

Ca 과 BSA 가 소 精子洗滌液내 수소이온농도에 미치는 影響

朴永植·任京淳

서울대학교 農科大學

Effect of Ca and BSA on Hydrogen Ion Concentration in Bovine Sperm Washed Solution

Park, Y.S. and K.S. Im

College of Agriculture, Seoul National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of Ca and BSA on hydrogen ion concentration in sperm washed solution. The results obtained were as follows:

1. The hydrogen concentration in 1st and 2nd sperm washed solutions was significantly ($p < 0.01$) higher when sperm was washed with SHP solution containing 2mM Ca than when sperm washed with SHP solution or SHP solution containing 10mM Ca.
2. The hydrogen ion concentration in sperm washed solution was significantly ($p < 0.05$) higher when sperm was washed with SHP solution containing BSA-FAF than when sperm was washed with SHP solution or SHP solution containing BSA-V.

(Key word: Ca, BSA, sperm-washing, hydrogen-ion)

I. 緒 論

精子的受精能獲得과 尖帽反應에 관련된 因子로서 가장 많이 연구되어 온 것은 칼슘이다. 칼슘이 제외된 배양액에서 培養된 기니픽 精子는 卵子和 受精하지 못하나, 배양액에 칼슘의 첨가는 精子的 尖帽反應을 유발시킨다고 보고된 바 있다(Yanagimachi와 Usui, 1974). 이외에도 칼슘은 精子運動性を 변화시키고(Fraser, 1983), 濃度 및 培養時間에 따라 受精에 影響을 미치며(Fraser, 1987), 精子膜의 融合과 小包形成에도 관련한다고 보고되고 있다(Flechon 등, 1986; Jamil과 White, 1981).

거의 모든 精子的 受精能獲得用 培養液에는 알루미늄이 첨가되고 있으며(Rogers, 1987), 卵管液 및 卵胞液에 존재하는 絨絨알부민은 精子表面成分을 제거하거나(Fraser, 1985), 精子膜의 지방산과 글리세롤을 제거함으로(Davis 등, 1979; Meizel, 1978) 精子的 受精

能獲得과 尖帽反應에 관련한다고 보고하고 있다.

Park 과 Im(1991a)은 SHP액에 첨가한 Ca 과 BSA 가 소 精子的 尖帽反應을 증진시켰다고 보고하였다. 본 實驗은 尖帽反應因子로 알려진 Ca 과 BSA 가 精子洗滌液내 水素이온농도에 미치는 影響을 조사하여 精子的 受精能獲得과 精子로부터 水素이온의 流出간의 相關關係를 규명코저 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 精子洗滌液의 回收

한우 精液을 SHP 液, 2mM 또는 10mM 의 $CaCl_2$ 을 함유한 SHP 液으로 10배 稀釋한 다음, 650g 로 10분간 遠心分離하여 上등액을 回收하였다(1차 洗滌液). 精자를 다시 SHP 液으로 10배 희석하여 39°C에서 15분간 培養한 다음 650g 으로 10분간 遠心分離하여 上등

액을 회수하였다(2차 洗滌液). 한우 精液을 SHP 溶液, 0.6%의 BSA fraction V(BSA-V)를 함유한 SHP 液 또는 0.6%의 BSA fatty acid free(BSA-FAF)를 함유한 SHP 液으로 10배 稀釋한 다음 650g 로 10분간 遠心分離하여 상등액을 回收하였다.

2. 精子洗滌液내 水素이온농도의 評價

Park 과 Im(1991b)의 방법에 따라 평가하였다.

3. 統計分析

吸光度差間 變化(VAD)간의 차이는 one-way ANOVA 에 의해서 分析하였으며, p 값이 0.05보다 적을 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 結果

1. Ca 이 精子 洗滌液내 水素이온 濃度에 미치는 影響

SHP 液 또는 2mM 또는 10mM 의 Ca 을 함유한 SHP 液으로 精子를 洗滌하였을 때, 精子洗滌 前液 및 精子洗滌 後液의 吸光度差間 變化(VAD)는 Fig. 1과 같다.

1차 洗滌液의 吸光度差間 變化(VAD)는 대조구, 2 mM Ca 과 10mM Ca 이 각각 -0.0169 , -0.0285

와 -0.0214 로 2mM Ca 이 대조구와 10mM Ca 보다 유의하게 ($p < 0.01$) 낮았다. 2차 洗滌液의 吸光度差間 變化는 대조구, 2mM Ca 과 10mM Ca 이 각각 -0.0024 , -0.0057 과 -0.0040 으로 역시 2mM Ca 이 대조구와 10mM Ca 보다 유의하게 ($p < 0.01$) 낮았다. 즉 1과 2차 세척액내 수소이온농도는 공히 2mM 의 Ca 을 함유한 SHP 液으로 정자를 세척했을 때가 SHP 液과 10mM 의 Ca 이 첨가된 SHP 液으로 정자를 세척했을 때보다 유의하게 ($p < 0.01$) 높았다.

