

## 정자의 수정능력 평가기법<sup>†</sup>

박 수 봉  
축산기술연구소

## *In Vitro Assays of Sperm Fertility*<sup>†</sup>

S. B. Park

National Animal Research Institute

### SUMMARY

Since the turn of the century, scientists have earnestly sought to develop a single laboratory assay or combination of laboratory assays which accurately predict the fertility of a semen sample. Most of these assays have focused on evaluating physical characteristics of sperm such as motility, viability, acrosomal integrity and morphology. In recent years new approaches have been used to assess the functional aspects of a sperm that are needed to reach the oocyte, fertilize it and contribute to successful embryo development. Among these techniques are the ability of sperm to undergo a heparin induced acrosome reaction and *in vitro* fertilization, and the affinity of sperm to bind heparin binding protein. Intensification of research efforts in the area of control of sperm fertilizing ability should be a high priority, in view of undoubted benefits both to our basic understanding of sperm fertilizing ability and to our ability to modify it for AI industry.

### 서 론

일반적으로 사용되는 정자검정방법은 정액의 동결을 위한 다양한 처리후 인공수정에 이용될 수 있는지를 검정하기 위해 이용된다. 정액은 채취 직후 정자수와 품질을 평가하고 또한 동결정액 제조후 다양한 방법들에 의해 검정되는데 용해후 정자의 검정은 수정능력을 나타내준다. 그러므로, 지난 수십년간동안 학자들은 정자의 수정능력을 정확히 예측할 수 있는 기술개발을 추구해 왔으나 이러한 목적은 수정에 관여하는 수많은 인자들의 연관에 의해 결정되므로 성취하기가 힘들었다. 그러나 최근 종모우에 따라 수태율에 차이가 있음이 확인되어 있고(Nadarajah 등, 1988), 이러한 차이를 검정할 수 있는 간단하고 신뢰성 높은 기술의 확립은 인공수

정 산업에 큰 기여를 할 수 있기 때문에 다양한 연구가 되어왔다. 본고에서는 지금까지 개발되었던 정자검정방법의 개략적 소개와 최근 주목을 받고 있는 정자의 기능성 검정기술에 대해 서술하고자 한다.

### 정자의 검정기술

정자가 난자를 수정시키기 위해 가져야 할 특성은 Table 1에 나타난 바와 같다. 이러한 정자의 특성을 이용하고자 하는 연구에 의해 정자의 운동성, 세포막의 정상성, 첨체의 정상성, 정자의 형태적 정상성, 정자의 대사성 검정 등 많은 검정기술들이 개발되어졌고, 지금까지 개발되어진 기술을 정리하면 Table 2와 같다. 가장 좋은 정자의 검정기술은 수정에 관여하는 다양한 특성을 동시에 전부 검정하는

<sup>†</sup> 1995년도 춘계 한국수정관아식학회 강연요지임.

Table 1. A partial list of attributes that a sperm must possess to fertilize an oocyte

---

Progressive motility
“Acceptable” morphology
Metabolism for energy production
Capacity of hyperactivated motility
Membrane integrity
- plasma membrane
- acrosomal membranes
Membrane lipids
- stabilize plasma and acrosomal membranes
- facilitate timely fusion : but not premature fusion
Membrane proteins
- immunosuppressive factors
- attachment ligands - available but masked to prevent premature binding
- acrosome reaction - inhibiting factor
Integral enzymes associated with fertilization
- enzymes modifying membrane glycolipids
- acrosomal enzymes

---

것이겠지만 그러한 기술은 아직 없다. 최근에 이러한 특성을 몇 가지 동시에 검정할 수 있는 기술개발에 많은 연구가 되고 있는데, 그 예로서 몇가지 염색을 동시에 하여 정자의 생존성, 침체 정상성을 평가하는 방법이 있다(Aalseth와 Saacke, 1986; Didion 등, 1989; Ericsson 등, 1989; Talbot와 Chacon, 1981). 그러나 이들 방법은 준비와 검정에 많은 시간이 소요된다는 단점이 있고 최근에는 swim-up된 정자를 이용한 HOST(Hypo-Osmotic Swelling Test)에 의해 정자의 운동성, 기형정자 제거, 세포막 정상성을 동시에 반영할 수 있는 기술이 개발되어 AI산업에서의 적용성을 검토하고 있다(Park, unpublished data).

