리세롤을 제거함으로써 침모반응을 유발한다(Meizel, 1978). 한편 세포막의 구성성분인 인지질 중에서 phosphatidylcholine(PC)도 정자의 침모반응을 유의하게 증가시킨다(Graham과 Foote, 1987a, b).

정자 두부의 침체에 는 다량의 효소가 함유되어 있다. 미수정능획득 정자에서는 침모외막에 존재하는 ATPase에 의해서 침모내 pH가 5정도로 낮게 유지되

고 있는 데, 이렇게 낮은 pH는 정자 침모내 효소를 안정화시키는 것으로 보고된 바 있다(Working과 Meizel, 1981). 자성 생식도관내에서 체류하는 정자는 수정능 획득반응동안 원형질막의 이온투과성이 변하게 되고, 침모내 수소이온이 침모밖으로 유출됨으로서 정자 침모내 pH의 증가가 초래되며, 침모내 높아진 pH는 효소의 활성을 자극하게 된다(Meizel, 1978). 활성화된 효소에 의해서 정자는 침모반응을 수행하고 투명대를 통과하여 난황막과 결합하면서 수정하게 된다.

본 실험에서는 수정능획득동안 침모로부터 유출되는 수소이온을 정자 세척액으로부터 정량분석함으로써, 수소이온유출에 관여하는 요인들을 조사하고, 이 요인들을 적절히 조합하여 정자의 체외 수정능획득 반응을 효율적으로 유발코져 한다. 나아가서 이러한 수정능 획득방법으로 처리한 정자를 체외성숙한 난자와 배양하여 발생율을 조사함으로써 이 방법의 효율성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 정자세척액내 수소이온농도의 변화를 측정하기 위한 표본의 준비

1) 정자 세척용액

정자의 세척을 위해서 사용되는 HBS /PR (HEPES-buffered saline with phenol red)는 10mM의 HEPES로 완충된 145mM NaCl용액에 proton-indicator인 phenol red 50 μ M을 첨가하여 제조하였다.

2) 정자세척용 용액의 pH, 수소개체 및 정자의 반복 세척의 효과

홀스타인(Holstein), 한우(KNC) 및 헤어포드(Herford) 각 1두로부터 채취한 정액을 pH가 각각 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45 및 8.83으로 조정된 HBS /PR로 ml당 1억 정자가 포함되도록 희석하였다. 희석정액을 39 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양한 다음 650g으로 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다(1차 세척).

또한 1차 세척과 동일한 방법으로 정자를 부유하고 배양한 다음 원심분리하여 2차 및 3차 정자 세척액을 회수하였다. 수소이온농도를 측정하기 위하여, 1차, 2

차 및 3차 정자세척에서 회수한 상등액을 0.45 μm 공극으로 여과하여 준비하였다.

3) Heparin, CSA, PC12 및 BSA의 효과

한우에서 채취한 원정액을 HBS/PR으로 10배 희석하여 650g으로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 회수한 세척정자를 HBS/PR(control), 10 μg /ml heparin이 첨가된 HBS/PR, 10 μg /ml CSA가 첨가된 HBS/PR, 100 μg /ml PC12가 첨가된 HBS/PR 및 0.6% BSA가 첨가된 HBS/PR로 각각 부유하였다. 부유한 정자를 39 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 배양한 다음 650g으로 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하고(2차 세척), 동일한 용액으로 정자를 재부유하였다. 재부유한 정자를 동일한 방법으로 배양하고 원심분리하여 상등액을 회수하였다(3차 세척). 수소이온농도를 측정하기 위하여 2차 및 3차 정자세척에서 회수한 상등액을 0.45 μm 공극으로 여과하여 준비하였다.

