

난포액이 Sucrose 층을 이용한 정자의 Swim-up 분리에 미치는 효과

김경화 · 여영근 · 박영식
경북대학교 농과대학

Effect of Follicular Fluid on Sperm Swim-up Separation with Sucrose Layer

K. H. Kim, Y. K. Yeo and Y. S. Park
College of Agriculture, Kyungpook National University

SUMMARY

To establish a system for sperm swim-up separation through sucrose layer, indiscreet sperm migration should sufficiently to block but movement of sperm shouldn't inhibit. Thus, the effects of sucrose levels in sucrose layer, incubation times and types of sucrose layer on sperm separation were examined. And the results obtained were as follows;

1. Layer of 10mM sucrose inhibited sperm swim-up migration through sucrose layer.
2. Incubation for 25 minutes without sucrose layer significantly increased sperm swim-up migration. However, incubation for 10 minutes to induce swim-up through sucrose layer significantly stimulated sperm migration and maintained sperm movement.
3. There was no significant difference between Type I and Type II in barrier effect of sucrose layer. However, sucrose layer of Type II with shorter distance of barrier was efficient for sampling.

To elucidate a function of follicular fluid on sperm chemotaxis using *in vitro* system of sucrose layer of Type II and incubation for 10 minutes, the effects of dilution, heat treatment, and protein and lipid extracts of follicular fluid on sperm swim-up separation were examined. And the results obtained were as follows;

4. Follicular fluid stimulated sperm migration and movement, and significantly-attracted capacitated-sperm at 10% level.
5. Follicular fluid heated at 56°C for 30 minutes maintained the effect of follicular fluid stimulating sperm migration and movement.
6. Follicular protein stimulated sperm movement that was reduced by filtration of the protein.

본 연구는 학술진흥재단에서 지원한 연구비(1997)에 의해 수행되었음.

7. Follicular lipid didn't significantly stimulate sperm migration and movement.
8. Both of follicular protein and lipid reduced the effect of follicular fluid stimulating sperm migration and movement.

In conclusion, sucrose layer could be used for a barrier against indiscreet sperm migration by swim-up. And follicular fluid stimulated migration and movement of sperm and attracted capacitated-sperm through sucrose layer. Especially, heat-resistant protein of follicular fluid stimulated sperm migration.

(Key words : sperm selection, sucrose layer, swim-up migration, movement, follicular fluid, protein, lipid)

서 론

수정에 참여하는 정자는 난관 협부에 머물다가 배란시 난관팽대부로 이동하는데 이때 수정능력을 획득한 정자의 생리적 선별이 일어나게 된다. 체외에서 정자를 선별하기 위해서는 정자의 이동을 유도하면서 원치 않는 정자의 부유를 억제할 수 있는 정자의 분리체계가 요구된다.

정자의 분리방법 중에서 swim-up 현상을 이용한 정자의 분리방법 (Parrish와 Foote, 1987)은 체외수정의 발달과 더불어 많이 이용되고 있다. Swim-up에 의해 분리된 정자는 sephadex로 분리한 정자에 비하여 저장액에서 팽창에 대한 내성이 큰 것으로 보고된 바 있다 (Check 등, 1992). 이러한 swim-up 분리의 효과는 정액의 성상에 따라 차이가 있는데, Oehninger 등 (1990)은 양질의 정액으로부터 정자를 swim-up 분리하는 경우 정자의 활력, 운동정자의 비율 및 정자의 회수율이 증가하였으나 불량한 정액에서는 분리후 정자의 활력과 운동속도가 오히려 감소하였다고 하였으며, 정상 정액으로부터 정자를 분리한 Chen 등 (1995)은 정자의 회수율이 높은 percoll 경사를 이용한 정자의 분리에 비하여 swim-up 방법으로 회수한 정자의 활력, 운동속도 및 운동형태가 우수하였다고 보고한 바 있다.

Swim-up 현상을 이용하여 정자를 분리하면 소용돌이 현상에 의해 운동성이 없거나 기형인 정자 등 원치 않는 정자가 부유될 수 있다. 이러한 무분별한 정자의 부유를 억제하기 위해서 정자의 swim-up 이동에 대한 선택적인 장애가 요구된다.

이러한 장애를 만들기 위하여 sucrose 농도 경사를 이용할 수 있는데, 아직 sucrose 농도 경사를 이용 정자를 분리하고자 하는 시도는 없었다. 한편 sucrose는 배양액의 삼투압을 증가시키며, 높아진 삼투압은 정자의 운동성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Johnson과 Howards, 1977). 따라서 정자를 효율적으로 분리하기 위해서는 삼투압에 의한 정자의 손상을 최소화하면서 정자의 이동에 장애가 되는 sucrose 농도 경사를 만들어야 한다.

난포액은 정자의 이동과 정자막의 안정화에 영향을 미친다. 배란시 난관내로 유입되는 난포액은 수정능력을 획득한 정자의 이동을 자극하는데 (Hansen 등, 1993), 난포액의 정자 유인능에 관한 연구에서 박 (1997)은 난포액이 정자의 swim-up 이동과 운동을 자극한다고 하였으며, Cohen-Dayag 등 (1994)은 전체 정자 중에서 2~12%의 정자가 난포액에 반응하여 이동하였다고 보고한 바 있다. 한편 난포액이 함유된 용액에서 배양된 정자의 경우 cholesterol과 인지질 함량이 감소하였는데 (Hamamah 등, 1995), Fournier-Delpech와 Thibault (1993)는 난포액에 함유되어 있는 고밀도 지단백 (high density lipoprotein)과 albumin이 cholesterol의 수용체로 작용하여 정자막으로부터 cholesterol을 제거하고 이로 인하여 정자막이 불안정하게 된다고 보고한 바 있다. 따라서 난포액에 의한 정자막의 불안정화는 정자의 수정능 획득 반응 및 침모반응의 유발 등 수정현상과 밀접한 관련이 있다.