최근 flow cytometry보급이 확대됨에 따라 flow cytometry를 이용한 정자검정법이 많이 개발되어졌고, 이 방법은 다른 방법에 비해 짧은 시간에 수천마리의 정자를 정확하게 검정할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이것은 정자 회석시 정자농도 조절에 이용되고(Evenson 등, 1993), 정자 염색체 구조와 종모우 수정능력 검정(Ballachey 등, 1987, 1988; Evenson 등, 1980), X, Y염색체를 가진 정자의 분

Table 2. Method for semen evaluation

---

○ Sperm motility
- Visual motility
- Computer - assisted motility analysis (CASA)
- Photographic motility
- Spectrophotometric assay after swim-up
- Recovery rate after swim-up
○ Plasma membrane integrity
- Hypoosmotic swelling test
- Dye exclusion test (Vital staining)
- Fluorometer
○ Acrosomal integrity
- Determining using DIC microscope
- Acrosome staining
○ Sperm morphology
- Morphological characteristics using wet mounts and staining technique
○ Sperm metabolism
- Glycolysis
- Respiration
○ Hydrogen ion concentration
○ Sperm chromatin structure (DNA stability)
○ Filtration through a column of sephadex gel, glass wool, glass bead
○ Release of the enzyme glutamic oxaloacetic transaminase
○ Acrosin activity
○ Serum - induced head to head agglutination
○ Evaluation of sperm by flow cytometer
○ Function test (Sperm fertilizing ability test)

---

리와 성비 검정(Garner 등, 1983; Pinkel 등, 1985), 정자의 형태분석 (Pinkel 등, 1979), 침체반응 동안의 세포내 Ca 변화 측정(Notan 등, 1992), 정자세포 생존성 검정 (Evensen 등, 1982; Garner 등, 1988; Garner 등, 1986; Matyus 등, 1984)등에 다양하게 이용되고 있다. 또한 flow cytometry는 세포 생존성과 미토콘드리아 활성의 동시분석(Auger 등, 1989; Evenson과 Ballachey, 1986; Evenson 등, 1982), 세포 생존성과 침체상태 동시분석(Tao 등, 1993), 정자생존성 침체상태 미토콘드리아 기능의 동시분석까지 가능하다고 보고되어졌다(Graham 등, 1990).

상기 연구의 대부분은 정자의 운동성, 생존성, 침

체 정상성, 형태 등 정자의 물리적 특성에 근거를 둔 것이었고 이러한 기술들에 의해 정자의 수정능력을 예측하는 것은 어려웠다. 최근에 정자가 난자와 만나 수정되고 성공적인 배 발생을 하기 위해 필요한 정자의 기능적 양상을 평가하고자 하는 연구가 왕성하게 이루어졌고 이런 기술을 정자의 수정능력 검정기술 또는 정자기능검사라 한다.

## 정자의 수정능력 검정기술

정자의 수정능력 검정기술은 Table 3에 나타난 바와 같이 다양하게 검토되어 왔으나 소에서는 주로 heparin에 의한 침체반응 유기율, 체외수정율, zona free hamster egg의 침입성 등을 검정하거나 정자의 heparin 친화성 및 heparin 결합단백질의 농도 측정 등에 의해 정자의 수정능력 검토가 이루어졌다.

