大韓不妊學會誌: 第29卷 第3號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 3, 2002, 9

체외에서 돼지 정자 - 난자의 상호작용시 투명대내 Lectin 결합

강원대학교 동물자원과학대학

황인선 · 김정익 · 정희태 · 양부근 · 박춘근

Binding of Lectins to the Zona Pellucida on Sperm-oocytes Interaction in the Pig

In Sun Hwang, Choung Ik kim, Hee Tae Cheong, Boo Keun Yang, Choon Keun Park

College of Animal Resource Science, Kangwon University, Chunchon, 200-701, Korea

Objective: Lectins are cell-agglutinating and sugar specific proteins or glycoproteins of non-immune origin that precipitate glycoconjugates having saccharides of appropriate complementarity. Because of these properties, plant lectins have been used to help characterize the carbohydrate moieties of glycoproteins in the zona pellucida (ZP) of several mammalian species including pigs. Treatment of oocytes with various lectins blocks sperm binding to the ZP in various mammalian species. This study was undertaken to examine the distribution of sugar residues in the ZP of pig oocytes matured *in vitro* and the ability of spermatozoa to bind to ZP and *in vitro* penetration in oocytes treated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled lectins.

Materials and Methods: The lectins of *Banderiaea simplicifolia* (BS-II, bind to *ß-D-N-acetylglucosamine*), *Canavalin ensiformis* (Con A, bind to *a-D-Mannose*), *Lens culinaris* (LCA, bind to *a-D-Mannose*), *Ricinus communis* (RCA-I, bind to *ß-D-Galactose*) and *Ulex europaeus* (UEA-I, bind to *a-L-Fucose*) were examined for spermatozoa penetration, binding capacity to ZP and distribution of lectins.

Results: The penetration rates were significantry ($p<0.05$) higher in control oocytes (63%) than those treated with all lectins, but penetration rates (40~49%) were simililar in group treated with lectins. The incidence of monospermy was similar in oocytes untreated and UEA-I, but it was higher in oocytes treated with BS-II, Con A, RCA-I and LCA. The porcine oocytes cultured for 48 h in TC-199 medium were freed from cumulus cells and treated for 30 min with fluorescein isothiocyanate-labelled lectins. When examined under fluorescein illumination, higher ($p<0.001$) proportions of oocytes showed fluorescein of zona pellucida after treatment with Con A (93%), LCA (93%) and RCA-I (100%) than BS-II (37%) and UEA-I (50%). All of the oocytes treated with RCA-I exhibited strong fluorescein in the outer region of the zona pellucida while those treated with LCA exhibited strong fluorescein throughout the zona pellucida. BS-II bounded mainly to the outer region and UEA-I bounded mainly to the inner region of the zona pellucida, with either strong or weak fluorescein. At 120 min after insemination *in vitro*, fewer spermatozoa were bound to the zona pellucida of the oocytes treated with BS-II, Con-A and RCA-I. Of the lectins, Con A most inhibited sperm binding.

Conclusions: These results suggest that *ß-D-Galactose* residues in the porcine zona pellucida may

주관책임자: **박춘근**, **우**) 200-701 **강원도 춘천시 효자2동** 192-1, **강원대학교 동물자원학부**
Tel: (033) 250-8627, Fax: (033) 244-2532, e-mail: parkck@kangwon.ac.kr
이 논문은 2000**년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음** (KRF-2000-G00052).

act as primary sperm receptors and inducers of the sperm acrosome reaction and these sugar residues may be involved in the block to polyspermy.

Key Words: *In vitro*, Lectin, Pig, Sperm-oocyte interaction, Zona pellucida (ZP)

포유동물의 난자주위를 둘러싸고 있는 두터운 외세포막인 투명대는 정자의 종 특이성을 포함해 첨체반응유기 및 정자의 과도한 침입을 억제하는 등 수정시 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 포유동물난자의 투명대는 서로 다른 polypeptide chain과 oligosaccharides를 가지고 있는 glycoprotein으로 구성되어 있으며,[5] 이들 oligosaccharides는 모든 포유동물에 있어서 정자-난자의 결합을 인지하기 위한 중요한 역할을 하고 있다. 대부분 정자의 투명대 부착은 정자 원형질막의 끝 부분에 있는 하나 또는 그 이상의 glycoprotein에 의해 초기에 이루어진다.[3] 이 때 원형질막의 glycoprotein은 최초의 투명대 부착 분자이기 때문에 zona binding에 있어서 1차적 또는 2차적 부착의 구분을 위해서도 중요하다.[2,3,21]