본 연구는 sucrose 농도 경사를 이용하여 운동

활성이 강한 정자의 이동을 유도하고 원치 않는 정자의 부유를 억제할 수 있는 정자 분리체계를 구축하고, 이러한 sucrose 층을 이용하여 난포액과 그 구성분이 정자의 swim-up 분리에 미치는 영향을 밝히기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 정자선별용 기초용액의 준비

정액을 회석하고 정자를 세척하고 배양하기 위하여 108mM NaCl, 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 pH가 7이 되도록 조정된 정자선별용 기초용액(basic medium for sperm selection, bMSS)을 준비하였다.

2. 난포액의 준비

신선한 난소에 있는 직경이 2~5mm인 난포로부터 회수한 난포액은 2,000rpm에서 30분간 원심분리하였으며, 원심분리후 상등액만을 회수하여 실험에 사용할 때까지 -40°C 에서 동결 보존하였다.

3. 난포액내 단백질의 추출

동결한 난포액을 용해하여 0°C 로 냉각하였다. 냉각된 난포액에 5배의 methanol을 점진적으로 첨가한 다음 10배의 isoctane을 추가하고 충분히 혼합하였다. 혼합액을 30분간 냉장실에 정치하여 층분리를 유도한 다음 단백질이 함유되어 있는 methanol층을 회수하여 $0.45\mu\text{m}$ 공극의 filter로 여과하였다. 여과액내 methanol을 질소가스로 휘발시킨 다음 여과액을 진공건조기에서 건조하였으며, 건조된 분말은 난포액 원액의 1/10배가 되도록 bMSS로 회석한 다음 실험 6과 실험 8의 계획에 따라 직접 사용하거나 $0.22\mu\text{m}$ 공극의 filter를 이용 여과한 다음 사용하였다.

4. 난포액내 지질의 추출

용해한 난포액에 5배의 chloroform-methanol

(2:1) 용액을 첨가하고 vortex mixer를 이용 충분히 혼합한 다음 혼합액을 냉장실에서 1시간 동안 정치하였다. 이어 혼합액을 2000rpm으로 10분간 원심분리한 다음 지질이 함유되어 있는 chloroform층을 회수하였다. 회수한 용액내 지질성분을 농축하기 위하여 질소가스로 chloroform을 휘발시켰다. 농축한 지질을 난포액 원액의 1/10배가 되도록 ethanol로 회석한 다음 실험 7과 실험 8의 계획에 따라 사용하였다.

5. 실험계획

1) Sucrose 농도 경사를 이용한 정자의 분리체계 구축

(1) 실험 1: Sucrose 적정 농도

정자의 부분별한 이동을 제한하면서 운동을 억제하지 않는 장애를 만들기 위하여 sucrose가 각각 1, 5 및 10mM 첨가된 bMSS (suMSS) $480\mu\text{l}$ 를 bMSS $500\mu\text{l}$ 아래에 주입하여 이중층을 형성한 다음 36°C 에서 10분간 온도를 평형시켰다. 한편, 액체질소에서 동결 보존된 소 정액을 공기 중에서 7초간 방치한 다음 36°C 항온수조에서 20초간 용해하였다. 용해한 정액을 15ml 원심분리관에 옮기고 bMSS로 5배 회석하였다. 회석한 정액을 1500rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 bMSS $80\mu\text{l}$ 를 첨가하여 정자펠렛을 재부유하였다. 재부유한 정액 $20\mu\text{l}$ 를 온도가 평형된 bMSS-suMSS 이중층 아래에 주입하여 36°C 에서 30분간 배양하였다. 배양후 상등액 $500\mu\text{l}$ 를 회수하여 정액성상검사판을 이용 정자의 수와 운동정자의 비율을 측정하였다.

(2) 실험 2: 최적 배양시간

정자의 운동을 저해하지 않으면서 회수정자의 수를 극대화할 수 있는 배양시간을 결정하기 위하여, 15ml의 원심분리관에 bMSS $980\mu\text{l}$ 를 주입하거나, bMSS $500\mu\text{l}$ 아래에 10mM의 sucrose가 함유된 bMSS (suMSS) $480\mu\text{l}$ 를 주입한 다음 실험 1과 동일한 방법으로 온도를 평형시켰다. 실험 1의 방법에 따라 용해하고 회석한 정액을 원심분

리한 다음 bMSS 80 μ l를 첨가하여 정자펠렛을 재부유하였다. 재부유한 정액 20 μ l를 온도가 평형된 bMSS (980 μ l) 또는 bMSS-suMSS (500 μ l:480 μ l) 아래에 주입한 다음 36°C에서 5, 10, 15, 20, 25 및 30분간 배양하였다. 배양후 원심분리관의 600 μ l지점에서 용액 10 μ l를 회수하여 실험 1과 동일한 방법으로 정자의 수와 운동정자의 비율을 측정하였다.

(3) 실험 3: 효율적인 sucrose 장애의 형태

정자의 분리에 효과적인 sucrose 이종층의 형태를 결정하기 위하여, Type I에서는 500 μ l의 bMSS 아래에 10mM sucrose 함유 bMSS (suMSS) 480 μ l를 주입하였으며, Type II에서는 980 μ l의 bMSS 만을 원심분리관에 주입하여 실험 1과 같이 온도를 평형시켰다. 한편, 실험 1의 방법에 따라 용해하고 회석한 정액을 원심분리하였으며, Type I에 사용하기 위하여 bMSS 또는 Type II에 사용하기 위하여 suMSS를 각각 80 μ l씩 첨가하여 정자펠렛을 재부유하였다. 재부유한 20 μ l의 정액을 미리 준비한 Type I과 Type II 용액 아래에 주입한 다음 36°C에서 10분간 배양하였으며, 배양후 상층액 500 μ l를 회수하여 실험 1과 동일한 방법으로 정자의 수와 운동정자의 비율을 측정하였다.

