

생쥐 미성숙 난자의 융합에 의한 성숙 유도

김해권 · 공희숙 · 이경광\* · 조완규  
(서울대학교 동물학과 · 과학기술원 유전공학 센터\*)

Maturation Induction of Mouse Immature Oocytes by Fusion

Hae Kwon Kim, Hui Sook Kong, Kyung-Kwang Lee\* and Wan Kyoo Cho  
(Dept. of Zoology, Seoul National University; Genet. Engin. Center, KAIST\*)  
(1986. 11. 15. 접수)

---

ABSTRACT

The research of fused oocytes was conducted to investigate the *in vitro* meiotic maturation of immature oocytes (GV oocytes) fused with oocytes in germinal vesicle breakdown (GVBD oocytes) in the presence of dbcAMP which is known as one of the strong inhibitors to GVBD.

The immature oocytes fused together as well as those fused with GVBD oocytes proceeded to GVBD in 3 hr culture in plain medium. But in the medium containing dbcAMP (100 $\mu$ g/ml), the immature oocytes fused together did not show any GVBD and thus the fusion itself could not affect the inhibitory activity of dbcAMP. However, all of the immature oocytes fused with GVBD oocytes underwent GVBD in 3 hr culture despite of the presence of dbcAMP.

When the culture was extended to 20 hr, nearly all of the immature oocytes fused together were still arrested at the GV stage in the presence of dbcAMP. But most of the fused oocytes which had shown GVBD during 3 hr culture developed to metaphase II stage extruding one or two polar bodies regardless of the presence of dbcAMP. In this experiment, it was found that two sets of the metaphase chromosomes were somewhat concomitant with a pair of the polar bodies in the fused egg.

Upon the results of the present studies, it is assumed that there may be a maturation promoting factor(s) in the cytoplasm of the GVBD oocytes, and this factor(s) possibly nullifies the function of dbcAMP.

---

본 실험은 과학기술원 연구비 지원(1985년, N 01184)을 받아 행해졌다.

## 서 론

포유동물의 난자는 출생시 제 1 감수분열 전기에 머물러 있다가 사춘기에 이르러 생식소 자극호르몬에 의해 감수분열이 재개되지만 적절한 조건을 갖춘 배양액 내에서는 비록 호르몬의 자극이 없이도 자발적인 성숙을 일으킨다(Pincus and Enzmann, 1935). 그러나 이들 난자의 체외 성숙은 배양액내의 dbcAMP에 의해 가역적으로 억제되며(Cho *et al.*, 1974) 또한 세포내 cAMP의 대사에 관여하는 phosphodiesterase의 억제제인 theophylline (Cho *et al.*, 1974) 혹은 isobutyl-methylxanthine(Schultz *et al.*, 1983) 등이 배양액 내에 존재하여도 체외 성숙이 억제된다. 이런 결과로 미루어 포유동물 난자의 성숙 기작에는 난자 내 cAMP가 중요한 역할을 할 것으로 기대되어, 세포내 cAMP의 대사과정에 직접적으로 관계하는 몇가지 효소 및 이들의 억제제에 관하여 많은 연구(Vivarelli *et al.*, 1983; Bornslaeger *et al.*, 1984; Eppig and Downs, 1984; Jung and Cho, 1985)가 진행되어 왔으나 난자의 성숙기작과 cAMP의 역할간의 구체적인 관계는 아직도 밝혀지지 않고 있다.