2. BSA 가 精子洗滌液내 水素이온 濃度 變化에 미치는 影響

SHP 液 BSA-V 또는 BSA-FAF 를 함유한 SHP 液으로 精子를 洗滌하였을 때, 精子洗滌 前液과 精子洗滌 後液의 吸光度差間 變化(VAD)는 Fig. 2와 같다.

精子 洗滌液의 吸光度差間 變化는 대조구, BSA-V, BSA-FAF 가 각각 0.0120, 0.0029 및 -0.0092 로 BSA-FAF 가 대조구와 BSA-V 보다 유의하게 낮았다. 즉 BSA-FAF 를 함유한 SHP 液으로 정자를 세척하였을 때 精子洗滌液내 水素이온농도는 유의하게 증가하였다.

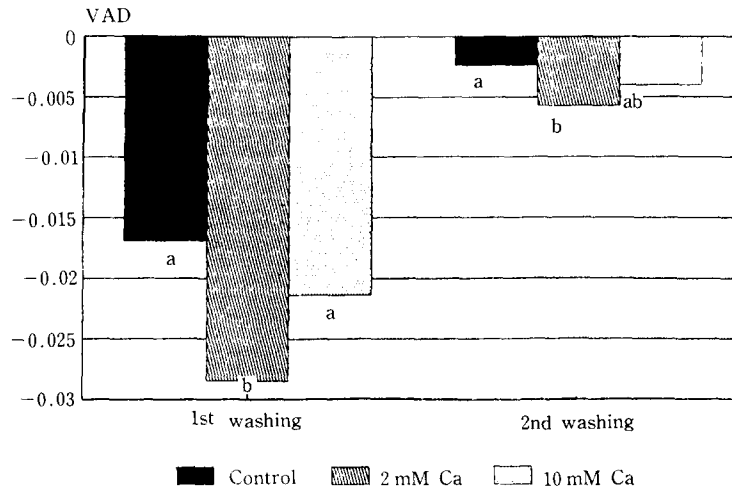


Fig. 1. Effect of Ca concentration in washing solution on light absorbance difference of 1st or 2nd sperm washed solution. Different subscripts differ significantly ($p < 0.05$).

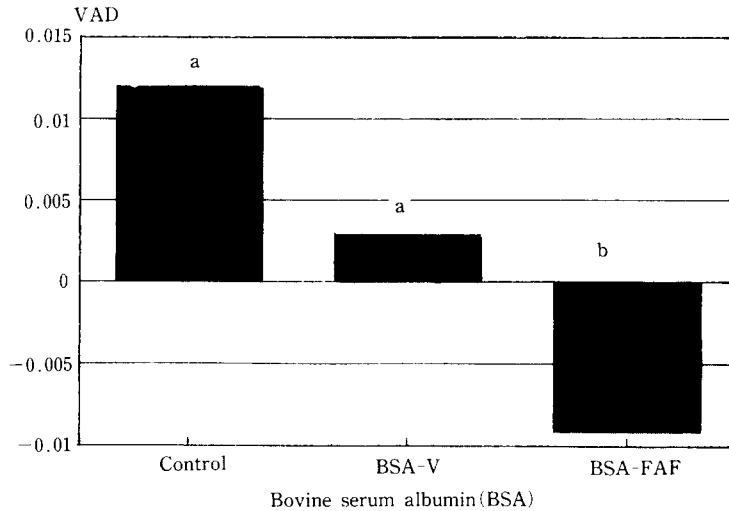


Fig. 2. Effect of BSA of washing solution on light absorbance difference in sperm washed solution. Different subscripts differ significantly($p < 0.01$)

IV. 考 察

本實驗에서 정자를 SHP 液으로 洗滌하였을 때 精子洗滌液내 水素이온농도는 증가하였다. Park 과 Im (1991, b)은 精子洗滌실험, 精子洗滌液의 pH 및 수소개체가 精子洗滌液내 수소이온농도에 영향을 미친다고 보고한 바 있다.

本實驗에서 정자를 2mM의 Ca를 함유한 SHP 液으로 洗滌하였을 때 精子洗滌液내에 수소이온 농도가 유의하게 증가하였다. Ca에 의한 精子의 受精能獲得과 尖帽反應은 Na과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있는데, Hyne 등(1984)은 精子細胞내에 농축된 Na이 세포외의 Ca과 교환되는 기작에 대해 보고한 바 있다. Ca은 受精能獲得한 精子에서 尖帽反應을 유발시키지만(Green, 1978; Hyne 등, 1984; Yanagimachi와 Usui, 1974), 受精能獲得하는 동안 精子는 스스로 Ca의 流入을 억제하며(Singh 등, 1980), K와 Na이 결합된 배지에서 Ca은 精子의 尖帽反應을 유발시키지 못한다고 보고된 바 있다(Hyne, 1984). Talbot 등(1976)은 정자가 受精能力을 獲得하는 동안 Ca이 유입될 수 있도록 精子膜의 透過성이 변한다고 보고하였다.