세포 표면의 carbohydrates는 세포인식에 포함한 특이적인 정보 운반기능을 가진다. 이것은 monosaccharides와 그들이 황산화 되거나 아세틸화된 유도체 간 수많은 다른 부착이 가능한 것으로부터 이미 보고되었다.[8] 한편 Lectin은 세포점착성물질이며, 당단백 또는 비면역성 glycoprotein은 특유의 보완적인 saccharides를 가지고 glycoconjugates를 촉진한다. 특히 lectin-carbohydrate 상호작용은 세포인식에 있어 매우 중요하며,[6,7,18] 세포 형태와 발육단계에 따른 여러 가지 신호의 변환을 가져올 수 있다.[4] 이와 같은 특성 때문에, 식물성 lectin은 돼지를 포함한 여러 포유동물종의 투명대 내에서 glycoprotein의 탄수화물 일부에 특정적으로 도움을 주기 위해 이용되어 왔으며, 여러 가지 lectin을 이용한 난자의 처리는 몇몇 포유동물종의 투명대에 결합하는 정자를 억제하는 것으로 알려져 있다.[12]

지난 10년간, 많은 양의 lectin은 여러 조직에서 glycoconjugates의 영향을 연구하기 위해 조직화학적인 물질로서 이용되어져 왔다. 특히 사람과[11,13,14,23] 설치류[1,10,15~17,20,25]를 이용한 여러 연구에서는 lectin-binding 형태를 보고하였다.

돼지의 경우, 투명대 glycoprotein에 있어서 carbohydrate chain의 구조와 기능에 대한 연구가 이미 진행되었으며, 난포 난자의 투명대 내에서 lectin이 접합하는 부위의 분포는 조직화학적으로 삽입시키는 방법에 의해 검토되었다. 그러나 돼지에 있어서 정자-난자의 결합과 투명대내의 당잔기 사이의 관계에 대한 연구는 아직도 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled lectin을 이용하여 체외에서 성숙된 돼지난자의 투명대 내 당잔기의 분포와, 여러 가지 lectin을 가지고 처리한 난자의 정자침입과 정자의 결합능력에 대하여 검토하였다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 난자의 준비

도축장에서 회수한 난소는 35~37℃에서 75 μg/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin sulfate가 첨가된 0.9% (w/v) 생리식염수내에 침적하여 2시간 이내에 연구실까지 운반하였다. 난자는 18-gage의 주사침이 부착된 10-ml의 일회용 주사기를 이용하여 난소에 산재한 직경 2~6 mm의 난포로부터 흡입·채취한 후 세포질이 조밀하고 난구세포에 의해 둘러싸인 난자를 선택하여 10 IU/ml eCG 및 hCG가 첨가된 성숙배양액 (TC-199액, pH 7.4) 내에서 3회 세척하였다. 10개의 난자를 배양접시 내에서 paraffin oil로 덮어 약 3시간 동안 5% CO_2 및 39℃의 인큐베이터 내에서 전배양한 100 μl의 소적내에 옮겨 같은 기상조건하에서 42~44시간 성숙배양을 실시하였다.

2) 배양액

난자와 정자의 처리를 위한 기본배양액은 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 75 μg/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin sulfate 및 10% (v/v) fetal calf serum (FCS)이 첨가된 TC-199액을 사용하였다.

3) 정액의 채취 및 동결보존

돼지의 정액은 축산기술연구소에서 사육중인 종돈으로부터 채취하였으며, 채취된 정액의 동결보존은

Table 1. Lectins used for identifying carbohydrate components in the zona pellucida of pig oocytes matured *in vitro*

Lectin origin	Common name	Acronym	Major sugar specification
Bandeiraea simplicifolia		BS-II	*ß-D-N-acetylglucosamine*
Canavalin ensiformis		Con A	*a-D-Mannose*
Lens culinaris	*Common Lentil*	LCA	*a-D-Mannose*
Ricinus communis	*Castor Bean*	RCA-I	*ß-D-Galactose*
Ulex europaeus	*Gorse*	UEA-I	*a-L-Fucose*

