

精子洗滌液의 pH와洗滌頻度 및 수소個體가精子洗滌液內 水素이온濃도와 소精子的尖帽反應에 미치는影響

朴永植·任京淳

서울大學校 農科大學

Effects of pH of Washing Solution, Washing Frequency and Individual Bull on Proton Concentration in the Sperm Washed Solution and Sperm Acrosome Reaction

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

College of Agriculture, Seoul National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of pH of sperm-washing solution, sperm-washing frequency and individual bull on concentration of hydrogen ion in sperm-washed solution and sperm acrosome reaction. The results obtained were as follow.

1. When bovine sperm was washed at 4 times with SHP solution and incubated, the difference of light absorbance between sperm-washing and sperm-washed solution ($\Delta A_o - \Delta A_t$) was higher in 2nd sperm-washed solution than that in the other washed solutions.
2. When sperm was thrice washed with SHP solutions of pH 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45, and 8.83, $\Delta A_o - \Delta A_t$ was significantly increased at pH 7.69 to 8.83, and $\Delta A_o - \Delta A_t$ in 1st sperm washed solution was significantly higher than that in 2nd and 3rd sperm washed solution.
3. When sperm of Holstein, KNC and Hereford was thrice washed with SHP solutions of pH 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45, and 8.83, Holstein showed higher $\Delta A_o - \Delta A_t$ of sperm Washed solution than KNC and Hereford, and $\Delta A_o - \Delta A_t$ in sperm washed solution was significantly increased at 7.69 for Holstein and at 8.15 for KNC and Hereford, respectively.
4. When sperm was washed thrice with SHP solution of pH 6.8, 7.1 and 7.4, and then incubated in mTALP of pH 7.4 for 15 minutes, in 1st and 2nd sperm washing $\Delta A_o - \Delta A_t$ of sperm washed solution was significantly higher at pH 7.1 and 7.4 than at pH 6.8, and the sperm acrosome reaction of pH 6.8, 7.1 and 7.4 was 49.1, 68.8 and 72.9%, respectively. The sperm acrosome reaction of pH 7.1 and 7.4 was higher than that of pH 6.8.

I. 緒論

Na와精子培養液의 pH 및精子的洗滌 등이精子

의尖帽反應과受精能에 미치는影響에 관한研究가 보고되고 있다. 칼슘과 더불어 Na은精子的受精能獲得에 중요한 작용을 하며(Bhattacharya 등, 1986;

Edwards와 Hyne, 1985), Na 또는 K 이 결여된 培養液에서 칼슘은 精子的 尖帽反應을 誘發시키지 못한다고 보고된 바 있다(Hyne 등, 1984).

Hyne(1984a; b)은 monovalent ionophore 를 처리하여 精子細胞내로 Na 을 축적시켰는데, 이러한 變化는 Ca/Na 의 交換을 刺戟하여 細胞내로 칼슘의 유입을 조장함으로써 尖帽反應을 誘發한다고 하였다. 또한 Murphy 등(1986)은 기니피 精子的 尖帽反應을 誘發하기 위해서는 60mM 이상의 Na 이 요구된다고 하였으며, Mrsny와 Meizel(1981)은 햄스터 精子的 尖帽反應에 K, Na 및 K-ATPase 活性의 증가가 요구된다고 하였다.

精子培養液의 水素이온농도는 精子的 受精能獲得 및 尖帽反應에 중요한 영향을 미치는데(Cherr, 1985; Hyne과 Garber, 1981; Mahi와 Yanagimachi, 1973; Murphy와 Yanagimachi, 1984), 대부분의 實驗에서 生理的 水準보다 높은 pH는 精子的 尖帽反應을 誘發시키고 受精能獲得時間을 단축시켰다. 精子 주변의 pH는 精子내의 pH를 변화시키며, 尖帽내 pH의 증가는 尖帽反應과 밀접한 관계가 있는데(Hyne, 1984a), Working과 Meizel(1983)은 K과 H에 대한 精子頭部の 膜透過性이 변해서 K이 流入되고 H이 流出되거나, Mg-ATPase proton pump가 억제되어 尖帽내 pH가 증가한다고 하였다.