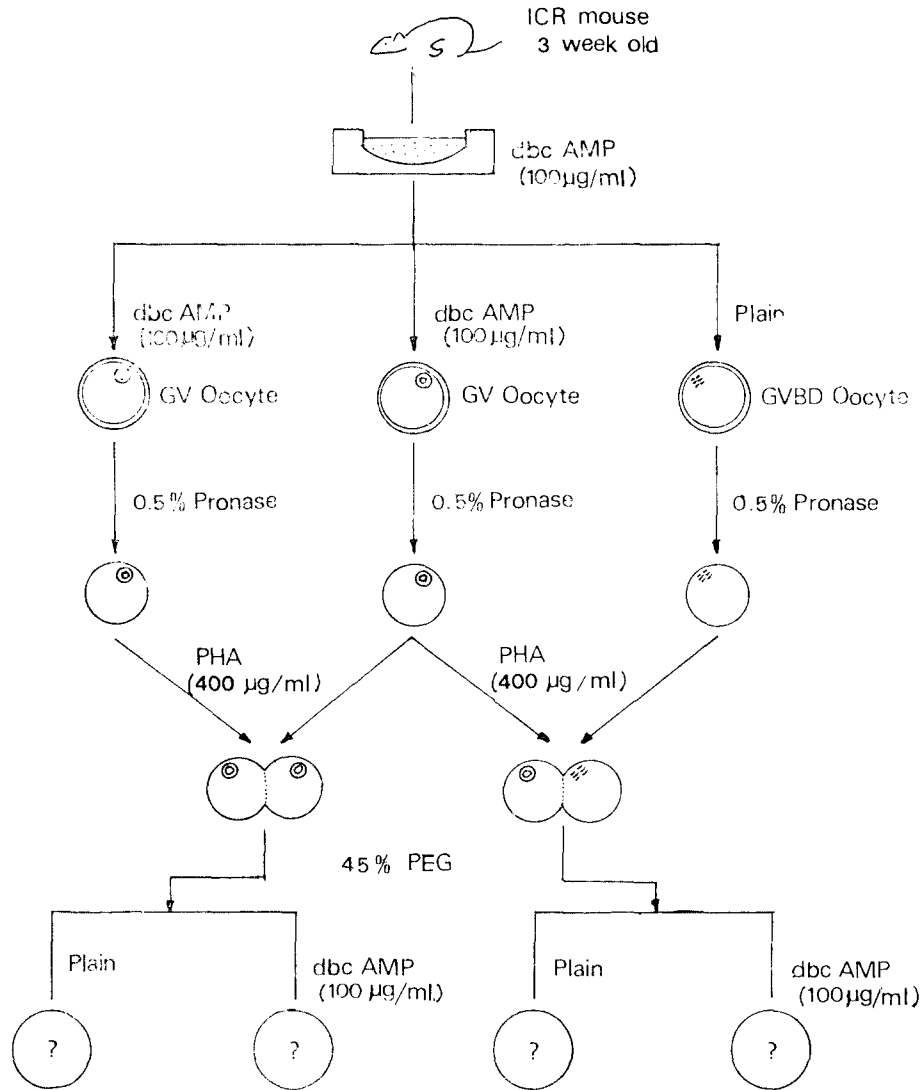
한편 성숙한 양서류 난자의 세포질을 미성숙난자의 세포질에 주입하였을 때 미성숙 난자의 성숙분열(GVBD)이 재개되는 것으로 보아 양서류 성숙 난자의 세포질 내에는 성숙유도물질(Maturation Promoting Factor, MPF)이 존재할 것이라고 추리하고 있다(Masui and Markert, 1971). 그리고 생쥐의 4세포기 배아 세포와 생쥐 미성숙 난자를 융합시켰을 때 생쥐 미성숙 난자의 성숙분열이 유도되는 것(Balakier, 1978)으로 보아 포유류 초기배아의 세포질 내에도 성숙 유도물질이 존재할 것이라고 추리되며 생쥐 성숙 난자의 세포질이 양서류난자의 성숙분열도 유도할 수 있는 것으로 미루어 양서류의 성숙 유도물질과 생쥐의 성숙 유도물질이 유사물질일 가능성도 있다(Sorensen *et al.*, 1985).

본 실험은 세포융합 방법을 이용하여 성숙 난자와 융합된 미성숙난자가 강력한 성숙 억제제로 알려진 dbcAMP의 존재아래 과연 성숙을 재개할 수 있는지를 알아보기 위해 행해졌다.

## 재료 및 방법

본 실험에는 서울대학교 실험동물사육장에서 사육된 ICR strain의 생쥐를 사용하였다. 기본 배양액으로는 M199(Gibco)에  $\text{NaHCO}_3$  2.2g/l, HEPES 25 mM, Na-pyruvate 0.25 mM, Streptomycin 0.05 g/l, penicillin G 100 I.U./ml 및 0.4%의 bovine serum albumin (BSA, Sigma)을 첨가하고 NaOH 로 적정하여 pH 7.4가 되게 하여 사용하였다(modified from Pavlok and McLaren, 1972).