2) 난포액과 구성분이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리에 미치는 효과

(4) 실험 4: 적정 난포액의 첨가 농도

난포액이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리에 미치는 영향을 조사하기 위하여 용해한 난포액을 5, 10 및 20%가 되도록 bMSS로 회석하였다. 회석한 난포액 980 μ l를 원심분리관에 주입하고 실험 1과 같이 온도를 평형시켰다. 한편 실험 1의 방법에 따라 용해하고 회석한 정액을 원심분리한 다음 10mM sucrose 함유 bMSS (suMSS) 60 μ l를 첨가하여 정자펠렛을 재부유하였다. 재부유한 정액 20 μ l를 미리 준비한 회석난포액 980 μ l 아래에 주입한 다음 36°C에서 10분간 배양하였다. 배양후 상층액 500 μ l를 회수하여 정

액성상검사관을 이용 정자의 수와 운동정자의 비율을 측정하였다. 또한 회수된 정자중 수정능획득 정자의 비율을 조사하기 위하여 배양후 회수한 상층액에 수정능획득 정자에서 첨모반응을 유발하는 phorbol 12-myristate 13-acetate 5 μ M를 첨가하고 36°C에서 30분간 배양한 다음 첨모반응 정자의 비율을 조사하였다.

(5) 실험 5: 저온 열처리한 난포액의 효과

저온 열처리한 난포액이 정자의 이동과 운동에 미치는 영향을 조사하기 위하여, bMSS, bMSS로 회석한 10% 난포액 (FF-MSS) 및 56°C에서 30분간의 열처리한 난포액을 bMSS로 회석한 10% 난포액 (hFF-MSS)을 준비한 다음 실험 1과 같이 온도를 평형시켰다. 한편 실험 1의 방법에 따라 용해하고 회석한 정액을 원심분리한 다음 10mM sucrose 함유 bMSS (suMSS) 60 μ l를 첨가하여 정자펠렛을 재부유하였다. 재부유한 정액 20 μ l를 미리 준비한 회석난포액 980 μ l 아래에 주입한 다음 36°C에서 10분간 배양하였다. 배양후 상층액 500 μ l를 회수하여 정액성상검사관을 이용 정자의 수와 운동정자의 비율을 측정하였다.

(6) 실험 6: 난포액내 단백질 성분의 효과

난포액으로부터 추출한 단백질 성분이 정자의 이동과 운동에 미치는 영향을 조사하기 위하여, bMSS, bMSS로 회석한 10% 난포액 (FF-MSS), 10% 난포액에 해당하는 단백질성분이 함유된 bMSS (FF_p-MSS) 및 0.22 μ m의 공극을 이용 여과한 10% 난포액에 해당하는 단백질성분이 함유된 bMSS (FF_p-MSS)를 준비한 다음 실험 1과 같이 온도를 평형시켰으며, 실험 5와 동일한 방법으로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수된 정자의 수와 운동정자비율을 조사하였다.

(7) 실험 7: 난포액내 지질성분의 효과

난포액으로부터 분리한 지질성분이 정자의 이동과 운동에 미치는 영향을 조사하기 위하여, bMSS와 10% 난포액에 해당하는 지질이 함유된 bMSS (FF_L-bMSS)를 준비한 다음 실험 1과 같이 온도를 평형시켰으며, 실험 5와 동일한 방법으

로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수된 정자의 수와 운동정자비율을 조사하였다.

(8) 실험 8: 난포액내 단백질과 지질 성분 병용 효과

난포액으로부터 회수한 단백질성분과 지질성분이 정자의 이동과 운동에 미치는 영향을 조사하기 위하여, bMSS, bMSS로 희석한 10% 난포액 (FF-bMSS) 및 10% 난포액에 해당하는 단백질과 지질성분을 모두 함유한 bMSS (FF_{PL}-bMSS)를 준비한 다음 실험 1과 같이 온도를 평형시켰으며, 실험 5와 동일한 방법으로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율을 조사하였다.

6. 통계처리

반복처리에 의해 얻어진 결과는 분산분석(AN-OVA)에 의해 통계 처리하여 mean±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 각각 5% 또는 1% 수준에서 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

결과 및 고찰

1. 정자분리를 위한 최적 sucrose 농도의 결정
불연속적인 밀도 경사를 이용하여 물질을 분리할 수 있는데, sucrose 농도 경사가 정자 이동에 장애가 될 수 있는지를 조사하고 나아가서 정자의 운동을 감소시키지 않으면서 정자의 이동을

억제할 수 있는 sucrose 층에 첨가되는 적정 sucrose 농도를 결정하기 위하여 sucrose 농도가 정자의 이동과 운동성에 미치는 효과를 조사하였던 바 얻어진 결과는 Table 1과 같다.

정자의 이동에 대해 장애를 부여하기 위하여 사용하는 sucrose의 농도가 각각 0, 1, 5 및 10 mM 일 때, swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 34.7±4.2, 30.0±13.8, 19.5±2.3 및 14.8±5.5×10⁴였으며, 운동정자의 비율은 각각 66.4±7.4, 55.7±5.1, 48.2±3.5, 및 57.2±10.9%였다.

