

난포액내 정자유인물질의 분석

박 영 식

경북대학교 농과대학

Analysis of Sperm Chemoattractant in Follicular Fluid

Y. S. Park

College of Agriculture, Kyungpook National University

SUMMARY

Among proteins separated from methanol extract of follicular fluid with superose column, the components inducing sperm swim-up separation through sucrose layer were analysed with superose column in Smart system and SDS-PAGE. And the results obtained were as follows;

The fractions of retention volume (RV) 0.83ml and RV 1.36ml separated with superose column should stimulate sperm migration and movement. However, RV0.83 fraction was consisted of complex materials containing RV1.36 component. RV1.36 fraction contained a BSA analogue of 67 kilodaltons (Kd) and showed identical peak pattern with BSA fraction V.

In conclusion, the protein of 67Kd in follicular fluid should stimulate sperm migration and movement.

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

서론

배란시 난관내로 유입되는 난포액 (Hansen 등, 1991)은 정자의 운동을 자극하고 유인하여 수정에 참여토록 유도한다 (Ralt 등, 1991; Villanueva-Diaz 등, 1992). 또한, 난포액은 정자의 운동속도를 증가시킬 뿐만 아니라 (Nichol 등, 1997), 수정능 획득정자의 이동을 자극하는 것으로 알려져 있다 (Cohen-Dayag 등, 1994). 박 (1997)도 정자의 swim-up 분리를 유도한 실험에서 난포액이 수정능 획득정자의 이동을 자극한다고 보고한 바 있다.

이러한 난포액에는 정자의 운동을 자극하는 물질

이 있는데 (박, 1997), Lee 등 (1992)은 antithrombin III의 N-말단 사슬과 유사한 구조를 가진 52Kd의 단백질이 돼지 정자의 활력을 증진시킨다고 하였다. 또한 난포액에는 정자의 수정능획득에 관여하는 64Kd의 지질수송단백질 (Ravnik 등, 1992)과 알부민 (Langlais 등, 1988)이 알려져 있으며, 정자의 침모반응을 유발하는 50Kd의 단백질 (Siiteri 등, 1988)과 68Kd 가량의 단백질 (Ravnik 등, 1990)이 분리된 바 있다.

정자의 양적 선별을 위한 배양체계를 구축하기 위한 본 연구에서 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 이동과 운동을 자극하는 난포액내 단백질 성분을 분리하고 이 물질의 분자량과 난포액내 함유량

본 연구는 학술진흥재단이 지원하는 연구비(1997)로 수행되었음.

을 추정하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 정자선별용 기초용액의 준비

정액의 회석과 정자의 세척 및 배양을 위하여 NaCl 108mM, 4.5mM KCl, 1.0mM KH_2PO_4 , 4.15 mM 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, 0.3 mM Na-pyruvate, 5.0mM glucose를 첨가하고 pH 7로 조정된 정자선별용 기초용액(basic medium for sperm selection, bMSS)을 준비하였다.

2. 난포액의 회수와 보존

직경이 2~5mm인 신선한 난포로부터 난포액을 회수하여 2,000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리후 상층액을 회수하여 실험에 사용할 때까지 -40°C 에서 동결보존하였다.

3. 난포액으로부터 단백질성분의 추출

동결한 난포액을 용해하여 0°C 로 냉각하였다. 냉각된 난포액에 5배의 methanol을 점점이 첨가한 다음 10배의 isooctane을 추가하고 충분히 혼합하였다. 혼합액을 30분간 냉장실에 정치하여 층 분리를 유도한 다음 단백질이 함유되어 있는 methanol층만을 회수하여 0.45 m 공극의 filter로 여과하였다. 여과액내 methanol을 질소가스로 휘발시킨 다음 여과액을 저온진공건조기에서 건조하였다. 건조된 분말은 난포액 원액의 1/10배가 되도록 bMSS로 회석하여 농축(10x)한 단백질 추출물을 준비하였다.

4. Superose column (SC)을 이용한 단백질 추출물의 분리

농축(10x)한 단백질 추출물을 0.22 m 공극을 이용하여 여과한 다음 superose 12 column (SC)이 장착된 Smart system (Pharmacia, Sweden)에 40 μl 를 주입하고 관류액(eluent, 0.05M NaH_2PO_4 , pH 7.0, 0.15M NaCl)을 분당 40 μl 속도로 흘려 retention volume (RV) 0.83ml와 RV 1.36ml 성분을 회수하였다 (Fig. 1).