생후 3주된 생쥐 암컷을 경추 파열로 도살하고 양쪽 난소를 절제하여 paraffin oil(Sigma)로 덮인, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 dbcAMP(Sigma)가 함유된 기본배양액이 들어있는 embryological watch glass에 이들 난소를 옮겼다. 해부현미경 아래에서 에리한 바늘로 난소를 터뜨려 핵막(Germinal Vesicle, GV)과 인이 뚜렷한 난자만을 골라 mouth-controlled micropipette를 사용하여 서너번 씻은 후 실험재료로 사용하였다. 미성숙난자 간의 융합은 다음과 같이 행하였다(Fig. 1). 먼저 0.5% pronase (Calbiochem, grade B)가 함유된 37°C Dulbecco's phosphate buffered saline 내에 3분간 난자를 두어서 투명대를 제거(Mintz, 1962)한 후 기본



**Fig. 1.** A diagram illustrating the general features of the fusion protocol between the mouse oocytes.

배양액으로 서너번 씻었다. 이를 400 µg/ml의 phytohemagglutinin(from *Phaseolus vulgaris*, Sigma)이 들어있는 M199에 옮겨 각각의 난자를 mouth-controlled micropipette를 사용하여 두 개씩 쌍으로 aggregation시킨 (Mintz, 1973)후, 45% polyethylene glycol (PEG, Sigma, Mr. 1,000)이 함유된 BSA-free M199 내에서 1분동안 처리하여 융합을 유도하였다(Gulyas *et al.*, 1984). 처리 후 이들을 기본 배양액으로 충분히 씻은 다음 dbcAMP(100 µg/ml)가 들어있는 배양액 혹은 이것이 제외된 배양액으로 옮겨 paraffin oil drop method(Brinster, 1963)로 배양하였다.

미성숙 난자와 성숙 난자간의 융합은 다음과 같이 행하였다(Fig. 1). 수집한 난자들중 일

부는 성숙을 억제하기 위하여 dbcAMP가 함유된 배양액에 넣고 다른 일부는 dbcAMP가 제외된 기본 배양액에 넣어 3~4시간 배양하여 dbcAMP 배양액으로부터는 핵막이 뚜렷한 난자(GV oocyte)를 고르고 기본배양액으로부터는 핵막붕괴가 일어난 난자(Germinal Vesicle Breakdown oocyte; GVBD oocyte)를 골라 이들을, 앞서 미성숙 난자의 융합방법과 같은 절차로 융합을 시킨 후 일정시간 배양하였다.

일정시간 배양된 난자는 해부현미경(Wild)으로 관찰하여 GV, GVBD 및 극체(Polar body; PB)의 형성 등에 의하여 성숙단계를 구분하였다. 배양이 끝난 난자는 acetic alcohol(glacial acetic acid 1; ethyl alcohol 3)로 고정하고 0.5% acetolacmoid로 염색한 후 위상차 현미경(Wild)으로 핵상을 관찰하였다. 실험에 사용된 모든 초자기구는 180°C에서 20분간 고온 멸균하여 사용하였고, autoclave가 가능한 것들은 15 1b에서 20분간 멸균한 후 사용하였다. 사용된 모든 배양액은 0.22  $\mu\text{m}$ 의 내경을 갖는 millipore membrane(Millipore)으로 여과하여 사용하였다.

## 결 과

45쌍의 생쥐 미성숙 난자 상호간(GV+GV)의 융합을 시도한 결과 그 중 17쌍이 융합되었으며 이들은 기본 배양액 내에서 3시간이 경과하였을 때 거의 모두가 성숙을 재개하였다. 또한 GVBD 난자와 융합된 21쌍의 미성숙 난자(GV+GVBD)도 역시 기본 배양액 내에서 3시간 후 모두 성숙체계를 하였다. 그러나 난자성숙 억제제인 dbcAMP가 함유된 배양액 내에서는 3시간이 경과하였을 때 16개의 융합된 미성숙 난자쌍(GV+GV)들이 전혀 GVBD를 일으키지 못하였다. 반면에 GVBD 난자와 융합된 미성숙난자(GV+GVBD) 30개는 dbcAMP의 존재에도 불구하고 전부 GVBD를 일으켰다(Table 1).