Soejima 등과 Almlid와 Johnson의 방법을 Lee 등에 의해 개량된 방법에 준하여 실시하였다. 그 방법을 간략히 기술하면, 채취한 정액을 실온에서 실험실로 운반하여 정자의 농도와 활력을 측정한 후 BTS와 1:1로 희석하여 6×10^9 spermatozoa를 포함하고 있는 혼합액은 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 부유액은 제거하였고 정자는 동결방지액 5 ml로 재차 부유시켰다. 희석된 정액은 50-ml tube 내에서 1~2시간 동안 4℃까지 서서히 냉각시킨 후 동결방지액 5 ml를 1시간 동안에 걸쳐 서서히 첨가하였다. 제2희석 후, 정액은 4℃에서 40분간 평형시켰다. 평형시키는 동안 정액은 straw내로 포장하였으며, 평형시켜 포장된 정액은 LN_2 기체위 5 cm에서 두꺼운 종이 랙 위에서 20분간 수평으로 전동결시킨 후 LN_2로 직접 넣어 동결보존 하였다.

2. 연구 방법

1) 체외수정

체외성숙 후 난구세포를 제거한 난자는 1 μM FITC-labelled lectin이 첨가된 D-PBS 내에서 실온에서 30분간 배양한 후 수정용 배양액으로 3회 세척하였다. 이때 이용되는 체외수정용 배양액은 2.92 mM hemicalcium lactate와 10 mM caffeine sodium benzoate가 첨가된 TC-199액으로 사용전 5% CO_2 및 39℃의 인큐베이터 내에서 3시간 정도 평형시켰다. 그 후 10개의 난자를 50 μl의 drop내에 넣어 정자를 첨가할 때까지 약 30분 동안 CO_2 인큐베이터내에 넣어 두었다.

동결융해정액은 6 ml의 수정용 배양액을 첨가한 후 10분간 1,500 rpm에서 2회 원심분리에 의해 세척하였다. 세척 후 정자는 25×10^6 spermatozoa로 조정하였으며, 정자부유액 2 μl를 50 μl의 수정용 소적에 첨가하여 체외수정을 실시하였다.

2) 난자의 Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Labelled Lectins 처리

난자는 성숙배양 후 0.1% (w/v) hyaluronidase가 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 내에 넣어 반복 pipetting에 의해 난구세포를 제거하였다. 난구세포를 제거한 난자는 D-PBS액 내에서 3회 세척한 후 3% (w/v) paraformaldehyde가 첨가된 같은 배양액 내에서 30분간 고정하였다. 고정한 난자는 D-PBS 내에서 3회 세척 후 실온에서 1 μM의 FITC-labelled lectin이 첨가된 D-PBS 내에서 30분간 배양하였다. 본 연구에서 사용된 lectin의 종류는 Table 1에 나타낸 바와 같다.

3) 투명대내 Lectin의 분포

FITC-labelled lectin을 가지고 처리한 난자는 D-PBS 내에서 3회 세척 후 slide glass 내의 중앙에 놓았다. Cover-glass로 가볍게 누른 후 매니큐어를 가지고 공기가 통하지 않도록 봉하였다. 투명대내의 FITC-labelled lectin의 분포와 접합능력을 평가하기 위하여, 난자는 100 W mercury lamp와 DM 510 filter를 장착한 형광현미경하에서 실시하였다. 투명대내 FITC-labelled lectin의 접합능력은 positive 또는 negative 형광으로 구분하였으며, positive 형광의 정도는 강 또는 약으로서 반양적으로 구분하였다.