5. Sucrose 이종층을 이용한 분리 성분의 정자유인활성 실험

원심분리관에 bMSS, 10% 난포액 함유 bMSS, 또는 10% 난포액에 해당하는 RV0.83와 RV1.36성분을 함유한 bMSS를 각각 980 μl 를 주입하고 36°C 에서 10분간 온도를 평형시켰다. 한편, 액체질소에서 동결보존된 소 정액을 공기중에서 7초간 방치한 다음 36°C 항온수조에서 20초간 용해하였다. 용해한 정액을 15ml 원심분리관에 옮기고 bMSS로 5배 회석하였다. 회석한 정액을 1,500rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 10mM의 sucrose가 함유된 bMSS 60 μl 를 첨가하여 정자펠렛을 재부유하였다. 미리 준비한 용액 980 μl 의 저면에 재부유한 정액 20 μl 를 조용히 침적한 다음, 36°C 에서 10분간 배양하였다. 배양후 상층액 500 μl 를 회수하여 정액성상검사판을 이용 정자의 수와 운동정자의 비율을 측정하였다. 또한 회수한 정자 중에서 수정능획득 정자의 비율을 구하기 위하여 배양후 회수한 상층액에 5 μM 의 phorbol 12-myristate 13-acetate를 첨가하고 36°C 에서 30분간 배양한 다음 침모반응 정자의 비율을 조사하였다.

6. Smart system을 이용한 난포액내 정자유인활성의 분석

"Superose column을 이용한 단백질 추출물의 분리" 방법에 따라 회수한 RV0.83과 RV1.36성분의 분자량을 추정하기 위하여 superose column용 표준단백질 (Pharmacia), Blue dextran 2000 (MW 2,000Kd), albumin (BSA, MW 67Kd) 및 ovalbumin (MW 43Kd)을 각각 2mg/ml이 되도록 dH_2O 로 용해하였으며, 난포액내 함유량을 추정하기 위하여 0.2mg/ml 및 0.02mg/ml albumin 용액도 준비하였다. 한편 정자유인능을 가진 난포 단백질과 비교하기 위하여 2mg/ml bovine serum albumin (BSA) fraction V를 준비하였다. 준비된 표준용액을 0.22 μm 공극을 이용 여과한 다음 SC가 장착된 Smart system에 각각 40 μl 를 주입하고 관류액 (0.05M NaH_2PO_4 , pH 7.0, 0.15M NaCl)을 분당 40 μl 속도로 흘렸으며, 이때 나타난 peak의 retention volume (RV)과 peak pattern을 비교 정

자 유인능을 가진 성분 RV0.83과 RV1.36의 분자량과 농도를 추정하였다.

특히 RV0.83 성분의 화학적 특성을 규명하기 위하여 "Superose column을 이용한 단백질 추출물의 분리" 방법으로 회수한 분질을 재분리하였으며, 또한 회수한 분질을 methanol로 다시 추출하여 동일한 방법으로 재분리하였다. RV1.36 성분도 역시 동일한 방법으로 재분리하여 화학적 특성을 조사하였다.

7. Sodium dodesylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용한 난포액내 정자유인물질의 분석

"Superose column을 이용한 단백질 추출물의 분리" 방법에 따라 회수한 RV0.83과 RV1.36 성분을 저온에서 진공건조하였으며, 이들 농축 성분과 전기영동용 표준단백질 (HMW와 LMW, Pharmacia)을 12% gel에서 40mA의 고정전류를 흘려 1시간 동안 전개한 다음 Silver staining kit (Pharmacia)을 사용 염색하여 각 성분의 분자량을 추정하였다.

단백질 성분의 추출 분리과정에서 고장액의 유발로 예상되는 단백질의 변성을 최소화하기 위하여 "Superose column을 이용한 단백질 추출물의 분리" 방법에 따라 회수한 RV0.83과 RV1.36 성분이 함유된 분질을 진공건조하지 않고 fast desalting PC3.2/10 column (Pharmacia)이 장착된 Smart system에 200 μ l의 분질을 주입하고 관류액 (50mM NaH_2PO_4 , pH 7.0)을 분당 100 μ l 속도로 흘려 재분리한 다음 회수한 분획을 진공 건조하여 농축하였다. 이들 농축 성분과 전기영동용 표준단백질 (HMW와 LMW, Pharmacia)을 10% gel에서 40mA의 고정전류를 흘려 1시간 동안 전개한 다음 Silver staining kit (Pharmacia)으로 염색하여 각 성분의 분자량을 추정하였다.

8. 통계처리

반복처리에 의해 얻어진 결과는 분산분석 (ANOVA)에 의해 통계 처리하여 mean SE (standard error)로 표시하였으며, Dunkun 다중검정에 의해 처리간 차이의 유의성을 검정하였다. 이러한 유의

성 결정의 결과는 각 Table에 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 표기하였는데, 이는 처리간에 5% 또는 1% 수준에서 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

결과 및 고찰

1. SC로 분리된 성분 RV0.83과 RV1.36의 정자유인 활성

난포액의 정자유인효과와 비교하기 위하여 83 성분과 RV1.36 성분 (Fig. 1)이 함유된 bMSS로 정자의 swim-up 분리를 유도하였던 바, 얻어진 결과는 Table 1과 같다.