한편 이들을 계속 배양하여 20시간 후에 조사한 결과를 Table 2에 실었다. 기본 배양액 내에서는 25개의 GV+GV 융합난자중 다수가 하나 혹은 2개의 극체를 형성하였고, 또한 25개의 GV+GVBD 융합난자 중에서는 16개가 극체를 형성하였다. 그러나 dbcAMP가 함유된 배양액 내에서는 비록 20시간이 경과하더라도 대부분의 GV+GV 융합난자들이 성숙을 하지 못하고 GV 상태에 머물러 있었으며 단지 일부가 dbcAMP에 의한 성숙억제 효과를 극복하여 GVBD를 일으키거나 혹은 극체를 형성하였다. 이와는 달리 같은 dbcAMP 배

**Table 1.** GVBD induction of immature (GV) mouse oocytes fused with mature (GVBD) oocytes in the presence of dbcAMP in a 3-hour culture.

Medium	Pair type	No. of egg pairs PEG treated <sup>1)</sup>	No. of egg pairs fused	No. of egg pairs showing GV <sup>2)</sup>	No. of egg pairs in GVBD
Plain	GV+GV	45	17	1	16
	GV+GVBD	44	21	0	21
dbcAMP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	GV+GV	45	16	16	0
	GV+GVBD	53	30	0	30

1) Polyethylene glycol.

2) Fused oocytes with two distinct germinal vesicles.

The above results were obtained by pooling of six repeated experiments.

**Table 2.** Polar body production of immature (GV) oocytes fused with the mature oocytes (GVBD) in the presence of dbcAMP cultured for 20 hours.

Medium	Pair type	No. of egg pairs PEG treated	No. of egg pairs fused in 20hr	No. of egg pairs showing GV <sup>1)</sup>	No. of egg pairs in GVBD	No. of pairs with PBs <sup>2)</sup>	Degenerated
Plain	GV+GV	45	25	0	7	18(5)	5
	GV+GVBD	44	25	0	4	16(6)	5
dbcAMP (100µg/ml)	GV+GV	45	26	22	1	3(0)	0
	GV+GVBD	53	31	0	8	19(7)	4

1) Fused oocytes with two distinct germinal vesicles.

2) Numbers in parentheses are numbers of fused oocytes with two PBs.

The above results were obtained by the extended cultivation of the previous groups of oocytes (Table 1).

양액 내에서 배양된 31개의 GV+GVBD 융합난자들은 20시간이 경과하였을 때 19쌍이 하나 혹은 두 개의 극체를 방출하는 제 2 감수분열 중기의 융합난자로 되었다.

GV+GV 난자쌍을 PEG로 처리한 후 dbcAMP가 들어 있는 배양액 내에서 배양하면, 두 시간 이내로 난자 간의 융합이 시작되고(Fig. 2-B) 융합이 진행됨에 따라 핵의 이동이 이루어져 결국 두 개의 핵 물질이 하나의 세포질을 공유하게 된다. 이때 각각의 핵은 dbcAMP의 억제기작에 의해 핵막붕괴를 일으키지 못하고 세포질의 중앙에 서로 근접한 채 자리잡고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 2-C). 그러나 GV+GVBD 난자쌍(Fig. 2-D)을 PEG로 처리한 후 배양하면 난자 간의 세포질 융합이 시작되는 즉시 dbcAMP가 있고 없고 간에 GV 난자의 핵막이 붕괴되는 것이 관찰되었다(Fig. 2-E). 또한 이들을 계속 배양하면 2개의 핵물질이 융합하여(Fig. 2-H) 결국 하나의 극체와 하나의 제 2 감수분열 중기 적도판을 형성(Fig. 2-F)하게 되지만, 때로는 각각의 핵물질이 독립적으로 행동하여 그 결과 서로 다른 방향으로 각각의 극체를 방출하고 동시에 각각의 적도판을 형성(Fig. 2-G)하는 경우도 나타났다. 이러한 핵물질의 행동양상은 GV+GV쌍을 기본 배양액 내에서 배양할 경우에도 마찬가지였다.