### 1. 연구배경

정자의 수정능력을 평가하는 가장 중요한 개념은 정자의 질과 양의 관계이며 주입하는 정자의 양을 조정해줌으로써 종모우 개체간의 수태율차를 최소화 시킬 수 있는 보상될 수 있는 정액의 특질에 있

Table 3. Sperm fertilizing ability test(Function test)

○ Sperm migration test
- Hyaluronate migration
○ Assessment of capacitation
- Sperm surface lection labeling
- Chlortetracycline fluorescence
- Hyperactivated motility
○ Assessment of the acrosome reaction
- AR max concept
- ARIC test
- Responsity to glysoaminolycan
○ Assessment of sperm-zona pellucida binding
- Hemizona assay
- Competitive zona binding test
○ Affinity of sperm to the heparin and heparin binding protein
○ Zona-free hamster egg penetration test
○ <i>In vitro</i> fertilization

고 또한 정액의 양을 증가시키더라도 보상될 수 없는 정액의 특질이 있다(Saacke 등, 1994). 이러한 종모우간의 차이는 각 종모우간의 주입정자수가 증가될 때 최대 수태율을 얻을 수 있는 적정수준에 차이가 있고, 개체간 최대수태율이 다르다는 것에서 알 수 있다(Fig. 1)(den Dass, 1992). 이러한 결과에 의해 과거의 수많은 정자검정기술에 의한 결과가 수태율과 높은 상관관계가 없었던 이유를 이해할 수 있고 결국 주입정자수의 증가에 의해 보상받을 수 없는 정자의 특성을 이해해야만 정확한 기술의 개발이 가능할 것이다. 소에서 수정부위까지 정자가 수송될 때 다양한 벽을 통과해야 하는데(Fig. 2), 수정부위에 도달하는 정자수는 연구자에 따라 다르지만 주입된 정액에 비해 적은 수에 불과하고(Lasson과 Lasson, 1986) 수정 부위에 도달한 정자는 생존성과 정상성이 아주 높다(Krzanowska, 1974; Overstreet 등, 1978; Saacke 등, 1988). 이러한 정자들이 난자와 조우하여 수정하고 정상적인 배발생을 하기 위해서는 단순한 기술에 의해 검정되는 정상성 뿐만 아니라 수정 전후에 일어나는 정자의 기능적 변화가 필요하며, 기능적 변화의 정도는 종모우 개체별로 다르기 때문에 수태율차이가 있다고 추정되므로, 이러한 기능적 변화의 검색에 의해 종모우간의 수태율 차이를 예측할 수 있는 기술개발의 가능성을 모색하였다.

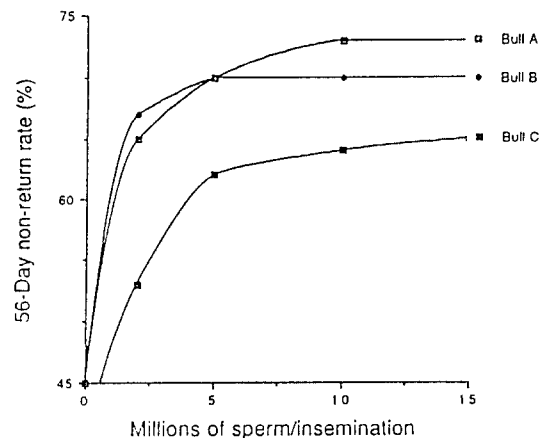


Fig. 1. Comparison of 56 day non-return rates and the number of sperm per insemination for three different bulls(From : den Dass, 1992).