세부연구 I에서 bMSS (control), 10% 난포액이 첨가된 bMSS, 및 10% 난포액에 해당하는 RV0.83 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 1.0 ± 0.3 , 92.5 ± 11.5 및 $13.0 \pm 2.4 \times 10^4$ 였다. 한편, 10% 난포액과 동일 수준의 RV0.83 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자 중에서 운동정자의 비율은 각각 98.0 ± 0.4 와 $54.9 \pm 11.4\%$ 였고, 첨모반응율은 각각 85.6 ± 2.3 과 $87.6 \pm 2.2\%$ 였다. 회수된 정자의 수는 RV0.83 성분 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으나 난포액 첨가구에 비하여 유의하게 낮았다. 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 RV0.83 성분 첨가구가 난포액 첨가구에 비하여 유의하게 낮았으나, 첨모반응율로 표시된 회수된 정자중 수정능획득정자의 비율은 RV0.83 성분 첨가구와 난포액 첨가구간에 유의한 차이는 없었다. 즉, 난포액 효과와의 비교에서 RV0.83 성분은 정자의 이동과 운동을 유의하게 자극하지 못하였으나 수정능획득정자를 유의하게 자극하였다.

세부연구 II에서 bMSS (control), 10% 난포액이 첨가된 bMSS, 및 10% 난포액에 해당하는 RV1.36 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 1.8 ± 0.6 , 111.7 ± 8.8 , 및 $47.5 \pm 3.0 \times 10^4$ 였다. 한편, 10% 난포액과 동일 수준의 RV0.83 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자 중에서 운동정자의 비율은 각각 97.8 ± 0.5 와 $64.6 \pm 2.4\%$ 였고, 첨모반응율은 각각 86.3 ± 2.4 와 $77.1 \pm 1.5\%$ 였다. 회수된 정자의 수는 RV1.36 성분 첨가구가 대조구에 비하

Table 1. Effect of fractions RV0.83 and/ or RV1.36 seperated from methanol extract of follicular fluid with Superose column on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated-sperm recovered from the migration

Trials	Treatment	No. of sperm recovered($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)	Percentage of sperm acrosome reacted(%)
I	Control	1.0 \pm 0.3 ^c	—	—
	Follicular fluid 10%	92.5 \pm 11.5 ^a	98.0 \pm 0.4 ^d	85.6 \pm 2.3
	Fraction RV 0.83	13.0 \pm 2.4 ^b	54.9 \pm 11.4 ^e	87.6 \pm 2.2
II	Control	1.8 \pm 0.6 ^c	—	—
	Follicular fluid 10%	111.7 \pm 8.8 ^a	97.8 \pm 0.5 ^a	86.3 \pm 2.4 ^d
	Fraction RV 1.36	47.5 \pm 3.0 ^b	64.6 \pm 2.4 ^b	77.1 \pm 1.5 ^e
III	Control	3.7 \pm 1.2 ^f	—	—
	Follicular fluid 10%	115.0 \pm 1.4 ^d	96.3 \pm 0.6 ^d	89.7 \pm 2.4
	Fractions RV 0.83&1.36	81.5 \pm 8.5 ^e	65.3 \pm 0.6 ^e	82.9 \pm 0.4

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

Superscripts d, e and f mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

여 유의하게 높았으나, 난포액첨가구에 비해서 유의하게 낮았다. 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율과 수정능획득정자의 비율은 RV1.36 성분 첨가구가 난포액 첨가구에 비하여 유의하게 낮았다. 즉, 난포액의 효과와 비교할 때, RV1.36성분은 정자의 이동과 운동성 및 수정능획득정자의 이동을 충분히 자극하지 못하였다.

세부연구 III에서 bMSS (control), 10% 난포액이 첨가된 bMSS 및 10% 난포액에 해당하는 RV 0.83와 RV1.36 성분이 모두 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수는 3.7 ± 1.2 , 115.0 ± 1.4 및 $81.5 \pm 8.5 \times 10^4$ 였다. 한편, 10% 난포액과 동일 수준의 RV0.83 성분이 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자 중에서 운동정자의 비율은 각각 $96.3 \pm 0.6\%$ 과 $65.3 \pm 0.6\%$ 였으며, 첨모반응율은 각각 $89.7 \pm 2.4\%$ 과 $82.9 \pm 0.4\%$ 였다. 회수된 정자의 수는 병용 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으나, 난포액 첨가구에 비해서 유의하게 낮았다. 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 병용 첨가구와 난포액 첨가구에 비하여 유의하게 낮았으나, 수정능획득정자의 비율은 병용 첨가구와 난포액 첨가구간에 유의한 차이가 없었다. 즉, 난포액의 효과와 비교할 때, RV0.83와 RV1.36 성분의 병용처리는 정자의 이동과 운동성을 유의하게 자극하지 않았으나, 수정능획득정자의

이동을 자극하였다.

이상의 결과로부터 난포액과 동일한 수준으로 첨가된 RV0.83 성분과 RV1.36 성분은 대조구에 비하여 유의하게 높은 정자유인활성을 나타냈으나, 10% 난포액에 비하여 낮은 정자유인활성을 나타내었다. 이는 성분을 추출하는 과정에서 정자의 이동과 운동을 자극하는 성분이 변성되었거나 또는 일부 제거되었기 때문인 것으로 추론된다. 결론적으로 RV0.83 성분에는 수정능획득정자의 이동을 자극하는 효과가 있으며, RV1.36 성분은 정자의 이동을 자극하는 효과가 RV0.83 성분에 비하여 상대적으로 큰 것으로 사료된다.