## 고 찰

생쥐 미성숙 난자는 dbcAMP의 존재 아래에 성숙분열이 억제되지만 핵막 붕괴에 들어간 난자에게는 그 같은 억제효과를 찾아볼 수 없다(Cho *et al.*, 1974)는 사실은 성숙분열에 들어간 난자의 세포질 내에 dbcAMP의 억제효과를 능가할 어떤 물질이 형성되고 있음을 암시하고, 이같은 암시는 이미 여러학자들에 의해서 제기되고 있다. 즉 이와 유사한 물질의 존재는 양서류 난자에서 처음으로 알려져 이를 maturation promoting factor(MPF)라 했다(Masui and Markert, 1971). Balakier(1978)는 어린 생쥐의 미성숙 난자를 생쥐의 4세포기 배아 세포와 융합한 실험에서 미성숙 난자의 성숙 유도에 성공하였으며, 이로 보아 생쥐의 4세포기 배아 세포에 MPF가 있을 것이라고 내다 보았다. 최근들어 제 2 감수분열 중기에 있는 생쥐 난자의 세포질 내에도 미성숙 난자의 성숙을 유도하는 물질이 있을 것이라는 보고(Clarke and Masui, 1985)가 있었으며 이 물질은 양서류 난자의 성숙을 유도할 수도 있

어서 종특이성이 없다고 보고하고 있다(Sorensen *et al.*, 1985), 본 실험에서도 이미 성숙 분열에 진입한 난자내에 성숙을 촉진하는 물질이 존재할 것이라는 설을 뒷받침하는 결과를 얻었다. 단일 미성숙 난자를 GVBD를 보이는 성숙과정에 있는 난자와 융합하면 미성숙 난자는 곧 핵막붕괴를 일으키게 되며, 이같은 현상은 난자성숙을 억제하는 dbcAMP의 존재 아래에서도 관찰할 수 있다. 즉 이미 핵막붕괴에 들어간 난자의 세포질 내에는 MPF가 형성되어 있어서 이것이 미성숙난자의 핵막에 작용하여 GVBD를 유발하는 것이라고 할 수 있다. 양서류를 재료로 한 실험 결과 Wu and Gerhart(1980)는 MPF가 일종의 단백질이라고 주장하였는데, 생쥐의 경우 단백질 합성 억제제인 puromycin을 처리하여도 생쥐 난자의 성숙이 재개되는(Wassarman *et al.*, 1976) 것으로 보아 생쥐 미성숙 난자 내에는 이미 MPF가 합성되어 있으며, 이는 단지 세포질 내에 불활성화한 형태로 존재하리라는(Clarke and Masui, 1985)것을 추측할 수 있다. 특히 생쥐 미성숙 난자 내에서는 cAMP의 농도가 높지만 일단 성숙분열에 들어가면 난자내 cAMP 농도가 낮아지는 현상(Schultz *et al.*, 1983)으로 보아 미성숙 난자내의 MPF의 활성화와 cAMP의 역할과는 밀접한 관계가 있을 것으로 추측된다. 또한 GVBD를 일으킨 난자에서 dbcAMP의 성숙 억제효과를 볼 수 없는 것은 일단 MPF가 활성화되면 더 이상 dbcAMP의 영향을 받지 않기 때문이라고 할 수 있다.

융합난자의 핵은 마치 미성숙 난자끼리 융합한 것에서 알 수 있듯이 난자들이 성숙을 재개하지 않을 경우 핵의 융합없이 2개의 뚜렷한 핵이 한 세포질내에 존재한다. 그러나 융합난자가 성숙을 재개하게 되면 2개의 핵 물질이 융합하여 단일 핵 분열 양상을 보여 준다는 보고(Tarkowski and Balakier, 1980; Fulka, 1985)가 있었으나 본 실험에서는 2개의 핵이 독립적으로 분열하여 각각 1개씩의 극체를 방출함으로써 결국 한개의 난자가 2개의 극체를 형성하는 경우를 볼 수 있었다(Fig. 2-G). 돼지의 난자를 융합할 경우에도 2중의 핵 분열상이 알려져(Fulka *et al.*, 1985) 있지만 2개의 극체 방출에 대한 보고는 없었다. 미성숙 난자끼리의 융합시간 보다도 미성숙난자와 성숙 난자간의 융합이 일어나는 시간이 짧은 현상을 본 실험결과에서 관찰할 수 있었으나 그 같이 시간이 짧은 까닭은 성숙 분열에 들어간 난자의 표면에 분포하고 있는 microvilli가 소실되는 것(von Weymarn *et al.*, 1980)과 관련이 있는 것으로 추상할 수 있다.

