

體外成熟 牛卵胞卵의 體外受精과 發達에 關한 研究  
II. 抗卵丘細胞 抗體가 牛卵胞卵의 體外成熟에 미치는 影響

朴世必·金恩永·鄭炯敏·朴欽大\*·金鍾培·鄭吉生

建國大學校 畜產大學

Studies on *In Vitro* Fertilization and Development of Bovine  
Follicular Oocytes Matured *In Vitro*

II. Effect of Anti-Cumulus Cell Antibody on *In Vitro*  
Maturation of Bovine Follicular Oocytes

Park, S.P., E.Y. Kim., H.M. Chung., H.D. Park\*, J.B. Kim and K.S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were carried out to investigate the effect of rabbit anti-bovine cumulus cell antibodies on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes.

Antisera to bovine cumulus cell were produced Japanese Ginat rabbit by repeated immunization of intact or solubilized bovine cumulus cell and purified by ammonium sulfate precipitation and Sepharose CL-4B protein-A affinity chromatography. The bovine cumulus cell-specific antibodies were confirmed by indirect ELISA.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. The titer of the antibodies to cumulus cell determined by indirect ELISA using intact or solubilized bovine cumulus cell coated plates was very high in both intact and solubilized cumulus cells. Namely, the optical density at 1:12,800 dilution of antibodies was still significantly higher than that of non-immunized control serum.
2. When the follicular oocytes were treated with antibody to intact cumulus cells, the maturation rate of cumulus compacted and removed oocytes was ranged 47.6 to 59.1%. These value is significantly lower( $p<0.05$ ) than that(78.8%) of follicular oocytes cultured without the antibody.
3. The maturation rate of cumulus compacted and removed oocytes treated with antibody to solubilized cumulus cells was ranged 46.7 to 59.1%, significantly lower( $p<0.05$ ) than that(82.1%) of oocytes cultured in antibody free medium.

From above mentioned results, it could be said that cumulus cells promote nuclear maturation of follicular oocytes and that the beneficial effect of cumulus cells to the oocyte maturation is inhibited by the action of antibody to cumulus cells.

---

\* 大邱大學校 工科大學 (College of Engineering, Dae-Gu University)

## I. 緒論

卵巢의 卵胞에서 回收된 卵胞卵을 적절한 條件下에서 培養하면 排卵直前의 卵胞卵(Metaphase II)의 상태로 成熟된다는 사실이 確認된 이래(Pincus와 Enzman, 1935), 많은 사람들의 研究에 의해, 대부분의 다른 哺乳動物 卵胞卵도 적절한 배지에서 培養하면 受精 可能한 段階에 까지 成熟할 수 있다는 사실이 確認되었다(Edward, 1962; Foote와 Thibault, 1969; Sreenan, 1970; Hunter, 1972; Armstrong, 1989).

그러나 未成熟卵胞卵을 體外에서 成熟, 受精시켜 培養할 경우 精子頭部가 雄性前核으로 膨化하는 比率이 낮으며(Niwa 등, 1976; Thibault, 1977; Leibfried와 Bavister, 1983; Leibfried-Rutledge 등, 1987), 雄性前核으로 發達하더라도 卵割率에 낮고 胚發達率 및 產子率도 低調한 것으로 報告되고 있다(Cross와 Brinster, 1970; Niwa 등, 1976; Moor와 Trounson, 1977).

이러한 現象은 卵胞卵의 細胞質成熟이 核成熟을 따르지 못하는 데에 起因하는 것으로 여겨지고 있다(Thibault, 1977; Leibfried와 Bavister, 1983).

이러한 現象을 克服하기 위하여, 卵胞卵의 培養液에 體外成熟에 관련된 각종 hormone(Critser 등, 1986; Lu 등, 1987; Utsumi 등, 1989), 發情期の 母體血清(Sanbuissho와 Threlfall, 1985; Lu 등, 1987) 및 卵丘細胞(Kennedy와 Donahue, 1969; Robertson와 Baker, 1969; Cross와 Brinster, 1970; Goto 등, 1989; Fukuda 등, 1990)등을 添加하면 未成熟 卵胞卵의 體外成熟과 受精 및 受精卵의 胚發生 成績이 改善된다는 報告가 있다.