本實驗에서 Na의 농도가 높은 SHP 液으로 정자를 세척하였을 때 Ca은 精子洗滌液내 수소이온을 증가시킨 것으로 보아 Na과 Ca은 정자의 수정능획득에 작용하는 것으로 示唆된다. 본 실험에서 정자세척액내 수소이온농도는 세척액내 Ca농도 2mM이 10mM보다 높았는데, Singh 등(1980)은 고농도의 Ca은 精子의 生存性を 저해하며 精子는 고농도의 Ca으로부터 스스로를 보호하는 기작을 가지고 있다고 보고하였다.

이상의 結果로 精子細胞내로 유입된 Na과 Ca은 proton 流出을 조정하며, 수소이온의 증가는 精子의 受精能獲得과 관련이 있는 것으로 사료된다.

本實驗에서 BSA-FAF(지방산이 제거된 BSA)는 精子洗滌液내 수소이온을 증가시켰다. Krag-Hansen (1981)은 지방산이 제거된 알부민은 중금속과의 착염 능력이 증진되어 중금속에 의해 저해된 尖帽反應을 촉진시킨다고 보고한 바 있다. 그러므로 BSA-FAF는 精子로부터 수소이온의 流出을 중재함으로써 精子의 尖帽反應을 유발하는 것으로 사료된다.

V. 摘 要

本實驗은 Ca과 BSA가 소 精子洗滌液내 수소이온 농도에 미치는 影響을 조사하기 위하여 실시하였던 바

結果는 다음과 같다.

1. 1과 2차 세척액내 수소이온농도는 공히 2mM Ca를 함유한 SHP液으로 精子를 洗滌했을 때가 SHP液 또는 10mM Ca을 함유한 SHP液으로 정자를 세척했을 때보다 유의하게 ($p < 0.01$) 높았다.
2. 정자세척액내 수소이온농도는 정자를 BSA-FAF를 함유한 SHP液으로 세척했을 때가 SHP液 또는 BSA-V를 함유한 SHP液으로 세척했을 때보다 유의하게 ($p < 0.05$) 높았다.

VI. 引用文獻

1. Davis, B.K., R. Byrne and B. Hungund. 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.
2. Flechon, J.E., R.A.P. Harrison, B. Flechon and J. Escaig. 1986. Membrane fusion events in the Ca/ionophore-induced acrosome reaction. J. Cell Sci. 81 : 43-63.
3. Fraser, L.R. 1983. Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 69 : 539-553.
4. Fraser, L.R. 1985. Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 74 : 185-196.
5. Fraser, L.R. 1987. Minimum and maximum extracellular Ca^{++} requirements during mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 81 : 77-89.
6. Green, D.P.L. 1978. The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. J. Cell Sci. 32 : 137-151.
7. Hyne, R.V. 1984. Bicarbonate and calcium-dependent induction of rapid guinea pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. Biol. Reprod. 31 : 312-323.
8. Hyne, R.V., R.E. Higginson, D. Kohlman and A. Lopata. 1984. Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea-pig sperm acrosome reaction. J. Reprod. Fert. 70 : 83-94.
9. Jamil, K. and I.G. White. 1981. Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A23187 and calcium. Arch. Androl. 7 : 283-292.
10. Kragh-Hansen, U. 1981. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. Pharmacol. Rev. 33 : 17-53.
11. Meizel, S. 1978. The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical approach. In "Development in mammals" Vol. 3 (Johnson eds. North-Holland, Amsterdam) : 1-64.
12. Park, Y.S. and K.S. Im. 1991a. Effects of Ca, BSA, heparin, semen storage and individual bull on sperm motility and acrosome reaction. Korean J. Animal Reprod. 15 : 1-6.
13. Park, Y.S. and K.S. Im. 1991b. Effects of pH of washing solution, washing frequency and individual bull on proton concentration in the sperm washed solution and sperm acrosome reaction. Korean J. Animal Reprod. 15 : 7-13.
14. Rogers, B.J. 1987. Mammalian sperm capacitation and fertilization *in vitro* : A critique of methodology, Gamete Res. 1 : 165-223.
15. Singh, J.P., F. Babcock and H.A. Lardy. 1980. Induction of accelerated acrosome reaction in guinea pig sperm. Biol. Reprod. 22 : 566-570.
16. Talbot, P., R.G. Summers, B.L. Hylan-der, E.M. Keough and L.E. Franklin.

1976. The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A 23187. *J. Expl. Zool.* 198: 383-392.

17. Yanagimachi, R. and N. Usui. 1974.

Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea-pig spermatozoa. *Expl. Cell Res.* 89: 161-174.