2. 정자 세척액내 수소이온농도의 분석

회수한 정자 세척후 용액내 수소이온농도의 변화를 측정하기 위해서, "Spectronic 700"을 이용하여 기준파장 480nm, 선택파장 490, 500, 510 및 520nm에서, 정자 세척전 용액의 흡광도(A_0)와 흡광도차(ΔA_0)를 구하고, 동일한 방법으로 정자 세척후 용액의 흡광도(A_t)와 흡광도차(ΔA_t)를 구한 다음, 이들로부터 흡광도차간변화($A_0 - \Delta A_t$; VADs)를 구하였다. 음의 값을 나타내는 흡광도차간변화는 정자세척후용액내 수소이온농도가 증가하였음을 의미한다.

3. 체외수정

1) 난자배양액

난자와 수정란의 배양을 위한 기본배양액으로 PL3(Park과 Lin, 1991)는 98.0mM NaCl, 4.5mM KCl, 1.0mM KH_2PO_4 , 3.0mM CaCl_2 , 0.9mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25mM NaHCO_3 , 10mM Na-Lactate(60%) 및 10mM HEPES로 구성되었으며, 난자의 성숙, 수정 및 발생의 단계에 따라서 아래와 같은 성분이 첨가되었다.

(1) 성숙용 배양액

PL3에 0.3mM pyruvate, 5mM glucose, 1mM glutamine, 4mg/ml fatty acid free-bovine

serum albumin(faf-BSA), 10 μg /ml FSH 및 10ng/ml epidermal growth factor(EGF)를 첨가하였다.

(2) 수정용 배양액

PL3에 0.3mM pyruvate와 4mg/ml faf-BSA를 첨가하였다.

(3) 발생용 배양액

PL3에 0.3mM pyruvate, 5mM glucose, 1mM glutamine 및 4mg/ml faf-BSA를 첨가하였다.

2) 난자의 성숙

난소난포(2~5mm)에서 회수한 난자를 반복하여 세척한 다음 미네랄오일로 덮여 있는 난자성숙용 배양액으로 옮겨, 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 및 100% 습도에서 38.9 $^{\circ}\text{C}$ 로 24~28시간동안 배양하였다.

3) 정자배양액

(1) HBS1

145mM NaCl용액에 25mM HEPES, 10 μg /ml heparin 및 50 μg /ml gentamycin을 첨가하여 pH 7.2~7.4로 조정하였으며 0.22 μm 공극으로 여과한 다음, 사용할 때까지 냉장 보관하였다.

(2) HBS2

145mM NaCl용액에 25mM의 HEPES를 첨가하여 pH 7.9로 조정하였으며, 0.22 μm 공극으로 여과한 다음, 냉장 보관하였다.

4) 정자의 수정능획득

동결정액을 Select Sire Inc.(Ohio)로부터 구입하여, 체외수정 직전에 30 $^{\circ}\text{C}$ 온수에서 용해한 다음 HBS1용액으로 5배로 희석하였다. 희석정액을 480g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 정자를 HBS2에 재부유하였다. 재부유한 정액을 480g로 5분간 원심분리하여 세척한 다음 HBS1에 다시 부유하여 상온에서 보관하였다.

5) 체외수정

HBS1과 HBS2로 반복세척한 정자와 체외성숙한 난자를 수정용 배양액에서 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 및 100% 습도에서 38.9 $^{\circ}\text{C}$ 로 16~18시간동안 배양하여 수정을 유도하였다. 난자-정자 복합체를 새로운 발생용 배양액으로 옮겨 4일간 배양하였으며, 2세포 이상으로 분할된 난자의 비율을 난할율로 계산하였다.

6) 처녀발생

수정능획득한 정자에 의존하지 않은 난분할의 가능성을 배제하기 위하여, 난포난자를 성숙용 배양액에서 제외수정과 동일한 조건으로 4일간 배양하였으며, 2세포이상으로 분할된 난자의 비율을 처녀발생에 의한 분할율로 계산하였다.

4. 통계분석

정자세척액내 흡광도 차간 변화간의 차이는 ANOVA에 의해 분석되었으며, p값이 0.05이하일 때, 흡광도 차간 변화간에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 의미한다.