회수된 정자의 수는 5mM 또는 10mM sucrose 첨가구가 sucrose를 첨가하지 않은 대조구에 비하여 유의하게 낮았으나 1mM sucrose 첨가구는 대조구와 유의한 차이는 없었다. Sucrose의 첨가 농도가 증가할수록 정자의 swim-up 이동은 감소하였다. 한편 1mM의 sucrose 첨가구에서 표준오차 (SE)가 크게 나타났는데, 1mM의 sucrose는 정자의 swim-up 이동에 대한 장애로서의 한계인 것으로 추론된다.

회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 첨가구와 대조구간에 유의한 차이가 없었으나, 1mM sucrose 첨가구에 비해 5mM sucrose 첨가구에서 저하되었으며 10mM의 첨가구에서는 오히려 증가하는 경향이 있었다. 이는 5mM sucrose 층에서 상대적으로 높은 삼투압 때문에 정자의 운동성이 감소하였으나, 10mM sucrose 층에서는 정자의 이동에 대해 상대적으로 강한 장애를 형성함으로써 회수된 정자의 수는 감소하였으나 운동 능이 강한 정자가 회수되었기 때문에 운동정자의 비율이 높아진 것으로 추론된다. 한편 10mM의 sucrose 첨가구에서 표준오차가 크게 나타났다.

Table 1. Effect of sucrose concentration in sucrose layer on swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration

Sucrose concentration	No. of sperm recovered (×10 ⁴)	Percentage of motile sperm (%)
0(control)	34.7± 4.2 ^c	66.4± 7.4
1	30.0±13.8 ^{cd}	55.7± 5.1
5	19.5± 2.3 ^d	48.2± 3.5
10	14.8± 5.5 ^d	57.2±10.9

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

Table 2. Effect of incubation time on swim-up migration through layers of 0 and 10mM sucrose and movement of sperm recovered from the migration

Incubation times (minutes)	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)		Percentage of motile sperm (%)		
	Sucrose layer	0 (Control)	10mM	0 (Control)	10mM
5		21.0 \pm 4.9 ^c	10.0 \pm 3.8 ^a	65.4 \pm 11.2	64.3 \pm 4.5 ^c
10		44.0 \pm 7.8 ^{cd}	45.6 \pm 1.7 ^b	68.3 \pm 2.9	74.1 \pm 2.9 ^c
15		63.7 \pm 28.3 ^{cd}	54.7 \pm 0.7 ^b	64.5 \pm 4.4	47.1 \pm 4.4 ^d
20		67.0 \pm 18.5 ^{cd}	49.7 \pm 1.3 ^b	59.5 \pm 3.3	45.8 \pm 3.5 ^d
25		78.3 \pm 12.4 ^d	56.3 \pm 3.7 ^b	53.9 \pm 7.5	44.6 \pm 3.7 ^d
30		73.7 \pm 7.5 ^d	53.7 \pm 9.1 ^b	60.4 \pm 4.5	53.2 \pm 11.2 ^d

* 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 $p < 0.05$.

따라서 10mM sucrose는 정자의 운동을 저해할 수 있는 한계인 것으로 추론된다.

결론적으로 정자의 무분별한 이동에 충분한 장애가 되면서 정자의 운동성에 영향을 최소화할 수 있는 10mM의 sucrose가 정자의 swim-up분리에 적절한 것으로 사료된다.

2. 정자분리를 위한 최적 배양시간의 결정

정자의 swim-up 분리를 위한 적정 배양시간을 결정하기 위하여 배양시간에 따라 회수되는 정자의 수와 운동정자의 비율을 조사하였던 바 얻어진 결과는 Table 2와 같다.

정액을 5, 10, 15, 20, 25 및 30분간 배양하여 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 sucrose 이중층을 이용하지 않은 경우 (Control) 각각 21.0 \pm 4.9, 44.0 \pm 7.8, 63.7 \pm 28.3, 67.0 \pm 18.5, 78.3 \pm 12.4 및 73.5 \pm 7.5 $\times 10^4$ 였으며, 10 mM sucrose 이중층의 경우 각각 10.0 \pm 3.8, 45.6 \pm 1.7, 54.7 \pm 0.7, 49.7 \pm 1.3, 56.3 \pm 3.7 및 53.7 \pm 9.1 $\times 10^4$ 였다. 한편 운동정자의 비율은 Control의 경우 각각 65.4 \pm 11.2, 68.3 \pm 2.9, 64.5 \pm 4.4, 59.5 \pm 3.3, 53.9 \pm 7.5 및 60.4 \pm 4.5% 였으며, sucrose 이중층의 경우 각각 64.3 \pm 4.5, 74.1 \pm 2.9, 47.1 \pm 4.4, 45.8 \pm 3.5, 44.6 \pm 3.7 및 53.2 \pm 11.2%였다.

회수된 정자의 수는 대조구의 경우 25분 배양과 30분 배양이 5분 배양에 비하여 유의하게 높았으나 10분, 15분 및 20분 배양과는 유의한 차이가 없었다. 그러나 배양시간이 증가하면서 회수된 정자의 수는 증가하였다. 따라서, 이중층을 이용

하지 않고 정자를 분리하는 경우에는 25분간의 배양이 정자의 swim-up 분리에 적절한 것으로 사료된다. 한편, 15분 배양에서 표준오차가 가장 크게 나타났다는데, 이 때가 정자 이동의 전환점인 것으로 추론된다. 이에 비하여 sucrose 이중층을 이용하여 정자를 분리하는 경우 회수된 정자의 수는 10분 배양이 5분 배양에 비하여 유의하게 높았으나, 15분, 20분, 25분, 및 30분 배양과 유의한 차이가 없었다. 따라서 sucrose 이중층을 이용하여 정자를 분리하는 경우 10분간의 배양이 정자의 swim-up 분리에 적절한 것으로 사료된다.