결국 본 실험 결과 성숙난자(GVBD oocyte)의 세포질 내에는 성숙유도물질(혹은 유사인자)이 있으며 이 물질의 성숙유도 효과는 dbcAMP의 난자 성숙 억제효과 보다 그 강도가 강하다는 사실을 확인할 수 있었고, 또한 융합난자 내의 핵의 특이한 행동 및 그에 따른 극체의 방출 양상의 특징을 밝힐 수 있었다. 앞으로 MPF의 실질적인 존재를 규명함으로써 난자의 성숙 기작에 대하여 분명한 해명이 가능할 것이다.

## 요 약

생쥐 미성숙 난자를 재료로 하여 난자 성숙 억제제인 dbcAMP 존재하에서 GVBD 난자와의 융합에 따른 체외성숙 양상을 조사하였다.

기본 배양액 내에서 3시간이 경과하였을 때는 GVBD 난자와 융합된 미성숙 난자 뿐만 아니라 미성숙 난자끼리 융합된 것들도 모두 성숙을 재개하였다. 그러나 dbcAMP가 함유된 배양액 내에서 3시간이 경과하였을 때는, 미성숙 난자끼리 융합된 것들은 모두가 GV 상

태로 성숙이 억제된 채로 있었고 반면에 GVBD 난자와 융합된 미성숙 난자들은 비록 dbcAMP가 존재하더라도 모두 성숙을 재개하였다. dbcAMP가 함유된 배양액 내에서 20시간이 경과하였을 때 미성숙 난자끼리 융합된 것들은 여전히 성숙이 억제되어 있었으나 GVBD 난자와 융합된 미성숙 난자들은, 기본 배양액 내에서 배양된 융합난자들과 마찬가지로 다수가 하나 혹은 두 개의 극체를 형성하는 제 2 감수분열 증기에 진입하였다. 두 개의 극체를 방출한 융합난자들 중에는 하나의 세포질 내에 감수분열 증기방추사가 두 곳에서 형성되는 것이 관찰되었다.

이 실험 결과로 보아 이미 성숙이 재개된 난자내에는 난자 성숙 억제제인 dbcAMP의 억제효과보다 더 영향이 큰 난자 성숙 유도물질이 있으며, 이 물질이 융합하고 있는 미성숙 난자내로 이전하여 dbcAMP에 의해서 그 성숙이 억제된 미성숙 난자의 성숙을 유도한다는 것을 알 수 있다.