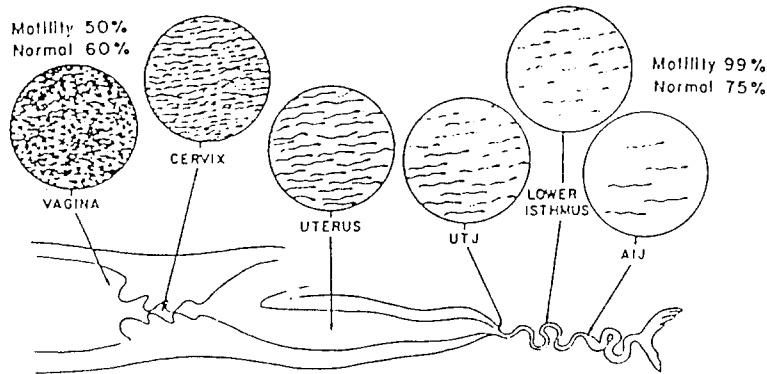


Fig. 2. Schematic summarizing work in many laboratories regarding the major barriers to sperm transport in the female tract. Numbers of sperm reaching the egg at the AIJ(ampullary-isthmus junction) are relatively small in relation to those inseminated; however, they are enriched in quality, particularly viability and to a lesser extent, morphology(From : Saacke, 1994).

## 2. 수정능력 검정기술 연구의 전개

Glucosaminoglycan은 소 정자의 수정능획득, 침체반응을 유기시키고(Lenz 등, 1982) 고수태성 종모우로부터 나온 정자는 저수태성 유래의 것보다 heparin과 같은 glucosaminoglycan에 반응하여 더 높은 정도의 침체반응을 일으키며(Ax 등, 1985; Ax와 Lenz, 1987; Lenz 등, 1988) heparin에 대해 더 높은 결합친화성을 가지고 있고, 이러한 특성을 이용하여 종모우의 상대적인 수정능력을 예측할 수 있다고 시사하였다. 또한 Whitfield와 Parkinson(1992)도 heparin에 의한 정자의 침체반응 유기율의 검정에 의해 수태율을 예측할 수 있다고 주장하였다.

궁극적으로 정자는 난자와 결합하여 침입해야만 수정을 완성할 수 있다. 수정과정에서 정자는 투명대결합, 침체반응, 난세포막결합등 각 단계에 필요한 생리적 변화를 겪게 되는데 *in vitro* penetration 검정은 이러한 특성을 반영해 줄 수 있다(Wheeler와 Seidel, 1987). 현재 일반적으로 소의 체외수정에는 heparin을 첨가하고 있으며, heparin에 의한 정자의 수정능획득과 침체반응 유기에 의해 체외수정 결과에서도 종모우 개체간의 정자특성을 반영할 수 있다고 추론될 수 있다. 이러한 목적으로 추론해볼 때 종모우의 수정능력과 난자의 침입능 및 배발

생과의 상관관계에 대한 연구결과(Hillery 등, 1990; Marguant-Le Guienne 등, 1990; marguant-le Guienne와 humblot, 1991; Shamsuddin과 Larsson, 1993), 고수태성 종모우 유래의 정자를 이용한 실험구에서 유의적으로 높은 수정율 및 배발생율을 얻을 수 있었고, 정자의 수정능력 검정기술로서의 가능성을 시사하였다.

부생식선에서 생산된 heparin결합단백질은 정장내로 들어가(Nass 등, 1990) 사출시 정자에 결합된다(Miller 등, 1990). 정소상체 정자에 heparin 결합단백질을 첨가하면 heparin에 반응하여 침체반응을 유기한다(Miller 등, 1990). 그러므로 Bellin 등(1994)은 정자세포막에 heparin 친화성을 가진 heparin 결합단백질의 함유정도가 정자의 수정능력을 결정할 수 있다고 가정하여 실험하였다. 종모우 300두를 정자세포막과 정장내에 heparin과 가장 친화성이 높은 heparin결합단백질(HBS-B5)의 유무에 따라 분류하였다. Group 1의 종모우들은 정장내에 HBS-5B가 없고, 정자세포막에만 다량 함유하고 있었고, Group 2는 정장내의 정자세포막에 HBP-B5가 함유되어 있으나 그 양은 Group 1보다 적었다. Group 3에는 정장내에만 HBP-B5가 존재하고 Group 4에는 정장내나 정자세포막에 HBP-B5가 없는 종모우로 나누어 자기 인공수정후 수태율을 조사한 결과 Group 1에서는 82%의 수태율을 보여