한편, 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 이중층을 이용하지 않은 경우 (Control) 배양시간에 유의한 차이가 없었다. 한편, 5분 배양에서 표준오차가 가장 크게 나타났는데, 따라서 이중층을 이용하지 않고 정자를 선별하는 경우 5분간 배양을 전후하여 무분별한 정자의 이동이 일어나는 것으로 추론된다. 한편 sucrose 이중층을 이용하는 경우 회수한 정자중에서 운동정자의 비율은 10분과 5분 배양이 15분, 20분 및 25분 배양에 비하여 유의하게 높았다. 한편, 30분 배양에서 표준오차가 가장 크게 나타났는데, 이는 10mM의 sucrose용액에서 예상되는 높은 삼투압에 의한 정자의 손상과 관련이 있으며, 이 시기가 정자의 운동성에 영향을 미치는 한계시기인 것으로 추론되며, 이는 실험 1의 결과와 일치한다. 또한 난포액의 정자유인능을 조사하기 위해 이중챔버를 이용한 연구에서 Villanueva-Diaz 등 (1992)은 10분간의 배양에서 정자의 이동이 최고치에 도달했다

고 보고한 바 있다.

결론적으로 sucrose 이중층을 이용하지 않는 경우 25분간의 배양시간과 10mM sucrose 이중층을 이용한 경우 10분간의 배양시간이 정자의 swim-up 분리에 가장 적절한 것으로 사료된다.

3. 정자의 분리에 효율적인 sucrose 장애의 형태

장애의 거리가 정자의 이동과 운동성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 장애 거리를 달리한 두 종류의 sucrose 이중층이 정자의 swim-up 분리에 미치는 효과를 조사하였던 바 얻어진 결과는 Table 3과 같다.

정액을 10분간 배양하였을 때 두 종류의 sucrose 장애로부터 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 Type I과 Type II에서 각각 8.3 ± 3.2 및 $9.0 \pm 3.1 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 Type I과 Type II에서 각각 37.0 ± 2.3 및 $45.6 \pm 6.7\%$ 였다.

회수된 정자의 수는 장애 거리가 상대적으로 짧은 Type II가 상대적으로 긴 Type I에 비하여 높았으나 유의한 차이는 없었다. 역시 회수된 정

자 중에서 운동정자의 비율도 Type II가 Type I에 비하여 높았으나 유의한 차이는 없었다. 그러나 Type I의 sucrose 층에서 소용돌이 (swirling-up) 현상이 일어나서 정자의 회수를 어렵게 하였다.

결론적으로 정자의 이동에 대한 장애로서 뿐만 아니라 시료채취의 용이성을 고려할 때 장애거리가 짧은 Type II의 sucrose 층이 정자의 swim-up 분리에 바람직한 것으로 사료된다.

4. 난포액의 정자 유인 효과

난포액이 정자의 이동과 운동성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 sucrose 층으로부터 회석한 난포액으로 swim-up 이동에 의해 회수된 정자의 수와 회수된 정자중 운동정자의 비율 및 수정능 획득정자의 비율을 조사하였던 바 얻어진 결과는 Table 4와 같다.

bMSS로 0, 5, 10 및 20%가 되도록 회석한 난포액으로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 3.3 ± 0.4 , 96.0 ± 3.3 , 105.7 ± 12.3 및 $75.2 \pm 3.9 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 19.5 ± 5.4 , 58.4 ± 6.4 , 69.4 ± 1.6 및 $60.6 \pm 0.8\%$ 였

Table 3. Effect of sucrose-layers, Types I and II on swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration

Types	Layers (μ l)			No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)
	High	Low	Semen		
I	bMSS (500)	suMSS (480)	bMSS (20)	8.2 ± 3.2	37.0 ± 2.3
II	bMSS (980)	-	suMSS (20)	9.0 ± 3.1	45.6 ± 6.7

Table 4. Effect of follicular fluid levels in bMSS on swim-up migration through sucrose layer and mover of sperm and attraction of capacitated sperm recovered from the migration

Follicular fluid (%)	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)	Percentage of sperm acrosome-reacted (%)
0	3.3 ± 0.4^b	19.5 ± 5.4^b	-
5	96.0 ± 3.3^a	58.4 ± 6.4^a	34.7 ± 8.1^d
10	105.7 ± 12.3^a	69.4 ± 1.6^a	72.7 ± 2.6^c
20	75.2 ± 3.9^a	60.6 ± 0.8^a	74.6 ± 1.7^c

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 $p < 0.05$.

고, 한편 첨모반응율은 5, 10 및 20% 난포액 첨가구에서 각각 34.7 ± 8.1 , 72.7 ± 2.6 및 $74.6 \pm 1.7\%$ 였다.

회수된 정자의 수는 난포액 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, 특히 10% 난포액 첨가구에서 가장 높았으나 첨가구간에 유의한 차이는 없었다. 즉, 난포액은 sucrose 층으로부터 정자의 이동을 자극하였다. 정자의 주화적 이동에 관한 연구에서 Villanueva-Diaz 등 (1992)은 정자의 70%가 난포액이 함유된 챔버로 이동하였다고 하였으며, Ralt 등 (1991)도 일반 완충액에 비해 난포액으로 정자가 30~260% 더 많이 모여든다고 하였다. 이러한 결과는 난포액을 함유한 배양액에서 정자의 회수율이 높았다는 본 실험의 결과와 일치한다.