결과 및 고찰

1. pH가 정자세척액내 수소이온농도의 변화에 미치는 영향

pH가 각각 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45 및 8.83인 HBS /PR로 정자를 반복하여 세척하였을 때, 정자 세척전 용액과 정자 세척후 용액의 흡광도 차간 변화는 Figure 1과 같다.

pH가 각각 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45 및 8.83인 HBS /PR로 정자를 반복하여 세

척하였을 때, 흡광도차간변화는 각각 0.000, 0.001, -0.001, -0.005, -0.005, -0.021, -0.017, -0.016 및 -0.036이었다. pH 6.78이상에서 흡광도차간 변화가 음의 값을 보였으며, pH 7.69와 pH 8.83에서 이들간에 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). 즉, pH 7.8 이상인 HBS /PR로 정자를 세척하여 회수한 상등액에서 수소이온의 증가가 있었으며, 특히 pH 7.69와 8.83인 HBS /PR로 정자를 세척하여 회수한 상등액에서 수소이온이 유의하게 증가하였다.

2. 반복세척이 정자세척액내 수소이온농도의 변화에 미치는 영향

정자를 3회 반복하여 세척하였을 때, 정자 세척전 용액과 정자 세척후 용액의 흡광도 차간 변화는 Figure 2와 같다.

정자의 반복세척이 정자세척액내 수소이온농도의 변화에 미치는 영향을 조사하였던 바, 1차 정자세척처리구의 흡광도 차간 변화는 -0.024로서 2차와 3차 정자 세척 처리구의 -0.006과 -0.004에 비해 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). 즉, 다른 처리에 비해서 1차 정자세척 후 회수한 상등액에서 수소이온농도가 유의하게 높았다.

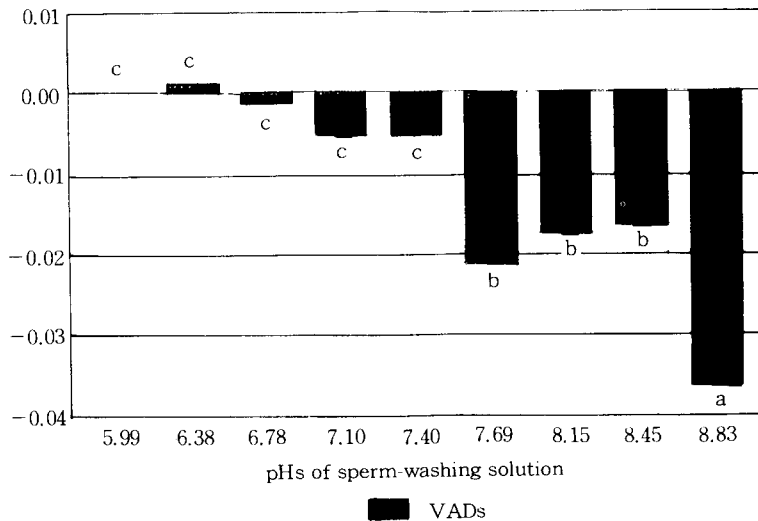


Figure 1. Effect of pHs of sperm washing solution on VADs.

a, b, c: significant at $p < 0.05$.