Table 4. Calculated fertility for all pastures in Group 1 (average of greatest fertility bulls), Groups 1 to 4 (average of all groups in study), and Groups 2 to 4 (average of least fertile groups) for each breed

Item	Average fertility for			Difference between Group 1 and	
	Group	Groups	Groups	Groups	Groups
	1	1 to 4	2 to 4	1 to 4	2 to 4
Red Angus, Trial 1	72	58	50	14	22
Red Angus, Trial 2	85	75	67	10	18
Gelbvieh	—	76	76	—	—
Santa Gertrudis	90	85	81	5	9
Gelbvieh × Santa Gertrudis	80	67	54	13	26
Summary	82	71	65	11	17

(From : Bellin *et al.*, 1994)

전체평균 71%에 비해 11%, Group 1을 제외한 다른 구의 평균에 비해서는 17% 정도 수태율이 높았다. 이는 Group 1과 같은 특성을 가진 종모우의 선별적 이용에 의해 수태율에 큰 증진을 가져올 수 있음을 시사한다(Table 4).

상기 정자의 기능검정방법에 의해 정자의 수정능력을 더욱 정확하게 평가할 수 있으나 이들 방법에서 공통적으로 지향되고 있는 heparin과의 관계는 종모우 특성을 반영하는 것이지만, 젖소에서 heat stress가 주어지는 온도인 29.4℃이상의 온도에 계속적으로 노출될 경우 이상정자의 발생빈도 증가와 함께 heparin과 친화성은 급격하게 떨어진다(Ax 등, 1987). 그러므로 정자의 고수태성 특성 유지는 환경적 요인에 의해 변화되므로 정자의 품질을 유지하기 위한 지속적인 검사를 필요로 하고 있으므로 좀더 간단한 방법의 개선이 필요하다. 또한 수정기구와 관련되는 더 많은 연구에 의해 다양한 기술개발이 가능하게 되면 간단한 정자의 특성검사에 의해 더욱 정확한 상대적인 정자수정능 예측이 가능하리라 사료된다.

### 3. 수정능력 검정기술의 응용

소의 체외수정에서 큰 문제점으로 지적되는 것은 동일조건에서 처리된 정자의 수정율이 정자를 공시한 개체에 따라 9~75%의 상당한 차이를 보여줄 뿐만 아니라(Iritani, 1987) 배발생에도 상당한 차이를 가져온다(Eyestone과 First, 1989; Shi 등, 1990). 그러므로 개체차 해결을 위해서는 정자의 선택적 이용에 의해 크게 개선될 수 있고, 정자의 수정

능 예측기술의 적용에 의해 체외수정에 의한 수정란 다량생산을 더욱 효율화 될 수 있다고 사료된다. 또한 체외수정과 마찬가지로 수정에 이용되는 종모우에 의해 이식한 배의 임신율이 다르다는 보고(Coleman 등, 1987; De Jarnette 등, 1992)가 있고 과배란 유기난자의 수정율은 종모우의 임신율과 밀접한 관계가 있다(Callaghan과 King, 1980). 체외수정 외에 체내수정에도 수정과정에서의 종모우 정액의 특성에 의해 배의 품질 및 양이 결정되는 바 정자의 수정능 예측기술의 적용에 의해 ET산업뿐만 아니라 많은 난자의 공시를 필요로 하는 난자생산 연구, embryo cloning, gene transfer 등 다양한 연구에 크게 기여하리라 사료된다.