회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 역시 난포액 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, 10% 난포액 첨가구에서 가장 높았으나 처리구간에는 유의한 차이가 없었다. 즉, 난포액은 회수된 정자의 운동을 자극하였다. Nichol 등 (1997)은 난포액이 돼지 정자의 활력에 영향을 미친다고 하였으며, Cohen-Dayag 등 (1994)도 난포액에 반응하여 정자의 활력과 과민운동성이 발달한다고 하였고, Falcone 등 (1991)은 난포액이 정자의 활력을 유지할 뿐만 아니라 증진시킨다고 하였다. 이들의 결과는 난포액을 함유한 용액에서 회수된 정자중 운동정자의 비율이 높았다는 본 실험의 결과와 일치하는 것으로 사료된다.

첨모반응율로 표시한 회수된 정자 중 수정능획득정자의 비율은 10%와 20% 난포액 첨가구가 5%의 난포액 첨가구에 비하여 유의하게 높았다. 본 실험에서 조사한 첨모반응율은 정자의 회수와 운동정자의 비율을 측정하기 위하여 회수한 정자중에서 수정능획득한 정자의 비율을 알기 위하여 PMA를 처리하여 인위적으로 첨모반응을 유도하여 산출한 백분율로서 이는 swim-up 분리에 의해 회수한 정자중 수정능력을 획득한 정자의 비율을 의미한다. 따라서 10% 이상 첨가된 난포액은 sucrose 층으로부터 수정능획득정자의 이동을 자극하였다. Cohen-Dayag 등 (1995)은 총 정자중에서 2~14%의 정자가 수정능력을 획득하고

있으며 수정능력을 획득한 정자만이 난포액에 대해 주화적 이동능을 가지고 있다고 보고한 바 있다. 이러한 결과는 난포액이 수정능획득 정자의 주화적 이동을 자극한다는 본 실험의 결과와 일치하는 것으로 사료된다.

한편, 정자의 주화적 이동을 자극하기 위하여 사용되는 난포액의 회석에 관한 연구에서 Ralt 등 (1994)은 난포액이 정자유인능력을 효과적으로 발휘하기 위해서는 정자를 전배양하여 수정능획득 반응을 유도한 다음 난포액을 적절히 회석해야 한다고 하였으며, Armal 등 (1983)도 난포액이 정자의 활성화와 이동을 자극하지만 난포액의 세포독성때문에 적정 회석되었을 때 자극효과가 증진된다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 10% 난포액이 sucrose 층으로부터 swim-up 분리에 참여하는 정자의 이동과 운동성 및 수정능획득정자의 이동을 가장 효율적으로 자극하는 것으로 나타났다.

결론적으로 난포액은 정자의 주화적 이동을 자극하며, 난포액을 10%의 수준으로 회석하였을 때 자극 효과가 가장 크게 나타났다.

5. 난포액의 열처리 효과

난포액의 세포독성효과를 제거하기 위한 저온 열처리가 난포액의 화학적 정자유인능에 미치는 영향을 규명하기 위하여 56°C에서 30분간 저온 열처리한 난포액으로 정자의 swim-up 분리를 유도하였던 바, 얻어진 결과는 Table 5와 같다.

세부실험 I에서 난포액을 포함하지 않은 bMSS (Control)와 난포액을 10% 함유한 bMSS (FF-MSS)으로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 4.3 ± 2.0 과 $68.3 \pm 4.4 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 83.8 ± 2.2 와 $98.0 \pm 1.3\%$ 였다. 한편 세부실험 II에서 난포액을 함유하지 않은 bMSS (Control)와 열처리한 난포액을 10% 함유한 bMSS (hFF-MSS)으로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 9.6 ± 4.1 와 $73.3 \pm 6.0 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 65.9 ± 14.7 와 $99.9 \pm 0.0\%$ 였다.

회수된 정자의 수는 비열처리 난포액 첨가구와 열처리 난포액 첨가구에서 모두 대조구에 비하여

Table 5. Effect of follicular fluid heated at 56°C for 30 minutes (hFF-MSS) on swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration

Trial	Treatment	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)
I	Control	4.3 \pm 2.0 ^b	83.8 \pm 2.2 ^b
	FF-MSS	68.3 \pm 4.4 ^a	98.0 \pm 1.3 ^a
II	Control	9.6 \pm 4.1 ^b	65.9 \pm 14.7 ^b
	hFF-MSS	73.3 \pm 6.0 ^a	99.9 \pm 0.0 ^a

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

Table 6. Effect of unfiltered-(FFp-MSS) or filtered-(fFFp-MSS) protein extracted from follicular fluid on swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration

Treatment	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)
Control	9.1 \pm 1.4 ^d	70.2 \pm 3.8 ^b
FF-MSS	74.6 \pm 7.8 ^c	94.0 \pm 2.1 ^a
FFp-MSS	80.0 \pm 6.5 ^c	72.6 \pm 3.3 ^b
fFFp-MSS	57.9 \pm 13.2 ^c	63.6 \pm 2.7 ^b

* 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 $p < 0.05$.

유의하게 높았다. 즉, 난포액의 열처리에 의해서도 정자의 이동을 자극하는 효과는 변하지 않았다.

회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 비열처리 난포액 첨가구와 열처리 난포액 첨가구에서 모두 대조구에 비하여 유의하게 높았다. 역시 난포액의 열처리에 의해서도 정자의 운동성을 자극하는 효과는 변하지 않았다.

난포액내 단백질의 열변성에 관한 연구 중에서 Chao 등 (1991)은 난포액을 100°C에서 30분간 열처리하였을 때 정자의 활력을 증진시키는 효과가 없어졌다고 하였으나, Fetterolf 등 (1994)은 난포액내 정자의 운동성을 증진시키는 단백질은 자발하여도 활성을 잃지 않았다고 상반된 결과를 보고한 바 있다.

결론적으로 일반적으로 세포독성을 나타내는 성분의 불활화를 위하여 실시되고 있는 저온 열처리는 정자의 이동과 운동을 자극하는 난포액의 효과를 억제하지 않았다.