4) Lectin 처리된 난자에서의 정자접합과 침입에 관한 평가

수정 2시간 후, 난자의 일부는 투명대의 표면에 약하게 붙어 있는 정자를 제거하기 위해 직경 250 μm의 피펫으로 30회 정도 pipetting하였다. 그 후 난자는 3% (v/v) parafomormaldehyde액 내에서 30분간 고정한 후, 접착된 정자를 평가하기 위해 10 μg/ml bis-benzimide가 첨가된 D-PBS 내에서 3~5분간 염

Table 2. Spermatozoa penetration *in vitro* of porcine oocytes treated by lectins

Lectins (1 μM)	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetration	
		Total (%)	Polyspermy (%)
Control	97	61 (63)[a]	8 (13)[ab]
Bandeiraea simplicifolia	100	47 (47)[b]	1 (2)[a]
Canavalin ensiformis	98	58 (49)[b]	12 (21)[b]
Lens culinaris	102	51 (40)[b]	13 (25)[b]
Ricinus communis	104	43 (41)[b]	4 (9)[ab]
Ulex europaeus	99	43 (43)[b]	6 (14)[ab]

[a,b] Values with different superscripts within each column differ significantly. $p<0.05$

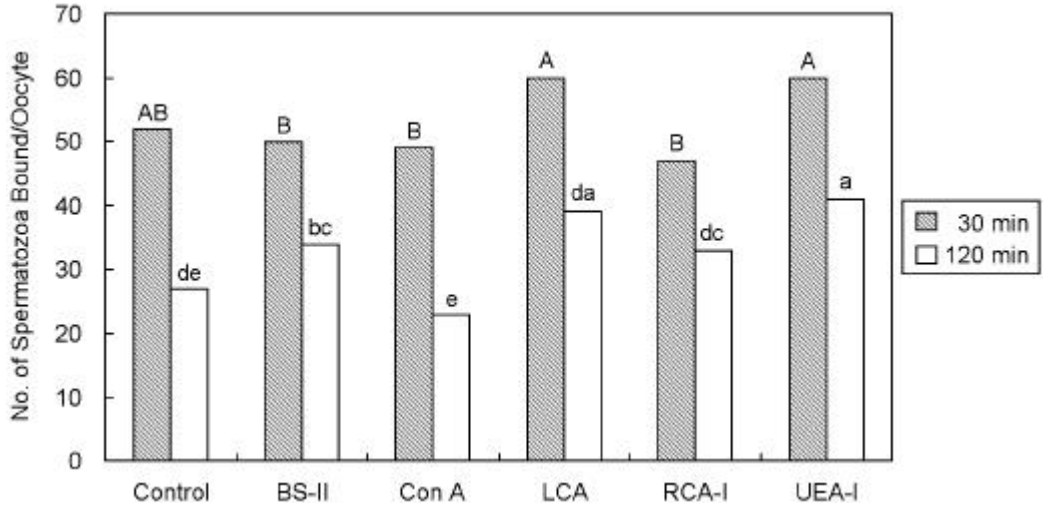

Figure 1. Effect of incubation periods and lectins on sperm binding to the zona pellucida in oocytes matured *in vitro* in the pig. Bars with different letter differ at 30 or 120 min of incubation period. $p<0.05$

색하여 slide glass위에 놓았다. 투명대에 강하게 접착된 정자의 수는 DM 400 filter가 장착된 형광현미경하 (×200)에서 계산하였다. 나머지 난자는 직경 200 μm의 피펫으로 정자를 완전히 제거하여 수정 후 12시간이 될 때까지 계속 배양하였다. 그 후 난자는 고정, 염색하여 난자내의 정자침입상황을 검토하였다.

결 과

체외에서 성숙한 돼지난자에서 lectin이 정자침입에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과, Table 2에서 나타낸 바와 같이 대조구의 정자침입율은 63% (61/97)로서 여러 종류의 lectin 첨가시의 정자침입율 (40~49%)에 비하여 유의적으로 높은 정자침입율을 나타냈다 ($p<0.05$). 그러나 lectin의 종류에 의한 정자침입율에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 한편 정자침입난자중 다정자 침입난자는 *Canavalin ensiformis* (21%, 12/58)와 *Lens culinaris* (25%, 13/51) 첨가시 *Bandeiraea simplicifolia* (2%, 1/47) 첨가시 보다 유의적 ($p<0.05$)으로 높은 비율을 나타냈다.