2. Smart system을 이용한 RV0.83과 RV1.36 성분의 정성 및 정량 분석

1) RV0.83 성분의 분석

난포액으로부터 분리한 RV0.83 성분 (Fig. 1)은 Table 1에서 제시한 바와 같이 수정능획득정자의 유인활성이 인정되었다. 이러한 RV0.83 성분의 성질을 규명하기 위하여 동일한 방법으로 재분리하여 순수하게 단리한 RV0.83 성분의 chromatograph를 얻고져 하였으나 RV0.83 분절에는 Fig. 2에서 처럼 다양한 peak가 일어졌으며 RV0.82 peak가 소량 얻어졌다. 이는 RV0.83 성분은 peak의 수만큼 다양한

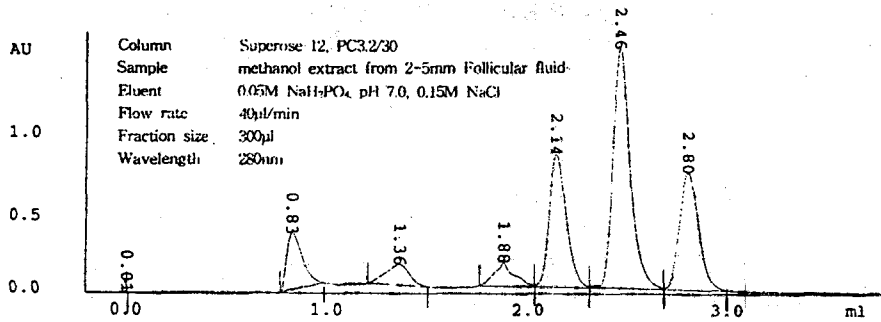


Fig. 1. Separation of proteins obtained from ϕ 2~5mm follicles with superose 12 column.

Protein fractions of retention volume (RV) 0.83ml and 1.36ml were examined about their effects on sperm swim-up separation shown in Table 1 and about their concentrations in follicular fluid.

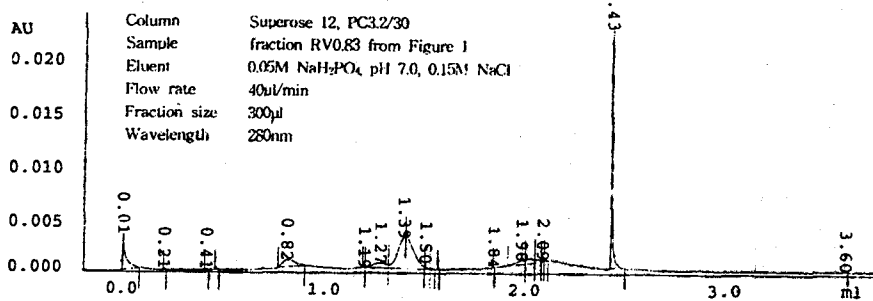


Fig. 2. Separation of RV0.83 fraction from Figure 1 with superose 12 column.

RV0.83 fraction was separated into more than 20 peaks and especially peaks RV1.27 and RV1.39 were shown as well as RV0.82.

물질로 구성되어 있다는 것을 의미한다. 이러한 RV0.83 성분이 복합물인지를 규명하기 위하여 methanol로 재추출하여 동일한 방법으로 분리하였던 바 Fig. 3에서 보는 바와 같이 RV0.83 성분은 없었다. 이로서 RV0.83 성분은 단일 성질의 화합물이 아닌 복합물이며, 특히 다른 많은 peak들과 함께 RV1.36 성분이 얻어졌는데, RV0.83 성분의 정자유인 활성은 RV1.36 성분과 관련이 있을 것으로 추론된다.

Siiteri 등 (1988)은 Sephadex G-75 column을 이용하여 난포액으로부터 추출한 void volume 분절에서 첨모반응을 유발하는 활성이 있었다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 회수된 RV0.83 성분은 분자

량이 2000Kd인 dextran blue (Fig. 5)의 retention volume (0.89ml)보다 앞선 위치에 peak를 형성함으로써 이 성분은 분자량이 dextran blue보다 크거나 PC의 분리능을 고려할 때 void volume 분절에서 회수된 복합물일 것으로 추정된다.

2) RV1.36 성분의 분석

RV1.36 성분을 RV0.83 성분의 재분리와 동일한 방법으로 재분리하였던 바 Fig. 4에서 처럼 RV 1.37ml에서 주요 peak들이 나타났다. 따라서 RV1.36 성분은 고유의 분자량을 단일분자로 추정된다. 한편 RV1.36 성분의 분자량을 추정하기 위하여 blue dextran 용액 (Fig. 5), ovalbumin용액 (Fig. 6),

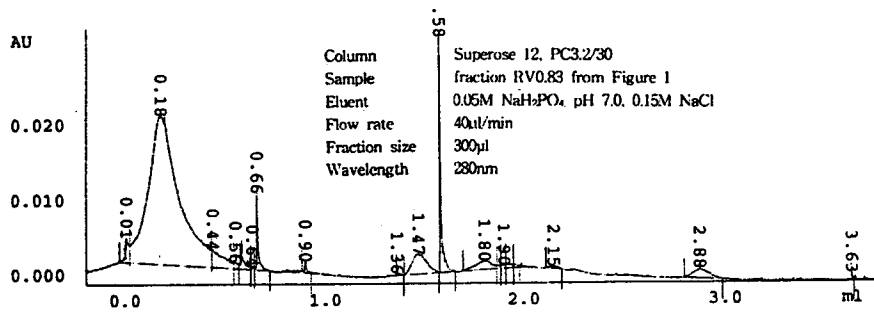


Fig. 3. Separation of RV0.83 fraction re-extracted with methanol with superose 12 column. Re-extracted RV0.83 fraction was separated into more than 20 peaks and especially peak RV1.36 was shown but not RV0.83.