精子表面成分의 소실은 精子 受精能獲得의 중요한 과정으로서 精子的 洗滌은 受精率을 증가시키는데(Fraser, 1984), Bondioli와 Wright(1983a; b)는 HIS 처리한 精子보다 反復洗滌한 羊 精子和 培養한 卵子에서 높은 精子 浸透率을 얻었으며, Nishimura 등(1989)은 凍結精液을 反復洗滌하여 受精率을 증진시켰다.

細胞培養液내 水素이온의 變化를 측정하기 위해서 proton-indicator가 이용되고 있는데, phenol red는 proton과의 結合能力, 反應時間, 感受性, 解離常數 및 다른 물질에 의한 干涉 排除등에 있어서 다른 indicators(BCP, BPR, BTB)보다 優秀하다고 보고된 바 있다(Chance와 Scarpa, 1979; Scarpa, 1979a; b).

본 實驗은 精子培養液의 pH와 精子的 反復洗滌 및 수소개체의 精液이 精子的 水素이온 유출과 精子的 尖帽反應에 미치는 影響을 조사하기 위하여 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. SHP 液

145mM NaCl液에 10mM의 HEPES와 50 μ M의 phenol red를 용해하고 0.1N HCl과 NaOH로 pH를 적정한 다음 이 액을 0.22 μ m의 공극으로 여과하여 사용할 때까지 암실에서 냉장 보관하였다.

2. mTALP 液

삼투압이 290~300mOsm이고 pH가 7.4로 조정된 TL stock solution(Parrish 등, 1985) 100ml에 사용직전에 BSA, 600mg, pyruvate 11mg, gentamycin 5mg을 첨가하였다.

실험 1 : 精子的 培養과 洗滌이 精子洗滌液內 水素이온 濃도에 미치는 影響

原精液을 SHP 液으로 10배 稀釋한 다음 650 μ 로 10분간 遠心分離하여 上等液을 회수하였다(1차 洗滌液). 침전한 精자를 SHP 液으로 부유하여 39 $^{\circ}$ C에서 15분간 培養한 다음 동일한 方法으로 遠心分離하여 上等液을 회수하였다(2차 洗滌液). 沈澱한 精자를 동일한 方法으로 培養하고 洗滌하여 3차 洗滌液과 4차 洗滌液을 회수하였다. 회수한 洗滌液내 水素이온농도를 측정하였다.

실험 2 : 精子 洗滌液의 pH와 洗滌頻度 및 수소개체가 精子洗滌液內 水素이온 濃도에 미치는 影響

한우 1두(KNC), Holstein 1두 및 Hereford 1두로부터 채취한 精液을 pH가 각각 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45 및 8.83으로 조정된 SHP 液으로 ml 당 精자가 1억이 포함되도록 희석하여 39 $^{\circ}$ C에서 15분간 培養한 다음, 1,800rpm으로 10분간 遠心分離하여 上等液을 회수하였다(1차 洗滌液). 또한 동일한 方法으로 精자를 培養하고 洗滌하여 2차 및 3차 洗滌液을 회수하고 회수액내 水素이온농도를 측정하였다.

실험 3 : 精子洗滌液의 pH와 精子洗滌頻도가 精子洗滌液內 水素이온濃도와 精자의 尖帽反應에 미치는 影響

홀스타인 精液을 pH가 6.8, 7.1 및 7.4인 SHP 液으로 10배 희석하여 1,400rpm으로 5분간 遠心分離한 다음 上等液을 회수하였다(1차 세척액). 침전한 精子를 다시 SHP 液으로 부유하여 1,200rpm으로 5분간 遠心分離한 다음 上等液을 회수하였다(2차 세척액). 다시 沈澱 精子를 같은 方法으로 遠心分離하여 上等液을 회수하였다(3차 세척액). 1, 2 및 3차 세척액내 水素이온농도를 각각 측정하였다. 3회 洗滌된 精子를 pH가 7.4로 조정된 mTALP 液으로 부유하여 39°C에서 15분간 培養한 다음 精子の 尖帽反應率을 조사하였다.