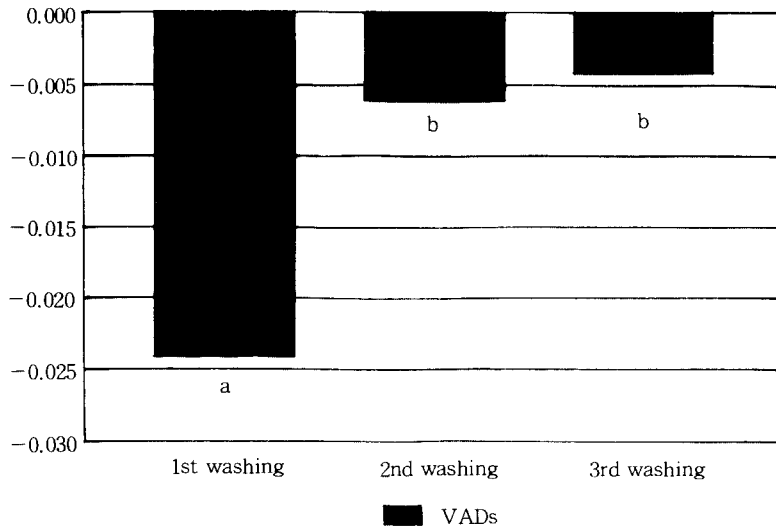


Figure 2. Effect of sperm washing frequency on VADs.
a, b: significant at $p < 0.05$.

3. 수소개체가 정자 세척액내 수소이온농도 변화에 미치는 영향

홀스타인, 한우 및 헤어포드 정액을 세척하였을 때, 정자 세척전 용액과 정자 세척후 용액의 흡광도 차간 변화는 Figure 3과 같다.

홀스타인(Holstein), 한우(Korean native cattle) 및 헤어포드(Hereford) 정액을 세척하였을 때, 홀스타인의 흡광도 차간 변화는 -0.022 로서 한우와 헤어포드의 -0.006 와 -0.005 에 비해 유의한 차이가 있었다. 즉, 홀스타인 정액을 세척하여 회수한 상등액에서 수소이온농도가 유의하게 높았다.

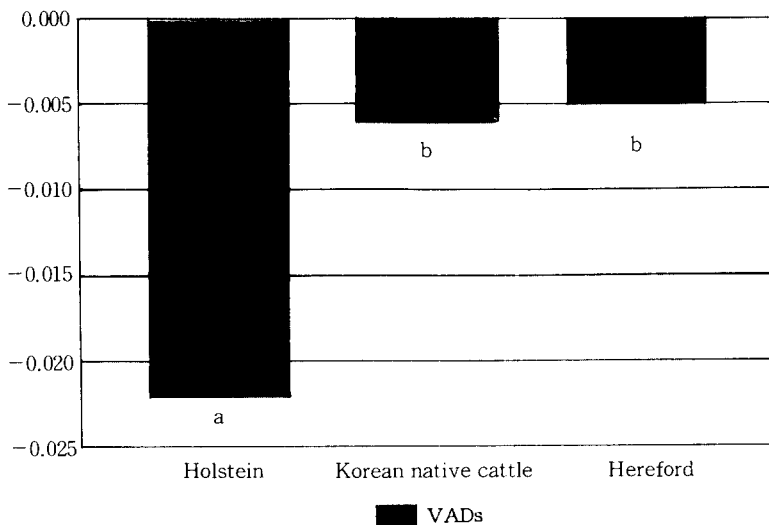


Figure 3. Effect of individual bulls on VADs.
a, b: significant at $p < 0.05$.

4. Heparin, CSA, PC12 및 BSA가 정자세척액내 수 소이온농도에 미치는 영향

세척 정자를 HBS /PR(대조구)와 heparin, CSA, PC12 및 BSA가 첨가된 HBS /PR로 2차와 3차 세척하였을 때, 정자세척전 용액과 정자 세척후 용액의 흡광도 차간 변화는 Figure 4와 같다.

세척정자를 HBS /PR(대조구), heparin, CSA, PC12 및 BSA가 첨가된 HBS /PR로 2차 세척하였

을 때, 흡광도 차간 변화는 0.009, -0.024, -0.008, -0.009 및 0.014로서, heparin, CSA, PC12처리구에서 음의 값이 얻어졌으나, 3차 세척하였을때 0.020, -0.007, 0.005, 0.006 및 0.019로서, heparin처리구에서만이 흡광도 차간 변화가 음의 값이 얻어졌다. 즉, 처리구중에서 heparin은 2차와 3차 정자 세척후 회수한 상등액에서 수소이온농도를 증가시켰다.