## 결 론

수태율에 영향을 미치는 요인은 아주 다양하다. 사료설계, 생식기 감염 및 질병, 수정시기 판정, 정액의 취급기술, 수정기술, 천기나 환경스트레스, 소의 번식성, 정액의 질 등 다양한 요인들이 상호 작용하여 소의 수태율에 영향을 미치며 낙농가의 경영에 크게 작용한다. 상기 요인중 대부분은 농가나 인공수정사의 기술수준과 그들의 선택에 따라 영향을 미치므로 제어하기가 힘들나 정액의 질은 개량사업소의 일괄생산에 거의 의존하고 있어 정액의 질적 향상은 전 농가에 그 효과가 파급될 수 있으므로 기대 효과가 크다. 상기 지적된 바와 같이 고수태성 종모우 정액의 선택과 확대 생산에 의해 농가의 생산성은 크게 개선될 여지가 많다고 사료된다.

앞으로 인공수정과 관련된 여러 요인에 따른 개선점을 도출해내고 그 해결과 동시에 기술을 증진시켜 나가면 수태율 향상과 가축개량의 촉진에 크게 기여하리라 믿어진다. 최근 국내에서는 정자 연구가 상당히 제한되어져 있으나 외국에서는 sperm sexing 연구와 sperm을 vector로 이용하는 transgenic animal 생산 연구 등에 왕성하게 연구가 진행되고 있음을 반추해 볼 때 인공수정과 관련하여 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

## 참고문헌

- Aalseth EP and Saacke RG. 1986. Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete Res.* 15:73-81.
- Auger J, Ronot X and Dadoune JP. 1989. Human sperm mitochondrial function related to motility : a flow and image cytometrics assessment. *J. Androl.* 10:439-448.
- Ax RL, Dickson K and Lenz RW. 1985. Induction of the acrosome reaction by chondroitin sulfates *in vitro* corresponds to non return rates of dairy bulls. *J. Dairy Sci.* 68:387.
- Ax RL, Gilbert GR and Shook GE. 1987. Sperm in poor quality semen from bulls during heat stress have a lower affinity for binding hydrogen-3heparin. *J. Dairy Sci.* 70:195-200.
- Ax RL and Lenz RW. 1987. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J. Dairy Sci.* 70:1477.
- Ballachey BE, Hohenboken WD and Evenson DP. 1987. Heterogeneity of sperm nucleus chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol. Reprod.* 36:915-925.
- Ballachey BE, Evenson DP and Saacke RG. 1988. The sperm chromatin structure assay relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.* 9:109-115.
- Bellin ME, Hawkins HE and Ax RL. 1994. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J. Anim Sci.* 72:2441-2448.
- Callaghan BD and King GJ. 1980. Determination of the fertilization rate of AI sires. *Theriogenology* 14:403(Abstr.).
- Coleman DA, Dailey RA, Leffel RE and Baker RD. 1987. Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *J. Dairy Sci.* 70:858 (Abstr.).
- De Jarnette JM, Saacke RG, Bame J and Vogler CJ. 1992. Accessory sperm ; their importance to fertility and embryo quality and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 70:484 (Abstr.).
- den Dass N. 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.* 28:87-94.
- Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR and Graves CN. 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res.* 22:51-57.
- Ericsson SA, Garner DL, Redelman D and Ahmad K. 1989. Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometer system. *Gamete Res.* 22:355-368.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210:1131-1133.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 279-280.