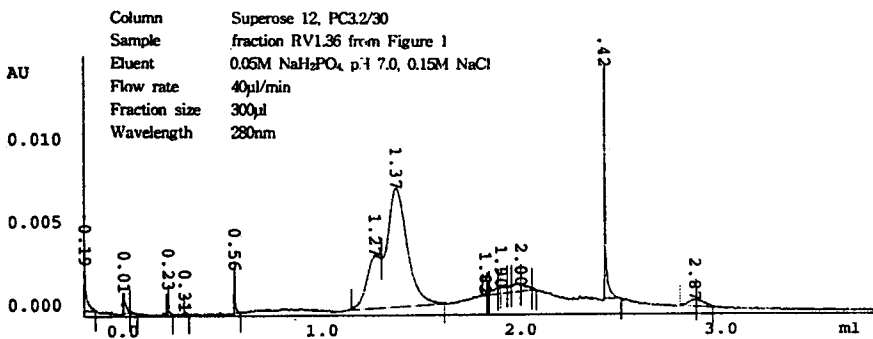


Fig. 4. Separation of RV1.36 fraction from Figure 1 with superose 12 column. RV1.36 fraction was separated into 19 peaks and especially peaks RV1.27 and RV1.37 were shown, but not RV0.83.

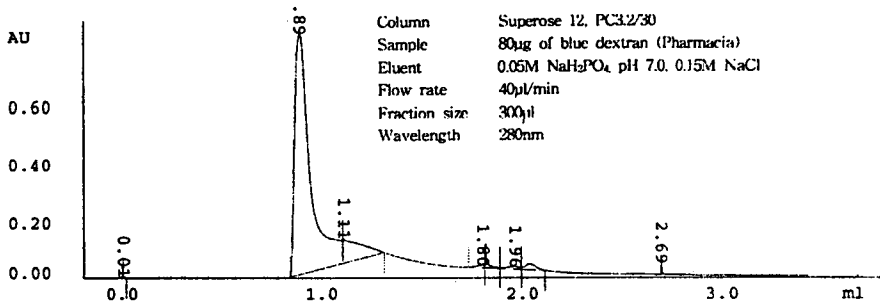


Fig. 5. Separation of blue dextran (MW 2000Kd) with superose 12 column. Blue dextran 80µg was separated into 8 peaks and major peak were shown at retention volume of 0.89ml.

및 albumin-용액 (Fig. 7)을 동일 PC로 분리하였던 바, 주요 peak들이 RV 0.89, 1.33 및 1.37ml에서 얻

어졌다. 따라서 RV1.36 성분은 albumin과 유사한 화학적 특성을 가진 것으로 추론된다. 한편 RV1.36

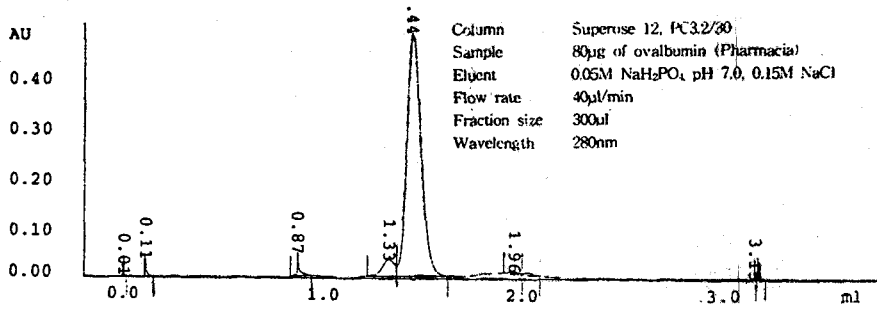


Fig. 6. Separation of ovalbumin (MW 42Kd) with superose 12 column. Ovalbumin 80µg was separated into 9 peaks and major peak were shown at retention volume of 1.44ml.