체외수정 후 정자가 난자의 투명대에 접착하는 정도에 있어서 lectin이 미치는 영향이 검토되었다. 그 결과 Figure 1에 나타낸 바와 같이 체외수정 후 30분

Table 3. Distribution and binding ability of lectins in the zona pellucida of porcine oocytes matured *in vitro*

Lectins	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes with ZP stained with	
		Positive (strong/weak)	Negative
Bandeiraea simplicifolia	46	17 (37)^{c} 10 (59)^{B}/7 (41)	29 (63)
Canavalin ensiformis	43	40 (93)^{a} 28 (70)^{B}/12 (30)	3 (7)
Lens culinaris	44	41 (93)^{a} 26 (63)^{B}/15 (37)	3 (7)
Ricinus communis	44	44 (100)^{a} 44 (100)^{A}/0 (0)	0 (0)
Ulex europaeus	44	22 (50)^{b} 10 (45)^{B}/12 (55)	22 (50)

$^{A,B;\ a,b,c}$ Values with different superscripts within each column differ significantly. $p<0.05$

에서 투명대에 부착된 정자의 수는 수정 후 120분보다는 lectin의 종류에 관계없이 더 많은 정자의 부착수를 나타냈다. 한편 체외수정 후 30분에서 *Lens culinaris*와 *Ulex europaeus*를 첨가한 경우 다른 lectin 첨가에 비해 유의적으로 높은 정자 부착수를 나타냈다 ($p<0.05$). 그러나 체외수정 후 120분에서는 *Lens curinaris*와 *Ulex europaeus*의 처리시 control 및 *Canavalin ensiformis* group에 비하여 유의적으로 높은 정자 부착수를 나타냈다 ($p<0.05$).

돼지난자의 투명대내 lectin의 접합능력을 검토한 결과를 Table 3에 나타냈다. 그 결과 *Canavalin ensiformis* (93%), *Lens culinaris* (93%) 및 *Ricinus communis* (100%)는 *Banderiaea simplicifolia* (37%) 및 *Ulex europaeus* (50%)에 비해 positive 형광의 정도가 유의성을 가지고 높게 나타났다 ($p<0.05$). 한편 positive 형광을 나타낸 난자 중 *Ulex europaeus*를 제외한 모든 lectin에서 강하게 접합되었으며, *Ricinus communis*는 다른 lectin에 비해 유의적으로 강한 접합능력을 나타냈다 ($p<0.05$).

한편, positive 형광의 정도는 강 또는 약의 반양적으로 구분하였다 (Figure 2). Strong은 밝은 노랑의 형광으로 보았으며, weak는 둔탁한 연두빛의 형광으로 평가하였다. 그 결과 Ricinus의 경우 모든 난자 (100%)에서 strong 정도를 보였다. 그러나 *Ulex europaeus*의 경우 positive 형광을 나타낸 난자 22개 가운데 형광정도가 약한 (weak) 난자는 12 (55%)개로 강한 (strong) 형광을 발휘한 경우 보다 높게 나타났다.

고 찰

본 연구는 fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled lectin을 이용하여 체외에서 성숙된 돼지난자의 투명대내 당잔기의 분포와 여러 가지 lectin을 처리한 난자의 정자침입 및 정자의 결합능력을 검토하였다. 본 연구에서 lectin을 이용한 난자의 처리는 투명대에 결합하는 정자의 부착에는 영향을 미치지 않았으나 침입율에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한 투명대 내에서 lectin의 종류에 따라 접합하는 특이부위가 있음을 알 수 있었다.

포유동물의 수정과정에 있어서, 정자와 난자투명대 사이의 인식 및 결합은 매우 중요한 단계로 생각되며, 이들 정자 및 난자의 상호작용시 각각의 배우자에 대한 상호보완적인 분자가 존재하고, 이들 분자사이의 상호작용에 의해 정자 및 투명대간의 인식과 결합이 억제되는 것으로 생각해 왔다.[12,24] 마우스