6. 난포액내 단백질 성분의 효과

난포액에 함유되어 있는 단백질이 정자의 이동과 운동성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 methanol로 추출한 단백질 성분을 함유한 용액으로 정자의 swim-up 분리를 유도하였던 바 얻어진 결과는 Table 6과 같다.

난포액을 함유하지 않은 bMSS (Control), 난포액을 10% 함유한 bMSS (FF-MSS), methanol 추출후 비여과처리 (FFp-MSS)하였거나 여과처리 (fFFp-MSS)한 단백질 성분을 10% 난포액에 해당하도록 함유한 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 9.1 \pm 1.4, 74.6 \pm 7.8, 80.0 \pm 6.5 및 57.9 \pm 13.2 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 70.2 \pm 3.8, 94.0 \pm 2.1, 72.6 \pm 3.3 및 63.6 \pm 2.7% 였다.

회수된 정자의 수는 단백질 성분 첨가구와 난포액 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으나, 단백질성분 첨가구와 난포액 첨가구간에 유의한 차이는 없었다. 한편 여과 단백질 첨가구에서

Table 7. Effect of lipid extracted from follicular fluid on swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration

Treatment	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)
Control	9.3 \pm 3.5	48.2 \pm 8.8
FFL-MSS	22.8 \pm 4.2	64.9 \pm 3.6

Table 8. Effect of combined methanol and chloroform extracts obtained from follicular fluid on swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm recovered from the migration

Treatment	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)
Control	13.7 \pm 5.2 ^a	44.0 \pm 12.0 ^b
FF-MSS	80.0 \pm 8.8 ^b	96.2 \pm 0.3 ^a
FFPL-MSS	35.7 \pm 6.2 ^a	67.2 \pm 5.0 ^b

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

회수된 정자의 수가 비여과 단백질 첨가구에 비하여 적었을 뿐만 아니라 표준오차가 크게 나타났는데, 이는 여과처리 과정에서 정자의 이동에 관여하는 성분이 불균등하게 제거되었기 때문인 것으로 추론된다.

한편 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 난포액 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으나, 단백질 성분의 첨가구는 대조구와 유의한 차이가 없었다. 이는 단백질을 추출하는 과정에서 난포액내 함유되어 있는 정자의 운동을 자극하는 인자가 제거 또는 변성되었기 때문인 것으로 추론된다. Fetterolf 등 (1994)은 난포액과 methanol 추출물이 정자의 운동성을 자극한다고 보고한 바 있다.

결론적으로 본 실험조건에서 난포액으로부터 추출한 단백질 성분은 정자의 이동을 자극하지만 운동성을 충분히 자극하지는 못하였다.

7. 난포액내 지질성분의 효과

난포액에 함유되어 있는 지질이 정자의 이동과 운동성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 chloroform으로 추출한 지질 성분을 함유한 용액으로 정자의 swim-up 분리를 유도하였던 바 얻어진 결과는 Table 7과 같다.

난포액을 함유하지 않은 bMSS (Control)와 10% 난포액에 해당하는 chloroform 추출물을 함유한 bMSS (FFL-MSS)로 swim-up 분리를 유도

하여 회수한 정자의 수는 각각 9.3 \pm 3.5와 22.8 \pm 4.2 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 48.2 \pm 8.8와 64.9 \pm 3.6% 였다.

지질성분 첨가구는 대조구에 비하여 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율이 높았으나 유의한 차이가 없었다.

결론적으로 본 실험조건에서 난포액내 지질성분은 정자의 이동과 운동성을 자극하는 주요 인자가 아닌 것으로 사료된다.

8. 난포액내 단백질과 지질 성분의 병용효과

난포액에서 추출한 단백질과 지질 성분의 병용 처리가 정자의 이동과 운동성에 미치는 효과를 규명하기 위하여 methanol 추출물과 chloroform 추출물이 함유된 용액으로 정자의 swim-up 분리를 유도하였던 바 얻어진 결과는 Table 8과 같다. 난포액을 함유하지 않은 bMSS (Control), 난포액을 10% 함유한 bMSS (FF-MSS) 및 10% 난포액에 해당하는 methanol과 chloroform 추출물이 함유된 bMSS (FFPL-MSS)로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 각각 13.7 \pm 5.2, 80.0 \pm 8.8 및 35.7 \pm 6.2 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 44.0 \pm 12.0, 96.2 \pm 0.3 및 67.2 \pm 5.0% 였다.

회수된 정자의 수는 난포액 첨가구가 추출물 첨가구와 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, 추출물 첨가구는 대조구에 비하여 높았으나 이들간

에 유의한 차이가 없었다. 즉, 난포액내 단백질성분과 지질 성분의 병용처리가 정자의 이동을 유의하게 증진시키는 못하였으며, 실험 6과 7의 결과를 고려할 때, 지질 추출물은 정자의 이동을 자극하는 단백질 추출물의 효과를 감소시키는 것으로 추론된다.

회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 난포액 첨가구가 추출물 첨가구와 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, 추출물 첨가구는 대조구에 비하여 높았으나 유의한 차이는 없었다. 즉, 난포액내 단백질성분과 지질성분의 병용처리가 정자의 운동성을 유의하게 증진시키지 못하였다.

결론적으로 본 실험조건에서 난포액으로부터 추출된 단백질성분과 지질성분은 정자의 이동 및 운동성 자극에 있어서 다른 양상을 보였으며, 특히 지질성분은 정자의 swim-up 이동을 자극하는 단백질성분의 효과를 감소시켰다.