3. 精子洗滌液內 水素이온 濃度 評價

洗滌내 水素이온을 측정하기 위하여, 精子洗滌前液의 基準波長 480nm의 吸光度에서 選擇波長 500, 510, 520nm의 吸光度를 除하여 吸光度差(ΔA_o)를 구하고, 동일한 方法으로 精子洗滌後液의 吸光度差(ΔA_t)를 구한 다음 $\Delta A_o - \Delta A_t$ 를 구하였다. $\Delta A_o - \Delta A_t$ 가 陰의 값을 가질 때 精子洗滌 上等液에는 水素이온이 증가하였다는 것을 의미한다.

III. 結果

1. 精子の 반복培養과 洗滌이 精子洗滌液內 水素이온 濃도에 미치는 影響

精子를 反復해서 培養하고 洗滌하였을 때, 480 및 500nm에서 측정된 精子洗滌前液과 精子洗滌後液의 吸光度差間 變化($\Delta A_o - \Delta A_t$)는 Table 1과 같다.

精子洗滌前液의 吸光度差(ΔA_o)는 0.3976이며, 1, 2, 3 및 4차 精子洗滌液의 吸光度差間 變化($\Delta A_o - \Delta A_t$)는 -0.0372, -0.0662, -0.0161 및 -0.0131

로 2차 精子洗滌液이 가장 높았다. 즉 2차 정자세척액은 1, 3 및 4차 정자세척액보다 상대적으로 더 많은 수소이온을 함유하고 있음을 시사한다.

2. 洗滌液의 pH와 洗滌頻度가 精子洗滌液內 水素이온 濃도에 미치는 影響

pH가 다른 SHP 液으로 精液을 反復洗滌하였을 때, 精子洗滌前液과 精子洗滌後液의 吸光度差間 變化($\Delta A_o - \Delta A_t$)는 Table 2와 같다.

精子洗滌液의 吸光度差間 變化는 洗滌液의 pH가 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45 및 8.83인 경우 각각 0.000, 0.001, -0.001, -0.005, -0.005, -0.021, -0.017, -0.016 및 -0.036으로, pH 7.69에서 유의하게 증가하여 pH 8.83에서 가장 높은 수치를 보였다.

한편 吸光度差間 變化는 1, 2 및 3차 精子洗滌液이 각각 -0.024, -0.006 및 -0.004로, 1차 精子洗滌液에서 유의하게 높았다.

3. 수소개체가 精子洗滌液內 水素이온 濃도에 미치는 影響

각 수소個體의 精液을 pH가 다른 SHP 液으로 반복 세척하였을 때, 精子洗滌前液과 精子洗滌後液의 吸光度差間 變化($\Delta A_o - \Delta A_t$)는 Table 3과 같다.

精子洗滌液의 吸光度差間 變化는 Holstein은 pH 7.69와 8.83에서, KNC과 Hereford는 8.15에서 각각 유의하게 증가하였다.

한편 精子洗滌液의 吸光度差間 變化는 Holstein, KNC 및 Hereford 공히 1차 洗滌이 2와 3차 洗滌보다 유의하게 높았다.

전반적으로, 精子洗滌液의 吸光度差間 變化는 Holstein이 平均 -0.022로 KNC와 Hereford의 -0.

Table 1. Effect of repeat-incubation and washing on light absorbance in sperm washed solution

Frequency of sperm-incubation & washing	Light absorbance		Light absorbance difference		
	at 480nm	at 520nm	ΔA_o	ΔA_t	$\Delta A_p - \Delta A_t$
Sperm-washing solution	0.5901	0.1925	0.3976	-	-
Sperm-washed solution					
- 1st	0.6055	0.1707	-	0.4348	-0.0372
1st 2nd	0.5719	0.1079	-	0.4640	-0.0662
2nd 3rd	0.5686	0.1549	-	0.4137	-0.0161
3rd 4th	0.5719	0.1612	-	0.4107	-0.0131