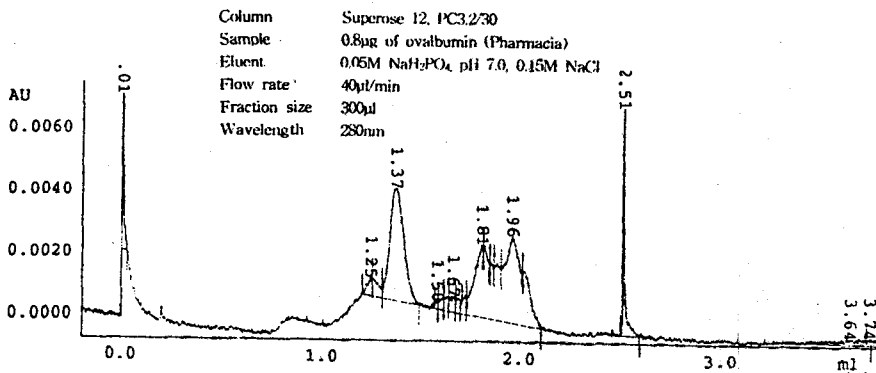


Fig. 7. Separation of albumin (MW 67Kd) with superose 12 column. Albumin 0.8µg was separated into more than 20 peaks and major peaks were shown at retention volumes of 1.37 and 1.25ml with peak heights 0.63 and 3.66 mAU, respectively.

성분의 특성과 농도를 추정하기 위하여 albumin 0.8 g (Fig. 8), 8 g (Fig. 9) 및 80 g (Fig. 7)을 동일 PC로 분리하였던 바 RV1.37 peak의 높이가 각각 3.662, 38.841 및 378.313 mAU 였으며, 부수적인 peak RV1.25의 높이는 각각 0.633, 7.260 및 75.485 mAU로서 RV1.37 peak의 높리와 유사한 증가를 보였다. 이러한 albumin 표준용액의 peak의 형태와 높이를 고려하였을 때, 본 실험에서 분석되고 있는 RV1.36 성분 (Fig. 1)은 albumin인 것으로 추정된다.

난포액과 혈청의 단백질의 비교 연구에서 Velazquez 등 (1977)은 총 단백질의 함량에서 차이가 없었으나, albumin의 농도가 난포액에서 더 높았다고 하였다. Edwards (1974)는 난포액에 단백질이

35.8mg/ml 함유되어 있으며, albumin이 2560 mg% 수준으로 가장 많이 함유되어 있다고 하였다. 난포액 2ml에서 얻은 단백질추출물을 500µl로 농축한 다음 40µl를 PC로 분리한 본 실험에서 RV1.36 성분의 peak 높이가 약 125mAU 였다 (Fig. 1). 즉, 난포액 1ml에는 RV1.36 성분이 781.25mAU peak 높이에 해당하는 농도로 함유되어 있으며 이 성분을 재분리하여 RV 1.37ml에서 주요 peak를 얻었다. 한편, Fig. 7, Fig. 8 및 Fig. 9로부터 1 g의 albumin이 RV 1.37ml 위치에서 약 4.7mAU의 peak 높이를 형성한다는 것을 추정할 수 있다. 따라서 2~5mm의 난포로부터 회수한 난포액 1ml에는 albumin이 약 0.17mg이 함유되어 있는 것으로 사료된다.

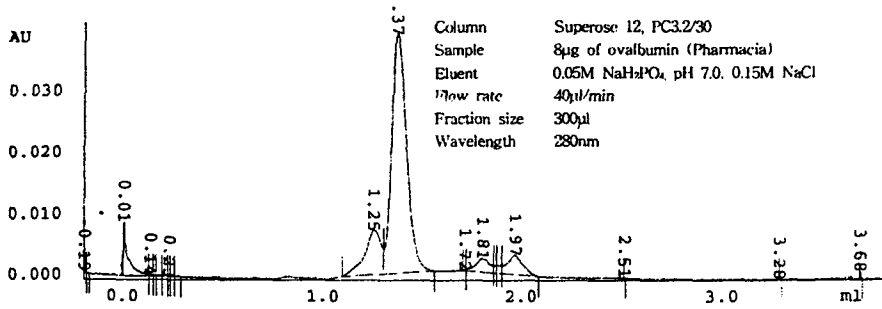


Fig. 8. Separation of albumin (MW 67Kd) with superose 12 column.

Albumin 8 μ g was separated into 18 peaks and major peaks were shown at retention volumes of 1.37 and 1.25ml with peak heights 38.84 and 7.26 mAU, respectively.

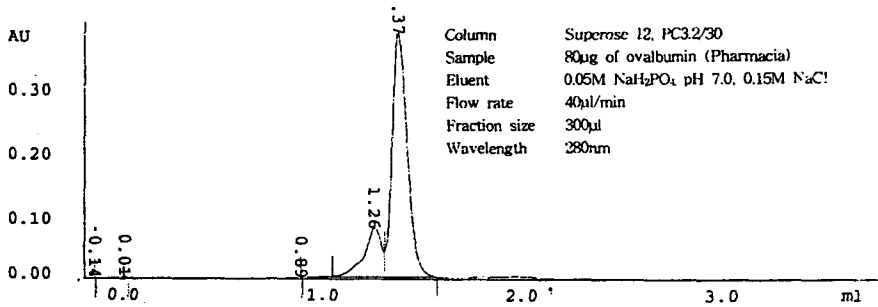


Fig. 9. Separation of albumin (MW 67Kd) with superose 12 column.

Albumin 80 μ g was separated into 4 peaks and major peaks were shown at retention volumes of 1.37 and 1.26ml with peak heights 378.31 and 75.49 mAU, respectively.