- Evenson DP and Ballachey BE. 1986. Flow cytometric evaluation of bull chromatin structure, mitochondrial activity, viability and concentration. Proc. Eleventh N.A.A.B. Tech. Conf. A.I. Reprod. p.109.
- Evanson DP, Parks JE, Kaproth MT and Jost LK. 1993. Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. J. Dairy Sci. 76:86-94.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Variation in bovine embryo development *in vitro* due to bulls. Theriogenology 31:191(Abstr.).
- Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA and Johnson LA. 1983. Quantification of the X- and Y-chromosome bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. Biol. Reprod. 28:312-321.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA and Pace MM. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. Biol. Reprod. 34:127-138.
- Garner DL, Johnson LA and Allen CH. 1988. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. Theriogenology 30:369-378.
- Graham JK, Kunze E and Hammerstedt RH. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. Biol. Reprod. 43:55-64.
- Hillery FL, Parrish JJ and First NL. 1990. Bull specific effect on fertilization and embryo development *in vitro*. Therogenology 33:249(Abstr.).
- Iritani A. 1987. A recent advances in embryology and embryo manipulation and their potential contribution to agriculture Proc. 4th AAAP Anim. Sci. Cong. New Zealand, 126-130.
- Krzanowska H. 1974. The passage of abnormal spermatozoa through the uterotubal junction of the mouse. J. Reprod. Fert. 38:81.
- Larsson B and Larsson K. 1986. Sperm localization in the oviducts of artificially inseminated dairy cattle. Acta Vet. Scand 27:303 (Abstr.).
- 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. Commun. 106:1092.
- Lenz RW, Martin JL, Bellin ME and Ax RL. 1988. Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. J. Dairy Sci. 71:1073.
- Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M and Thibault C. 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. Reprod. Nutri. Dev. 30. 259.
- Marquant-Le Guienne B and Humblot P. 1992. Tests de fertilité chez l'animal domestique par fecondation *in vitro*. Ann. Zootech. 41:361.
- Matyus L, Szabo Jr G, Resli I, Gaspar Jr R and Damjanovich S. 1984. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. Acta Biochem. Biophys Acad. Sci. Hung. 19:209-214.
- Miller DJ, Winer MA and Ax RL. 1990. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparine. Biol. Reprod. 42:899(Abstr.).
- Nadarajah K, Burnside EB and Schaeffer LR. 1988. Genetic parameters for fertility of dairy bulls. J. Dairy Sci. 71:2730(Abstr.).
- Nass SJ, Miller DJ, Winer MA and Ax RL. 1990. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to caudal epididymal spermatozoa and are testosterone-

- one dependent. *Mol. Reprod. Dev.* 25:237.
- Nolan JP, Graham JK and Hammerstedt RH. 1992. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 292: 311-322.
- Overstreet JW, Cooper W and Katz DF. 1978. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. II. The sustained phase of transport. *Biol. Reprod.* 19:115(Abstr.).
- Pinkel D, Dean P, Lake S, Peters D, Mendelsohn M, Gray J, Vand Dilla M and Gledhill B. 1979. Flow cytometry of mammalian sperm progress in DNA and morphology measurement. *J. Histochem. Cytochem.* 27:353-358.
- Pinkel D, Garner DL, Gledhill BH, Lake S, Stephenson D and Johnson LA, 1985. Flow cytometric determination of the proportions of X- and Y-chromosome-bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. *J. Anim. Sci.* 60:1303-1307.
- Saacke RG, Barne J, Karabinus DS, Mullins J and Whitman S. 1988. Transport of abnormal sperm in the artificially inseminated cow based accessory sperm in the zona pellucida. *Proceedings 11th Int'l Cong. Anim. Reprod. and Artif. Insem. Dublin*, 3. 292.
- Saacke RG, Nadir S and Nebel RL. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology* 41:45-50.
- Shamsuddin M and Larsson B. 1993. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reprod. Dom. Anim.* 28:77.
- Shi DS, Lu KH and Gordon I. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. *Theriogenology* 33:324(Abstr.).
- Talbot P and Chacon RS. 1981. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.* 215:201-258.
- Tao J, Critser ES and Critser JK. 1993. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *J. Androl.* p.62 (Abstr.).
- Wheeler MB and Seidel Jr GE. 1987. Zona pellucida metrations assay for capacitation of bovine sperm. *Gamete Res.* 18:237-250.
- Whitfield CH and Parkinson TJ. 1992. Relationship between fertility of bovine semen and *in vitro* induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology* 38:11-20.