5. 체외수정란의 발생률

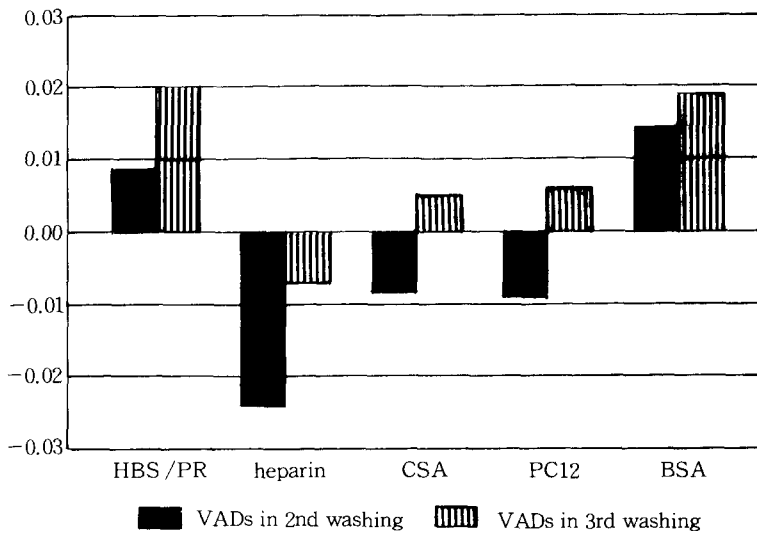


Figure 4. Effect of heparin, CSA, PC12 and BSA on VADs.

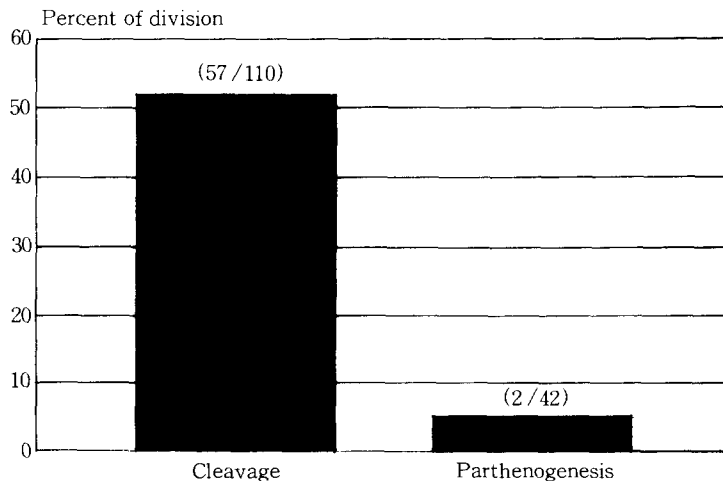


Figure 5. Percent of cleavage and parthenogenetic division

정자를 HBS1, HBS2, HBS1으로 각각 1, 2, 3차 세척한 정자와 체외성숙한 난자를 배양하였을 때, 난분할율은 Figure 5와 같다.

Heparin과 높은 pH로 반복 세척한 정자와 PL3배양액에서 성숙한 난자를 배양하였을 때, 공시난자의 52%(57/110)가 2세포 이상으로 분할하였다. 한편, PL3배양액에서 배양한 난포난자의 5%(2/42)가 처녀생식에 의해 분할하였다.

고 찰

정자배양액의 수소이온농도는 정자의 수정능획득과 침모반응에 중요한 영향을 미치는 데(Hyne과 Garber, 1981; Mahi와 Yanagimachi, 1973; Murphy와 Yanagimachi, 1984), 대부분 실험에서 생리적 수준보다 높은 pH는 정자의 침모반응을 유발시키고 수정능획득시간을 단축시킨다고 보고된 바 있다.

정자 주변의 pH는 정자내의 pH를 변화시키며, 침모내 pH의 증가는 침모반응을 유발하게 되는 데(Hyne, 1984a), Working과 Meizel(1983)은 K^+ 과 H^+ 에 대한 정자 두부의 막투과성이 변해서 K^+ 이 유입되고 H^+ 이 유출되거나, Mg^{2+} -ATPase proton pump가 억제되어 침모내 pH가 증가한다고 보고하였다.