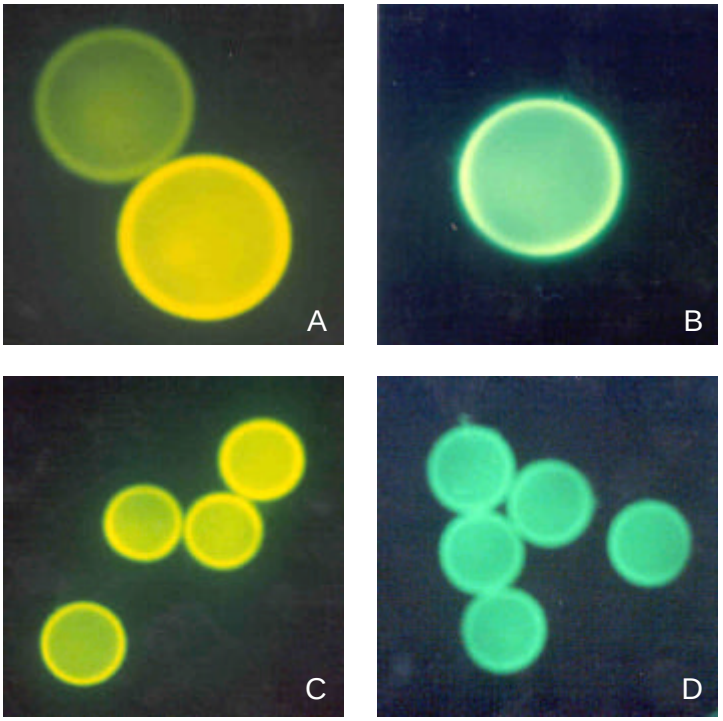

Figure 2. Lectin-binding to the zona pellucida of oocytes matured *in vitro* in the pig. **A:** Oocytes bounded with and without fluorescence in the *Ulex europaeus*. **B:** *Lens culinaris* bound mainly to the outer region of the zona pellucids with strong fluorescence. **C:** Oocytes bound with strong fluorescence by *Lens culinaris* agglutinin to out region of the zona pellucida. **D:** Oocytes bound throughout the zona pellucida with weak fluorescence by *Canavalin ensiformis*.

의 경우 투명대는 ZP1, ZP2 및 ZP3로 불리는 당단백질로 되어 있으며, 정자와 난자투명대 결합에 중요한 역할을 하는 당류는 ZP3상에 존재하는 것으로 알려져 있다.[22] 본 연구에서는 lectin 처리된 난자를 체외수정시킨 후 정자침입율을 검토한 결과, lectin 종류간의 유의적인 차이는 보이지 않았으며, lectin 처리를 하지 않은 실험구에서 유의적으로 높은 침입율을 보여 lectin의 처리가 정자의 침입율을 억제하는 것으로 나타났다.

돼지난자의 투명대 내에는 여러 종류의 lectin이 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 특히 *ß-D-Galactose*와 *a-D-Mannose*는 투명대의 외측에 존재하면서 정자의 결합을 가장 강력하게 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구에서는 체외수정 후 30분에서 lectin 처리한 난자의 투명대에 부착된 정자수가 대조구에 비해서 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 체외수정 후 120분에서도 lectin 종류에 의한 투명대내 정자 결합에는 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 정자에 존재하는 분자는 동물종에 따라 다르나 주로 lectin과 같은 항원단백질과 효소로 분류할 수 있다. lectin은 특이 탄수화물 잔기에 접합하는 것으로 생각되며, 포유동물난자의 투명대 내에서 lectin은 생식세포의 결합에 종 특이적인 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다.[19]

한편, 본 연구에서 난자의 투명대내 lectin 접합능력은 *Canavalin ensiformis* (93%), *Lens culinaris* (93%) 및 *Ricinus communis* (100%)는 *Banderiaea simplicifolia* (37%) 및 *Ulex europaeus* (50%)에 비해 positive 형광의 정도가 높게 나타났다. 또한 positive 형광을 나타낸 난자 중 *Ulex europaeus*를 제외한 모든 lectin에서 강하게 접합하였으며, *Ricinus communis*는 다른 lectin에 비해 유의적으로 강한 접합능력을 나타냈다. 이는 정자의 첨체부분을 싸고 있는 세포막은 최초로 난자의 투명대와 접촉하는 부분이므로 투명

대 인식분자가 존재하는 장소의 하나로 생각된다. 이와 같은 연구는 guinea pig,[25] 랫트,[1,15~17,20] 마우스[10]에서 확인되었으며 소,[1] 사람[11,13,14] 그리고 산양[9]에서도 비슷할 것으로 추측하고 있다.