#### REFERENCES

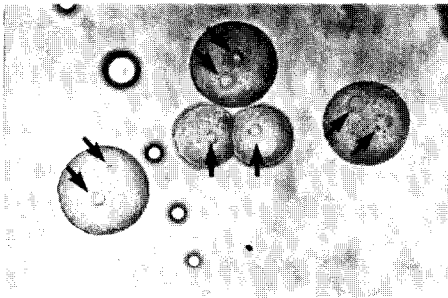
- Balakier, H., 1978. Induction of maturation in small oocytes from sexually immature mice by fusion with meiotic or mitotic cells. *Exp. Cell Res.* **112**:137-141.
- Bornslaeger, E.A., M.W. Wilde and R.M. Schultz, 1984. Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev. Biol.* **105**:488-499.
- Brinster, R.L., 1963. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two cell embryo to blastocyst. *Exp. Cell Res.* **32**:305-308.
- Cho, W.K., S. Stern and J.D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cyclic AMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **187**:183-186.
- Clarke, H.J. and Y. Masui, 1985. Inhibition by dibutyryl cyclic AMP of the transition to metaphase of mouse oocyte nuclei and its reversal by cell fusion to metaphase. *Dev. Biol.* **108**:32-37.
- Eppig, J.J. and S.M. Downs, 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* **30**:1-11.
- Eglitis, M.A., 1980. Formation of tetraploid mouse blastocysts after blastomere fusion with polyethylene glycol. *J. Exp. Zool.* **213**:309-313.
- Fulka, J. Jr., 1985. Maturation-inhibiting activity in growing mouse oocytes. *Cell Differ.* **17**:45-48.
- Fulka, J. Jr., J. Motlik, J. Fulka and N. Crozet, 1985. Inhibition of nuclear maturation in fully grown porcine and mouse oocytes after their fusion with growing porcine oocytes. *J. Exp. Zool.* **235**:255-259.
- Gulyas, B.J., M. Wood and D.G. Whittingham, 1984. Fusion of oocytes and development of oocyte fusion products in the mouse. *Dev. Biol.* **101**:246-250.
- Jung, M.W. and W.K. Cho, 1986. Studies on the relationship between cAMP phosphodiesterase and maturation of mouse oocytes. *Kor. J. Zool.* **29**:79-85.
- Masui, Y. and C.L. Markert, 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**:129-146.
- Mintz, B., 1962. Experimental study of the developing mammalian egg: Removal of the zona pellucida. *Science* **138**:594.
- Mintz, B., J.D. Gearhart and A.O. Guymont, 1973. Phytohemagglutinin-mediated blastomere aggrega-

- tion and development of allophenic mice. *Dev. Biol.* **31**:195-199.
- O'Connor, C.M. and L.D. Smith, 1976. Inhibition of oocyte maturation by theophylline: Possible mechanism of action. *Dev. Biol.* **52**:302-318.
- Pavlok, A. and A. McLaren, 1972. The role of cumulus cells and the zona pellucida in fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* **29**:91-97.
- Pincus, G. and E.V. Enzmann, 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* **62**:665-675.
- Schultz, R.M., R. Montgomery and J. Belanoff, 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.* **97**:264-273.
- Sorensen, R.A., M.S. Cyert and R.A. Pedersen, 1985. Active maturation-promoting factor is present in mature mouse oocytes. *J. Cell Biol.* **100**:1637-1640.
- Tarkowski, A. and H. Balakier, 1980. Nucleo-cytoplasmic interaction in cell hybrids between mouse oocytes, blastomeres and somatic cells. *J. Embryol. Exp. Morph.* **55**:319-330.
- Vivarelli, E., M. Conti, M. De Felici and G. Siracusa, 1983. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Differ.* **12**:271-276.
- von Weymarn, N., R. Guggenheim and H.J. Müller, 1980. Surface characteristics of oocytes from juvenile mice as observed in the scanning electron microscope. *Anat. Embryol.* **161**:19-27.
- Wassarman, P.M., W.J. Josefowicz and G.E. Letourneau, 1976. Meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*: Inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *J. Cell Sci.* **22**:531-545.
- Wu, M. and J.C. Gerhart, 1980. Partial purification and characterization of the maturation-promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **79**:465-477.

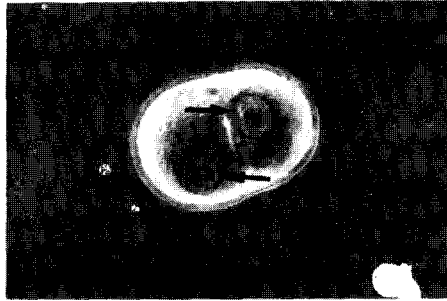


**Fig. 2.** Morphology of fused mouse oocytes during cultivation in medium containing dbcAMP(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