3) BSA fraction V의 비교분석

세포배양에 주로 이용되고 있으며 박 (1997)에 의해 정자의 이동과 운동성을 자극하는 것으로 보고된 바 있는 BSA fraction V를 PC로 분석하여 Fig. 10의 결과를 얻었다. BSA fraction V의 주요 peak는 RV 1.37과 1.25ml에서 얻어졌으며, 재분리한 RV1.36 성분 (Fig. 4)과 동일한 peak 형태를 나타내었다. 또한 800 μ g의 BSA fraction V를 주입하여 RV1.25와 RV1.37 peak 높이가 각각 68.807과 323.382 mAU로서 80 μ g의 albumin 표준용액 (Fig. 7)과 동일한 peak 형태와 높이를 얻었다. 따라서 BSA fraction V는 난포액으로부터 분리한 RV1.36 성분과 동일한 성분으로 정자의 유인을 위한 선별에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

난포액에는 정자의 운동을 자극하고 수정능획득

반응과 침모반응을 유발하는 성분을 함유하고 있다. 정자의 수정능획득에 관여하는 난포액 단백질의 분리에 관한 연구에서 Ravnik 등 (1990)은 난포액을 S-300 gel filtration chromatography로 분리한 성분중에 지질을 수송하는 활성 (lipid transfer activity)을 가진 68kd 정도의 단백질이 있으며, 이 단백질은 정자의 수정능획득을 유발하여 투명대 제거 햄스터 난자내 침투를 자극하였다고 보고하였다. 이후 Ravnik 등 (1992)은 sequential chromatography로 난포액으로부터 분자량이 64kd이고 pI가 5.0인 지질수송단백질(LTP)를 분리하였으며, Ravnik 등 (1993)은 정자의 수정능획득을 효율적으로 자극하는 albumin에도 높은 지질수송능이 있다고 보고하였다. 한편 정자의 침모반응을 유발하는 난포액 단백질의 분리에 관한 연구에서 Siiteri 등 (1988)은 Sephadex G-75 column chromatog-

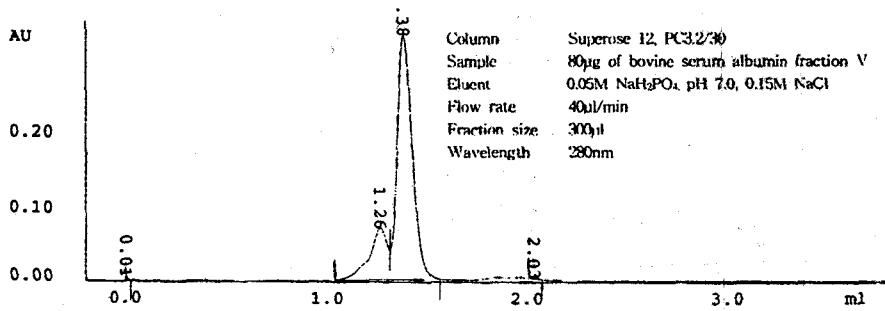


Fig. 10. Separation of bovine serum albumin (BSA) fraction V with superose 12 column. BSA fraction V 80µg was separated into 4 peaks and major peaks were shown at retention volumes of 1.38 and 1.26ml with peak heights 323.38 and 68.80 mAU, respectively.

raphy를 이용 50Kd의 단백질을 분리하였으며, Ravnik 등(1990)도 S-300 gel filtration chromatography를 이용 68Kd 가량의 단백질을 분리하였다. 본 연구에서는 superose column을 이용 난포액 내 정자유인물질을 분리하여 동정하였던 바 RV0.83 성분과는 달리 RV1.36 성분이 단일물질로서 정자유인활성을 나타내었으며, RV1.36 성분은 67Kd의 albumin이거나 유사물질인 것으로 추정되었다.

3. SDS-PAGE를 이용한 분석

1) RV0.83 성분의 분석

SC로 회수한 RV0.83가 chromatograph에서 복합물로 판정되었으나, 이를 재확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였던 바, 전기영동상에서 band를 확인할 수 없었다 (Fig. 11). 즉, 전기영동에 의한 물질의 동정에서도 PC를 이용한 분석에서처럼 RV0.83 성분은 단일 분자량을 가진 단백질 성분이 아닌 것으로 추정된다.

2) RV1.35 성분의 분석

BSA와 유사물질인 것으로 추론한 바 있는 RV1.36 성분은 SC로 회수한 분획으로부터 얻은 전기영동상 (Fig. 11)이나, SC로 분리한 다음 desalting column으로 재분리한 분획에서 얻은 전기영동상 (Fig. 12) 모두에서 표준 단백질 BSA (67Kd)와 동일한 위치에서 band가 확인되었다.