본 실험에서도 정자의 침모반응을 촉진하는 환경인 정자배양액의 높은 pH는 정자세척액내 수소이온을 유의하게 증가시켰다. 그러므로 정자가 수정능력을 획득하는 동안 막투과성이 변해서 정자침모로부터 수소이온이 유출되는 것으로 사료된다.

정자 표면성분의 소실은 정자 수정능획득의 중요한 과정으로서 정자의 세척은 수정율을 증가시키는 데(Fraser, 1984), Bondioli와 Wright(1983)는 HIS 처리된 정자보다 반복세척된 정자와 배양한 난자에서 높은 정자침투율을 얻었으며, Nishimura 등(1989)은 동결정액을 반복세척하여 체외수정율을 증가시켰다.

본 실험에서 정자의 세척빈도가 증가함에 따라서 정자세척액내 수소이온농도의 유출정도는 진감하였으나, 3차세척에서도 계속해서 수소이온이 유출되었다. 그러므로 정자의 반복세척은 정자피복물질의 제거뿐만 아니라 정자로부터 수소이온의 유출을 조장함으로써 수정에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

수태율은 수소개체간에 차이가 있는데, Bousquet와 Brackett(1982)은 투명대를 제거한 난자를 이용하여 수소개체간 수정능력을 비교하였으며, Davis 등(1984)은 형광물질을 부착시킨 여러 개체의 정자를 투명대를 제거한 햄스터난자와 배양하여 난자침투율을 비교함으로써 각 개체의 수정능력을 판정하였다. 많은 연구에서 CS(Ax 등, 1985; Lenz 등, 1986; Lenz와 Martin, 1988) 또는 PC12 liposome(Davis와 Foote, 1987; Graham과 Foote, 1984; 1985; 1987 a; b)으로 침모반응을 유발하여 각 수소의 침모 반응 수행능력과 NRR과의 상관관계를 규명하였다.

본 실험에서 침모반응율의 수소개체간 차이는 수정능획득반응의 차이에 기인할 것으로 추측하여 정자세척액내 수소이온농도의 변화를 조사하였던 바, 정자 세척후 용액내 수소이온농도의 증가는 수소개체간에 차이가 있었다.

거의 모든 정자의 수정능획득용 배양액에는 첨가되어 있으며(Rogers, 1978), 난관액 및 난포액에 존재하여 침모반응을 저해하는 정자표면성분을 제거하거나(Fraser, 1985), 정자막의 지방산과 글리세롤을 제거하며(Davis 등, 1979; Meizel, 1978), sterol수용체로서의 기능을 가지고 있어서 정자의 sterol 함량을 변화시킨다고 보고되고 있는 알부민(Go와 Wolf, 1985)은 세척정자에서 정자 세척액후 용액내 수소이온을 증가시키지 못했다.

한편, 정자의 침모반응율과 투명대 제거 햄스터난자의 정자침투율을 증진시킨다고 보고된 바 있는 PC12(Graham과 Foote, 1987a, b; Graham 등, 1987)와 정자의 침모반응유발인자로 보고된 바 있는 CS(Lenz 등, 1982; 1983 a:b; 1986; Thompson과 Cummins, 1986), 및 침모반응유발인자(Meizel과 Turner, 1986; Parrish 등, 1985)이며 수정능획득유발인자(Parrish 등, 1988)로 보고된 heparin은 2차 정자 세척후 용액에서 수소이온농도를 증가시켰으나, 3차 정자세척에서는 heparin만이 정자 세척액내 수소이온농도를 증가시켰다. 다른 GAGs보다 우수한 침모반응유발능력이 있다고 보고된 바 있는 heparin(Handrow 등, 1982)은 PC12와 CSA에 비해서 정자로부터 수소이온유출능력이 우수한 것으로 사료된다.