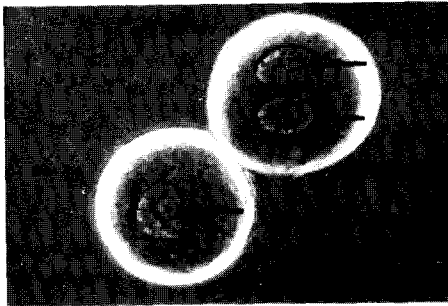
- (A) Light micrograph showing three fused and one unfused GV oocytes cultured for 24h after PEG treatment. Arrows indicate germinal vesicles (GVs). ( $\times 200$ ).
- (B) Phase micrograph showing a GV oocyte pair in fusion at 2h after PEG treatment. Arrows indicate GV. ( $\times 300$ ).
- (C) Phase micrograph showing two fused GV oocytes cultured for 24h after PEG treatment. Upper shows two distinct GV (arrows) in one fused cytoplasm and lower shows one GV. In the latter case, the other GV is out of focus. ( $\times 300$ ).
- (D) Phase micrograph showing a GV+GVBD oocyte pair before PEG treatment. Arrow indicates GV. ( $\times 400$ ).
- (E) Phase micrograph showing a GV+GVBD oocyte pair in fusion at 2h after PEG treatment. Note the disappearance of GV before fusion is completed. ( $\times 300$ ).
- (F) Phase micrograph showing a metaphase II figure of the fused GV+GVBD oocytes cultured for 24h after PEG treatment. Note the typical arrangement of metaphase spindle with mixed chromosomes of each oocyte (arrow). Polar body was removed during preparation. ( $\times 600$ ). Inset: light micrograph of the same oocytes with a polar body prior to fixation. ( $\times 100$ ).
- (G) Phase micrograph showing two metaphase II figures of the fused GV+GVBD oocyte pairs cultured for 24h after PEG treatment. Left figure shows nuclear heteropyknes (arrows) after two polar body extrusions and right shows two separate arrangement (arrow) of typical meiotic metaphase. ( $\times 600$ ). Inset: light micrograph of the fused GV+GVBD oocytes showing two polar bodies. Note the opposite direction of each polar body extrusion. ( $\times 100$ ).
- (H) Phase micrograph showing a fused GV+GVBD oocytes cultured for 10h after PEG treatment. The typical anaphase arrangement of the meiotic spindle as shown consists of two groups of chromosomes from each oocyte and shows larger in size than that of normal anaphase oocyte.



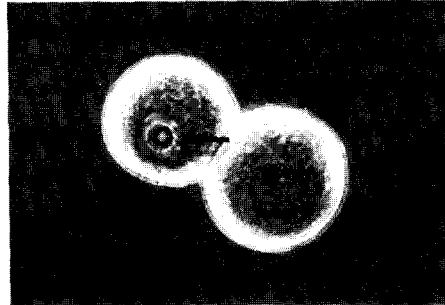
A



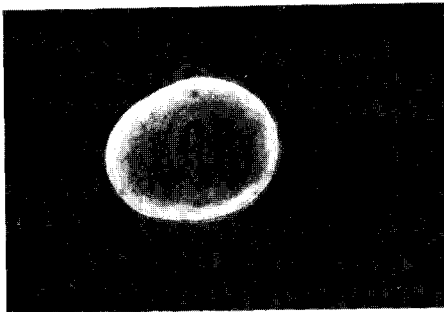
B



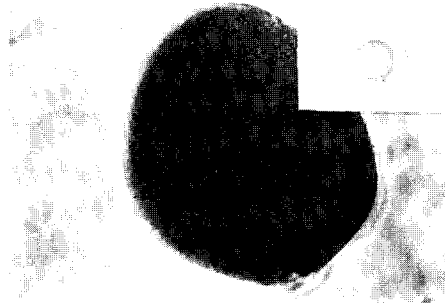
C



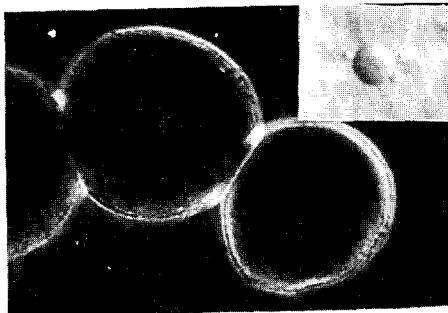
D



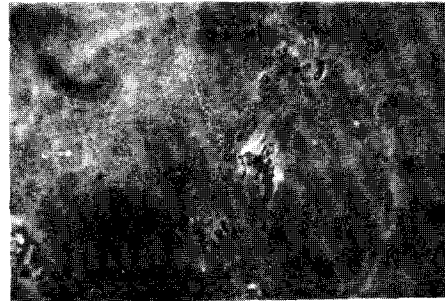
E



F



G



H