이상과 같은 연구결과로 lectin을 이용한 난자의 처리는 투명대에 결합하는 정자를 억제하지는 않았지만 수정율에 영향을 미치며 투명대내 lectin의 종류에 따라 접합하는 특이 부위가 있음을 시사하였다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 협조해 주신 강원대학교 동물자원공동연구소와 돼지의 동결정액을 제조, 공급해 주신 축산기술연구소의 이장희 박사에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Arya M, Vanha-Perttula T. Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis. Andrologia 1984; 16: 495-508.
2. Crosby JA, Jones R, Barros C, Carvallo P. Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. Mol Reprod Dev 1998; 49: 426-34.
3. Frits MF, Wim FV, Ben C, Lambert MG, van Golde, Barend MG. Use of Lectins to Characterize Plasma Membrane Preparations from Boar Spermatozoa: A Novel Technique for Monitoring Membrane Purity and Quantity. Biol Reprod 1998; 59: 1530-9.
4. Francoise P, Susan K. Cell surface carbohydrates and lectins in early development. Mol Hum Reprod 1997; 3(10): 907-18.
5. Fukuda M. Cell sulface carbohydrares: cell-type specific expression. Mol. Biology 1994; Oxford University Press, Oxford, pp. 1-52.
6. Hakomori SI. Carbohydrates as adhesion molecules. In Gahnberg: CG, Mandrup P, T, Wogensen B, L, Hokfelt, B. (eds). leukocyte adhesion. Basic and Clinical aspects 1992; Elsevier Science publishers, Amsterdam.
7. Hughes RC. Role of glycosylation in cell interactions with extracellular matrix. Biochem Soc Trans 1992; 20: 279-84.
8. Kobata A. Glycobiology: an expanding research area in carbohydrate chemistry. Acc Chem Res 1993; 26: 319-24.
9. Kurohmaru M, Kanai Y, Hayashi Y. Lectin-binding patterns in the spermatogenic cells of the shiba goat testis. J Vet Med Sci 1991; Oct: 53(5): 893-7.
10. Lee MC, Damjanov I. Anatomic distribution of lectin-binding sites in mouse testis and epididymis. Differentiation 1984; 27: 74-81.
11. Lee MC, Damjanov I. Lectin-binding sites on human sperm and spermatogenic cell. Anat. Rec 1985; 212: 282-7.
12. Liu DY, Lopata A, Johnston WI, Baker HW. Human sperm-zona pellucida binding, sperm characteristics and *in-vitro* fertilization. Hum Reprod 1989; 4: 696-701.
13. Malmi R, Kallajoki M, Sominen J. Distribution of glycoconjugates in human testis. A histochemical study using fluorescin- and rhodamine-conjugated lectin. Andrologia 1987; 19: 322-32.
14. Malmi R, Soderstrom KO. Lectin binding sites in human seminiferous epithelium, in CIS cells and in seminomas. Int J Androl 1987; 10: 157-62.
15. Malmi R, Soderstrom KO. Lectin binding to rat spermatogenic cells: effect of different fixation methods and proteolytic enzyme treatment. Histo Jour 1988; 20: 276-82.
16. Malmi R, Karjalainen K, Soderstrom KO. Differentiation-related changes in the distribution of glycoconjugates in rat testis. Histochemistry 1990; 94: 387-95.
17. Malmi R, Soderstrom KO, Karjalainen K. Labeling of rat spermatogenic cells with fluoresein isothiocyanate conjugated lectins 1983; pp. 327-333. In: Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, vol. 3 (Bog-Hansen TC, Spengler GA eds.), Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York.
18. Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition mole-

cules. Science 1989; 246: 227-34.

19. Skutelsky E, Ranen E, Shalgi R. Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. J Reprod Fertil 1994; Jan: 100(1): 35-41.
20. Soderstrom KO, Malmi R, Karjalainen K. Bindin of fluoresein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue section. Histochemistry 1984; 80: 475-9.
21. Topfer-Petersen E, Henschen A. Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. Fertil Steril 1987; 226: 38-42.
22. Wassarma PM. Mouse gamete adhesion molecules. Biol Reprod 1992; 46: 186-91.
23. Wollina V, Schreiber G, Zollmann C, Gipler C, Gunther E. Lectin-binding sites in nomal human testis. Andrologia 1989; 21: 127-30.
24. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Nejll JD (eds.), Physiolo. Reprod 1994; (2) New York: Raven Press; 189-317.
25. Yamamoto N. Electron microscopic analysis of sugar residues of glycoproteins in the acrosomes of spermaticds using various lectin. acta Histochem Cytochem 1982; 15: 139-50.