Table 2. Effect of pH of sperm washing solution and sperm washing frequency on light absorbance difference between sperm washing solution and sperm-washed solution.

pH of washing solution	Light absorbance difference ($\Delta A_o - \Delta A_t$)			
	Washing frequency			Mean
	1st	2nd	3rd	
5.99	0.000 ^c	-0.001 ^{bc}	0.000 ^{bc}	0.000 ^h
6.38	0.002 ^c	0.001 ^c	0.001 ^{bc}	0.001 ^h
6.78	-0.004 ^c	-0.001 ^{bc}	0.002 ^c	-0.001 ^h
7.10	-0.011 ^c	-0.003 ^{bc}	-0.001 ^{bc}	-0.005 ^h
7.40	-0.012 ^c	-0.003 ^{bc}	-0.001 ^{bc}	-0.005 ^h
7.69	-0.046 ^b	-0.010 ^b	-0.008 ^{ab}	-0.021 ^g
8.15	-0.035 ^b	-0.010 ^b	-0.005 ^{abc}	-0.017 ^g
8.45	-0.033 ^b	-0.008 ^{bc}	-0.006 ^{abc}	-0.016 ^g
8.83	-0.076 ^a	-0.020 ^a	-0.013 ^a	-0.036 ^f
Mean	-0.024 ^A	-0.006 ^B	-0.004 ^B	

a, b, c : f, g, h : significantly different at $P < 0.01$ in the same column

A, B : significantly different at $P < 0.01$ in the same row

Table 3. Effect of individual bull on light absorbance difference sperm washed solution

pH of sperm washing solution & Washing frequency	Light absorbance difference ($\Delta A_o - \Delta A_t$)		
	Holstein	NKC	Hereford
pH			
5.99	-0.001 ^c	0.000 ^c	0.000 ^b
6.38	0.003 ^c	0.000 ^c	0.001 ^b
6.78	-0.001 ^c	0.000 ^c	-0.001 ^b
7.10	-0.006 ^c	-0.005 ^c	-0.004 ^b
7.40	-0.009 ^c	-0.004 ^c	-0.004 ^b
7.69	-0.051 ^b	-0.007 ^{bc}	-0.007 ^{ab}
8.15	-0.020 ^c	-0.018 ^a	-0.012 ^a
8.45	-0.027 ^{bc}	-0.008 ^{bc}	-0.011 ^a
8.83	-0.086 ^a	-0.012 ^{ab}	-0.011 ^a
Washing			
1st	-0.048 ^x	-0.012 ^x	-0.011 ^x
2nd	-0.011 ^y	-0.004 ^y	-0.003 ^y
3rd	-0.007 ^z	-0.002 ^z	-0.002 ^z
Mean	-0.022 ⁱ	-0.006 ^j	-0.005 ^j

a, b, c : x, y, z : significantly different at $P < 0.01$ in the same column

A, B : i, j : significantly different at $P < 0.01$ in the same row

006과 -0.005보다 유의하게 높았다.

4. 洗滌液의 pH와 洗滌頻도가 精子洗滌液內 水素이 은濃도와 精子 尖帽反應에 미치는 影響

pH가 다른 SHP液으로 精子를 세번 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 ($\Delta A_o - \Delta A_t$)와 mTALP液에서 15분간 培養한 精子

Table 4. Effect of pH of sperm-washing solution on light absorbance difference and sperm acrosome reaction

pH of sperm washing solution	Light absorbance difference ($\Delta A_o - \Delta A_t$)			Acrosome reaction (%)				
	Washing frequency			Incubation time (min)				
	1st	2nd	3rd	0	3	8	12	15
6.8	0.0320 ^B	0.0123 ^b	0.0087	17.7	38.1	28.5	52.7	49.1 ^x
7.1	-0.0103 ^{AB}	-0.0123 ^a	-0.0047	26.5	22.7	37.8	50.9	68.8 ^y
7.4	-0.0653 ^A	-0.0133 ^a	-0.0037	25.8	24.6	43.2	65.0	72.9 ^y

A, B : significantly different at $P < 0.01$ in the same column

a, b, : x, y : significantly different at $P < 0.05$ in the same column

의 尖帽反應率은 Table 4와 같다.