정자의 침모내 pH는 5정도로 낮게 유지되고 있다(Working와 Meizel, 1981). Working와 Meizel(1981)은 미수정능획득정자의 침모외막에 있는

ATPase가 정자세포의 안과 밖의 pH차 (Δ pH)를 유지하는 데, 만약 이 효소의 활성화를 저해하면 침모성 pH가 소멸되어 수정능획득한 정자에서 침모반응이 유발된다고 보고하였다. 본 실험에서 조사된 침모반응 유발인자로 알려진 요인들이 정자세척액내 수소이온의 농도를 증가시키는 것으로 미루어, 정자세척액내 수소이온의 증가는 정자로부터 유래되며 이러한 수소이온의 유출이 정자의 수정능획득반응과 깊은 관련이 있는 것으로 사료된다. 이를 증명하기 위하여 수소이온을 증가시키는 요인들을 적절히 조합하여 체외수정을 실시하였던 바, 43~86% 범위의 난분할율을 얻었다. 그러므로 본실험에서 제시한 새로운 수정능획득방법 즉, heparin과 높은 pH로 반복세척한 정자의 처리는 효율적으로 수정능획득을 유발한 것으로 사료된다.

적 요

본 실험은 소 정자의 수정능획득에 관여하는 인자들을 찾아 이들을 적절히 조합함으로써 체외에서 효율적인 수정능획득반응을 개발하는데 역점을 두었으며, 나아가서 이 방법의 효율성을 검토하기 위해 체외수정을 실시하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. pH가 각각 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45 및 8.83인 HBS/PR로 정자를 반복하여 세척하였을 때, 흡광도 차간 변화는 각각 0.000, 0.001, -0.001, -0.005, -0.005, -0.021, -0.017, -0.016 및 -0.036로서, pH 7.69와 8.83에서 유의한 차이가 있었다.
2. 정자를 HBS/PR로 1, 2 및 3차 반복해서 세척하였을 때, 흡광도 차간 변화는 각각 -0.024, -0.006 및 -0.004로서, 1차세척에서 유의한 차이가 있었다.
3. 홀스타인, 한우 및 헤어포드 정액을 세척하였을 때, 흡광도 차간 변화는 -0.022, -0.006 및 -0.005로서, 홀스타인의 정액에서 유의한 차이가 있었다.
4. 세척정자를 HSB/PR(대조구), heparin, CSA, PC12 및 BSA가 첨가된 HBS/PR로 2차 세척하였을 때, 흡광도 차간 변화는 0.009, -0.024, -0.008, -0.009 및 0.014였으며, 3차 세척하였을 때, 0.020, -0.007, 0.005, 0.006, 0.019였다.
5. Heparin과 높은 pH로 반복세척한 정자와 체외성

숙난자를 배양하여 52%(57/110)의 난분할율을 얻었다. 한편 난자의 처녀생식에 의한 난분할율은 5%(2/42)였다.

참고문헌

- Ax RL, Dickson K and Lenz RW. 1985. Induction of acrosome reaction by chondroitin sulfates *in vitro* corresponds to nonreturn rates of dairy bulls. J. D. S., 68:387-390.
- Bondioli KR and Wright RW Jr. 1983 a. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. J. Anim. Sci., 57:1001-1005.
- Bousquet D and Brackett BG. 1982. Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. Theriogenology., 17:199-213.
- Brackett BG and Oliphant BG. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
- Davis AP and Foote RH. 1987. Relationship of sire fertility to acrosome-reacted and motile spermatozoa after treatment with liposome. J. D. S., 70:850-957.
- Davis AP, Graham JK and Foote RH. 1984. *In vitro* heterospermic insemination of zona-free hamster eggs by fluorochrome-labeled bull sperm: A fertility test. J. D. S., 69(Suppl):170.
- Davis BK, Byrne R and Hungund B. 1979. Studies on the mechanism of capacitation, II: Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation *in vitro*. Biochim. Biophys. Acta., 558:257-266.
- Fraser LR. 1984. Mouse sperm capacitation *in vitro* involves loss of a surface associated inhibitory component. J. Reprod. Fert., 72:373-384.
- Fraser LR. 1985. Albumin is required to support