정자의 분리체계를 구축하기 위한 실험에서 sucrose 이중층을 이용하여 정자를 분리할 수 있다는 결과를 얻었다. 특히 10mM의 sucrose 층에서 정자의 swim-up 이동에 대한 장애 효과가 크게 나타났으며, 10분간의 배양에서 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리 효과가 크게 나타났다. 한편 장애거리가 짧은 sucrose 층 (Type II) 이 정자의 분리에 바람직한 것으로 사료된다.

위 실험에서 구축된 정자 분리체계를 이용 난포액의 정자유인능을 규명하기 위한 실험에서 난포액은 정자의 이동과 회수한 정자의 운동을 자극하였으며 수정능획득정자를 유인하였다는 결과를 얻었다. 특히 10%로 희석한 난포액에서 정자의 선별효과가 크게 나타났으며, 저온 열처리한 난포액에서는 정자유인능이 감소하지 않았다. 한편, 난포액으로부터 추출한 단백질성분은 정자의 이동을 자극하였으며, 지질성분은 정자의 이동과 운동성을 유의하게 자극하지 못하였다.

적 요

정자의 무분별한 이동을 충분히 억제하면서 운동성을 저해하지 않는 sucrose 층으로부터의 swim-up 분리체계를 구축하기 위하여, 정자의 이

동에 장애가 될 수 있는 sucrose 층에 첨가되는 sucrose 수준과 정자의 이동과 운동을 극대화시킬 수 있는 배양시간 및 sucrose 이중층의 형태를 조사하였던 바, 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 10mM의 sucrose 층은 정자의 swim-up 이동을 억제하였다.
2. Sucrose 층을 이용하지 않은 swim-up 분리에서 25분간 배양후 회수된 정자의 수가 유의하게 증가되었다. 한편, sucrose 층을 이용한 swim-up 분리에서 10분간 배양후 회수된 정자의 수가 유의하게 증가되었으며 정자의 운동성도 유지되었다.
3. Sucrose 이중층 Type I과 Type II 간에 장애 효과에는 유의한 차이는 없었으나, 장애공간이 짧은 Type II 이중층에서 시료 채취가 편리하였다.

정자의 주화적 이동과 관련하여 난포액의 기능을 밝히기 위하여, 난포액의 희석과 열처리 및 난포액으로부터 추출한 단백질과 지질이 Type II sucrose 층으로부터 10분간 배양한 정자의 swim-up 분리에 미치는 효과를 조사하였던 바 얻어진 결과는 다음과 같다.

4. 난포액은 정자의 이동과 운동을 자극하였고 수정능획득정자를 유인하였으며, 특히 10% 난포액에서 수정능획득정자의 유인효과가 가장 크게 나타났다.
5. 저온 열처리 (56°C, 30분)는 정자의 이동과 운동을 자극하는 난포액의 효과를 감소시키지 않았다.
6. 난포액으로부터 추출한 단백질 성분은 정자의 이동을 자극하였으나, 단백질 성분의 여과는 정자의 이동을 자극하는 단백질 성분의 효과를 감소시켰다.
7. 난포액으로부터 추출한 지질 성분은 정자의 이동과 운동을 유의하게 자극하지 않았다.
8. 난포액으로부터 추출된 단백질과 지질의 병용처리는 정자의 이동과 운동을 자극하는 난포액의 효과를 감소시켰다.

결론적으로 정자의 swim-up 분리에 sucrose 이중층을 이용할 수 있으며, 난포액은 sucrose 층으로부터 정자의 이동과 운동을 자극하고 수정능

획득정자를 유인하였다. 특히 열내성을 가진 단백질 성분이 정자의 이동을 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.
- Check JH, Katsoff D, Kozak J and Lurie D. 1992. Effect of swim-up, Percoll and Sephadex sperm separation methods on the hypo-osmotic swelling test. Hum. Reprod., 7:109-111.
- Chen SU, Ho HN, Chen HF, Chao KH, Lin HR, Huang SC, Lee TY and Yang YS. 1995. Comparison between a two-layer discontinuous Percoll gradient and swim-up for sperm preparation on normal and abnormal semen samples. J. Assist. Reprod. Genet., 12:698-703.
- 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., 50:786-90.
- Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S and Eisenbach M. 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11039-43.
- 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., 9:1505-11.
- Fournier-Delpech S and Thibault C. 1993. "Acquisition of sperm fertilizing ability.", in: Thibault C., Levasseur, M.C. and Hunter, R.H.F., Eds., Reproduction in Mammals and Man, Ellipses, Paris, p.257-270.
- Hamamah S, Lanson M, Barthelemy C, Garrigue MA, Muh JP, Royere D and Lansac J. 1995. Analysis of the lipid content and the motility of human sperm after follicular fluid treatment. Andrologia, 27:91-97.
- Hansen C, Srikandakumar A and Downey BR. 1991. Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. Mol. Reprod. Dev., 30:148-153.
- Johnson AL and Howards SS. 1977. Hyperosmolarity in intraluminal fluids from hamster testis and epididymis in a micro-puncture study. Science, 195:492-493.
- 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.
- Oehninger S, Acosta R, Morshedi M, Philput C, Swanson RJ and Acosta AA. 1990. Relationship between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. J. Androl., 11:446-52.
- Parrish JJ and Foote RH. 1987. Quantification of bovine sperm separation by a swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in

- polyacrylamide gel and fertility. *J. Androl.*, 8:259-661987.
- 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. Sci.*, 88: 2840-2844.
- Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa 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.*, 50:774-85.
- Villanueva-Diaz C, Arias-Martinez J, Bustos-Lopez H and Vadillo-Ortega F. 1992. Novel model for study of human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril.*, 58:392-395.
- 박영식. 1997. 소 정자의 운동성에 영향을 미치는 난포액성분에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 12:219-226.
-
- (접수일자 : 1998. 11. 30/채택일자 : 1998. 12. 23)