精子洗滌液의 吸光度差間 變化는 1차와 2차 精子洗滌液에서는 pH 7.1과 7.4가 pH 6.8보다 유의하게 높았으나, 3차 精子洗滌液에서는 pH 6.8, 7.1 및 7.4간에 유의한 차이가 없었다.

反復洗滌한 精자를 mTALP 溶液에서 15분간 培養하였을 때 精子尖帽反應率은, pH 7.1 및 7.4가 각각 68.8 및 72.9%로 pH 6.8의 49.1%보다 유의하게 높았다 ($P < 0.05$).

IV. 考 索

본 實驗에서는 精자를 단순한 NaCl 液으로 반복 洗滌함으로써 다른 이온이나 化合物이 精자에 미치는 影響을 배제하였던 바, 洗滌液의 높은 pH는 精자의 尖帽反應을 증진시켰을 뿐만 아니라, 精子洗滌液내 水素이온濃도를 유의하게 증가시켰다.

pH가 높은 培養液에서 정자를 배양하면 精자의 尖帽反應이 증진되고 (Hyne과 Garbers, 1981; Mahi와 Yanagimachi, 1973; Murphy와 Yanagimachi, 1985; Working과 Meizel, 1983), 精자를 反復洗滌하면 精子로부터 被覆物質이 제거되고 (Bedford, 1970; Johnson, 1975; Oliphant와 Brackett, 1973), 精자의 尖帽反應과 體外受精率이 증가된다고 보고된 바 있다 (Bondioli와 Wright, 1983; Fraser, 1984; Nishimura 등, 1988).

Working과 Meizel(1981)은 精자가 中性인 精漿에 노출되는 경우 精자의 尖帽내 pH가 5정도로 낮게 유지되고 受精能力을 獲得하지 않은 精자의 尖帽外膜에는

ATPase가 있으며, 이 酵素는 精子細胞의 안과 밖의 pH차(ΔpH)를 유지하며, 만약 이 酵素의 活性이 저해되면 尖帽性 ΔpH 가 消滅되어 精子에서 尖帽反應이 誘發된다고 하였다. Proton translocating ATPase는 chromaffin granules, synaptic vesicle 및 lysosomes 등에도 존재하며, pH의 維持와 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Johnson과 Scarpa, 1976; 1979). 한편 Junge(1977)는 精子 주변의 높은 pH가 精子膜의 表面電位를 교란시킨다고 하였으며, Hyne(1985)은 精子내에 농축된 Na^+ 이 精자를 둘러싸고 있는 Ca^{++} 과 교환됨으로서 尖帽反應이 유발된다고 보고한 바 있다.

결론적으로 反復洗滌으로 被覆物質이 제거된 精자는 주위의 높은 pH와 Na에 노출되어 細胞表面電位와 이온농도에 변화가 일어나 精子내로 Na이 流入되고 精子밖으로 proton이 流出되어 精子洗滌液내 水素이온이 증가하는 것으로 사료된다. 한편 精子내 축적된 Na는 mTALP 溶液의 Ca와 교환되며, 精子내 농축된 Ca^{++} 은 proton을 유출시켜 尖帽內 pH의 증가와 더불어 精자의 尖帽反應을 誘發시키는 것으로 사료된다.

透明帶를 제거한 햄스터 卵자를 이용하여 수소 個體의 精자의 受精能力을 비교하고 있으며 (Bousquet와 Brackett, 1982; Davis 등, 1984; Yanagimachi, 1984), 또한 각 수소의 精자의 尖帽反應率을 비교하여 점정우의 受精率을 예견하고 있다 (Ax 등, 1985; Davis와 Foote, 1987; Graham과 Foote, 1984, 1985; 1987 a : b; Lenz 등, 1986; Lenz와 Martin, 1988).