결론적으로 난포액으로부터의 methanol 추출물

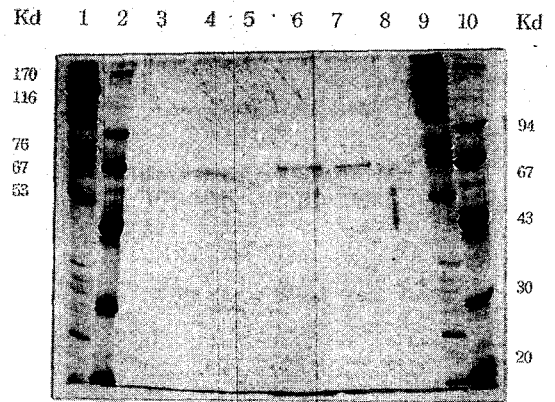


Fig. 11. Electrophoretic photograph of fractions of RV0.83 and RV1.36 separated with superose column. Lane 1 is for HWM, Lane 2 for LMW, Lane 3 for 1/ 100 of RV0.83, Lane 4 for 1/ 10 of RV0.83, Lane 5 for RV0.83, Lane 6 for RV1.36, Lane 7 for 1/ 10 of RV1.36, Lane 8 for 1/ 100 of RV1.36, Lane 9 for HWM, and Lane 10 for LMW. Bands were detected with Silver staining kit (Pharmacia).

에서 얻은 두 성분 RV0.83과 RV1.36의 정자 유인 효과 (Table 1)와 BSA를 첨가한 용액으로 정자의 swim-up 분리를 유도한 실험 (박, 1996)의 결과를 고려할 때, sucrose 층으로부터 정자의 이동과 운동을 자극하는 성분은 67Kd인 BSA인 것으로 추정된다.

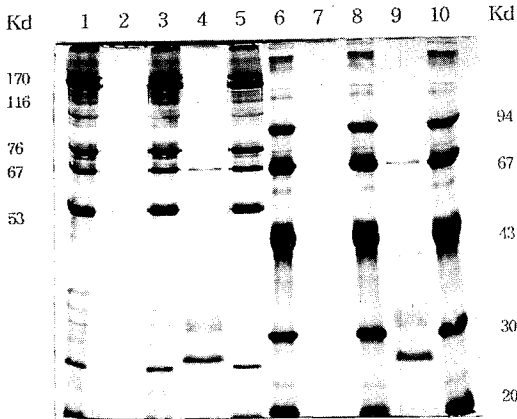


Fig. 12. Electrophoretic photograph of fractions of RV0.83 and RV1.36 separated with superose column and desalted with fast desalting column. Lane 1 is for HWM, Lane 2 for RV 0.83, Lane 3 for HWM, Lane 4 for RV1.36, Lane 5 for HMW, Lane 6 for LMW, Lane 7 for RV0.83, Lane 8 for LMW, Lane 9 for RV 1.36, and Lane 10 for LMW. Bands were detected with Silver staining kit (Pharmacia).

적 요

난포액을 methanol로 추출하고 superose column (SC)을 이용 분리한 단백질성분 중에서 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 이동을 자극할 수 있는 성분을 SC와 SDS-PAGE를 이용하여 분석 하였던 바 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 난포액으로부터 SC로 분리한 RV0.83 성분과 RV1.36 성분은 정자의 이동과 운동을 자극하였다.
2. 수정능 획득정자의 유인효과가 있는 RV0.83 성분은 RV1.36 성분을 함유한 복합물이며, RV 1.36 성분은 분자량이 67Kd인 BSA 유사물질이었다. 한편 BSA fraction V는 RV1.36 성분과 동일한 peak의 retention volume과 양상을 보였다.

결론적으로 난포액에 함유되어 있는 67kd의 단백

질은 정자의 swim-up 이동과 운동을 자극하였다.

참고문헌

- 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(4): 786-90
- Edwards RG. 1974. Follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 37:189-219.
- 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.
- Langlais J, Kan FW, Granger L, Raymond L, Bleau G, and Roberts KD. 1988. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Gamete Res.*, 20:185-201.
- Lee SL, Kuo YM, Kao CC, Hong CY, and Wei YH. 1992. Purification of a sperm motility stimulator from porcine follicular fluid. *Comp. Biochem. Physiol.*, [B] 101:591-594.
- 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.
- 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. Sc.*, 88:2840-2844.
- Ravnik SE, Albers JJ, and Muller CH. 1993. A novel view of albumin-supported sperm capacitation: role of lipid transfer protein-I. *Fertil. Sertil.*, 59:629-638.
- Ravnik SE, Zarutskie PW, and Muller CH.

1990. Lipid transfer activity in human follicular fluid: relation to human sperm capacitation. *J. Androl.*, 11:216-226.
- Ravnik SE, Zarutskie PW, and Muller CH. 1992. Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, 47:1126-1133.
- Siiteri JE, Gottlieb W, and Meizel S. 1988. Partial characterization of a fraction from human follicular fluid that initiates the human sperm acrosome reaction *in vitro*. *Gamete Res.*, 20:25-42.
- Velazquez A, Reyes A, Chargoy J, and Rosado A. 1977. Amino acid and protein concentrations of human follicular fluid. *Fertil. Steril.*, 28:96-100.
- 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(2): 392-395.
- 박영식. 1996. Progesterone과 BSA를 이용한 동결 정액내 정자의 선별. *한국수정란이식학회지*. 11:309-316.
- 박영식. 1997. 소 정자의 운동성에 영향을 미치는 난포액성분에 관한 연구. *한국수정란이식학회지* 12:219-226.

(접수일 : 1999. 1. 31 / 채택일자 : 1999. 3. 19)