- the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 74:185-196.
- Go KJ and Wolf DP. 1985. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. Biol. Reprod., 32: 145-153.
- Graham JK and Foote RH. 1984. *In vitro* fertilization of zona-free hamster ova by liposome-treated bovine sperm: A fertility assay. Biol. Reprod. 30(Suppl):112.
- Graham JK and Foote RH. 1985. Capacitating bull sperm and predicting their fertility in a "test tube". Adv. Anim. Breeder., 33:6.
- Graham JK and Foote RH. 1987a. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and *in vitro* penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: I. A fertility assay for fresh semen. Gamete Res., 16:133-145.
- Graham JK and Foote RH. 1987b. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and *in vitro* penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: II. A fertility assay for frozen-thawed semen. Gamete Res., 16:147-158.
- Graham JK, Foote RH and Hough SR. 1987. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion and boar. Biol. Reprod., 37:181-188.
- Handrow RR, Lenz RW and Ax RL. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Comm., 107:1326-1332.
- Hyne RV. 1984. Bicarbonate and calcium-dependent induction of rapid guinea-pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. Biol. Reprod., 31:312-323.
- Hyne VR and Garbers DL. 1981. Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in buffered medium below pH 7. 8. Biol. Reprod., 24:257-266.
- Lee CN and Ax RL. 1984. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. J. D. S., 67:2006-2009.
- Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ and First NL. 1982. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Comm., 106:1092-1098.
- Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL and Ax RL. 1983 a. Chondroitin sulfates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. Biol. Reprod., 28:683-690.
- Lenz RW, Bellin ME and Ax RL. 1983 b. Rabbit spermatozoa undergo an acrosome reaction in the presence of glycosaminoglycans. Gamete Res., 8:11-19.
- Lenz RW, Martin J and Ax RL. 1986. Prediction of nonreturn rates of holstein bulls by evaluating occurrence of acrosome reactions *in vitro*. J. D. S., 69(Suppl):226.
- Lenz RW, and Martin JL. 1988. Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. J. D. S., 71:1073-1077.
- Mahi CA and Yanagimachi R. 1973. The effects of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. J. Reprod. Fert., 35:55-66.
- Meizel S. 1978. The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical approach. In "Development in mammals, Vol. 3(Johnson eds, North-Holland, Amsterdam)" p 1-64.
- Meizel S and Turner KO. 1986. Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of previously capacitated hamster sperm. J. Expl., Zool. 237:137-139.

- Murphy SJ and Yanagimachi R. 1984. The pH dependence of molility and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res.*, 10:1-8.
- Nishimura K, Matsunaga H, Fujitani Y and Kitano S. 1987. Improvement of fertilizable of frozen spermatozoa in bovine *in vitro* fertilization. *Jap. Reprod. Tech. Res.*, 9:107-109.
- Park YS and Lin YC. 1991. Effect of eipdermal growth factor (EGF) and defined simple media on *in vitro* bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology* (Submitted).
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL and First NL. 1985. Effect of heparin and chodroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology* 24:537-549.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38: 1171-1180.
- Rogers BJ. 1978. Mammalian sperm capacitation and fertilization *in vitro*: A critique of methology. *Gamete Res.*, 1:165-223.
- Thompson JG, E and Cummins JM. 1986. Some effects of chondroitin sulfate on the *in vitro* acrosome reaction in ram spermatozoa, *Anim. Reprod. Sci.*, 12:151-155.
- Working PK and Meizel S. 1981. Evidence that an ATPase fuctions in the maintenance of the acidic pH of the hamster acrosome. *J. Biol. Chem.*, 256:4708-4711.
- Working PK and Meizel S. 1983. Correlation of increased intracrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *J. Reprod. Fert.*, 18:275-286.