Graham 과 Foote(1987a)는 精子내의 蛋白質과 脂質의 含量은 수소개체간에 차이가 있으며, 이 차이가 精子의 尖帽反應과 受精能獲得에 影響을 미친다고 推論한 바 있다. 본 실험에서도 精子洗滌液內 水素이온의 농도는 洗滌液의 pH와 수소개체간에 차이가 있었는데, 이러한 차이는 수소개체의 精子膜의 미세한 구조의 차와 관련이 있을 것으로 사료된다.

V. 摘 要

본 實驗은 精子 洗滌液의 pH와 洗滌頻度 및 수소개체가 精子洗滌液內 水素이온과 精子尖帽反應에 미치는 影響을 究明하기 위하여 실시하였는바 그 결과는 다음과 같다.

1. 精子를 SHP 液으로 4차례 反復洗滌하여 培養하였을 때, 洗滌液의 吸光度差間 變化는 2차 精子洗滌液에서 가장 높았다.
2. 精子를 pH 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45 및 8.83 SHP 液으로 3번 洗滌하였을 때, 精子洗滌液의 吸光度差間 變化는 pH 7.69~8.83에서 유의하게 증가하였으며, 1차 精子洗滌液이 2차와 3차 精子洗滌液보다 유의하게 높았다.
3. Holstein, KNC 및 Hereford 精子를 pH 5.99, 6.38, 6.78, 7.10, 7.40, 7.69, 8.15, 8.45 및 8.83의 SHP 液으로 3번 洗滌하였을 때, 精子洗滌液의 光度差間 變化는 Holstein 이 KNC와 Hereford 보다 유의하게 높았으며, Holstein 은 pH 7.69~8.83에서, KNC 과 Hereford 는 8.15에서 각각 유의하게 증가하였다.
4. 精子를 pH 가 6.8, 7.1 및 7.4인 SHP 液으로 3번 洗滌한 다음 pH 7.4인 mTALP 液에서 15분간 培養하였을 때, 精子洗滌液의 吸光度差間 變化는 1차 및 2차 精子洗滌에서 pH 7.1과 7.4가 6.8보다 유의하게 높았으며, 精子尖帽反應率은 pH 7.1 및 7.4가 각각 68.8 및 72.9%로 pH 6.8의 49.1%보다 유의하게 높았다($P < 0.05$).

VI. 引用文獻

1. Bedford, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol. Reprod. 2(Suppl) : 128-158.
2. Bondioli, K.R. and R.W. Wright, Jr. 1983 a. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. J. Anim. Sci. 57 : 1001-1005.
3. Fraser, L.R. 1984. Mouse sperm capacitation *in vitro* involves loss of a surface associated inhibitory component. J. Reprod. Fert. 72 : 373-384.
4. Graham, J.K. and R.H. Foote. 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.
5. Hyne, R.V. 1984a. A bicarbonate and calcium induction of rapid guinea-pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. A.B.A. 53 : 416(No. 3130).
6. Hyne, R.V. 1984b. Bicarbonate and calcium-dependent induction of rapid guinea pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. Biol. Reprod. 31 : 312-323.
7. Hyne, V.R. and D.L. Garbers. 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.
8. Johnson, M.H. 1975. The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. J. Reprod. Fert. 44 : 167-184.
9. Junge, W. 1977. Membrane potentials in photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. 28 : 503-536.
10. Mahi, C.A. and R. Yanagimachi. 1973.

- The effects of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 35: 55-56.
11. Murphy, S.J. and R. Yanagimachi. 1984. The pH dependence of motility and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res.* 10: 1-8.
 12. Nishimura, K., H. Matsunaga, Y. Fujitani and S. Kitano. 1987. Improvement of fertilizable of frozen spermatozoa in bovine *in vitro* fertilization. *Jap. Reprod. Tech. Res.* 9: 107-109.
 13. Oliphant, G. and B.G. Brackett. 1973. Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. Reprod.* 9: 404-414.
 14. Working, P.K. and S. Meizel. 1983. Correlation of increased intracrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *J. Reprod. Fert.* 18: 275-286.