또 생쥐卵자의 경우, 卵丘細胞로 둘러싸인 卵자가 卵丘細胞가 除去된 卵子보다 受精率에 더 높고(Schroeder와 Eppig, 1984), 卵丘細胞가 存在함으로써 體外培養時에 일어나는 透明帶의 "hardening"도 抑制된다는 報告도 있다(DeFelici와 Siracusa, 1982). 이러한 報告들은 다같이 卵丘細胞가 卵胞卵의 成熟을 促進한다는 것을 示唆한다.

이러한 示唆를 確認하기 위하여 本 研究에서는 牛卵丘細胞에 대한 抗卵丘細胞 抗體(Rabbit anti-bovine cumulus cell antibody)를 製造하고, 그것을 牛卵胞

卵에 處理하여 卵丘細胞가 牛卵胞卵의 體外成熟에 미치는 影響을 檢討하였으므로 그 結果를 報告한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物

卵胞卵은 屠畜場(宇星農場)에서 屠殺된 Holstein 成牝牛로부터 回收하였고, 抗卵丘細胞抗體는 4~5個月齡의 Japanese Giant 種의 雄性토끼를 供試하여 生産하였다.

### 2. 培養液

卵胞卵의 回收 및 體外成熟을 위해서는 TCM 199 (Gibco Co.)에 Na-pyruvate(0.11g/l)와 Gentamycin(0.2mg/ml)을 添加한 것을 基礎培養液으로 使用하였다. 이 基礎培養液에 卵胞卵 回收을 위해서는 25 mM HEPES(Sigma Co.)를, 體外成熟을 위해서는 1 $\mu$ g/ml의 FSH(Sigma Co.), 2 IU/ml의 hCG(Sigma Co.) 및 1 $\mu$ g/ml의 Oestradiol-17 $\beta$ (Sigma Co.)를 添加하여 使用하였다.

이들 培養液의 pH는 7.2~7.4, 삼투압은 285~290 mOsmol/kg으로 調整하였으며 使用直前에 0.22 $\mu$ m의 membrane filter(Gelman, Germany)를 使用하여 除菌한 다음 10ml씩 分注하여 4°C에서 保管하면서 使用하였다.

### 3. 卵胞卵의 回收

Holstein 成牝牛의 卵巢를 屠殺直後에 切取하여 100 IU/ml의 penicillin G와 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate를 含有한 38~39°C의 生理食鹽水가 들어 있는 保溫瓶으로 옮겨 2時間이내에 實驗室까지 운반하였다. 이어 20gauge의 注射針이 부착된 10ml 注射器를 使用하여 2~6mm의 可視卵胞로부터 卵丘細胞가 密集된 卵胞卵을 回收하였다.

### 4. 抗卵丘細胞抗體의 生産

卵丘細胞를 回收하기 위하여 直徑 1.5cm 이상의 成熟卵胞로부터 回收된 卵胞卵을 0.1% hyaluronidase 溶液으로 處理한 다음 新鮮 培養液으로 3회 遠心分離함으로써 卵丘細胞를 回收하였다. 이렇게 回收된 免疫原으로서의 卵丘細胞는 無處理 狀態나 혹은 73°C에서 20

分間 熱處理를 實施하여 溶解된 狀態로 使用하였다.

Primary injection 을 위해 50개의 卵子로부터 얻어진 卵丘細胞 (protein content : approximately 200  $\mu$ g)가 含有된 PBS buffer와 Freund's Complete Adjuvant (Sigma Co., USA)를, booster injection 으로는 同量의 卵丘細胞가 含有된 PBS buffer와 Freund's Incomplete Adjuvant 를 각각 1:1 (v/v)로 混合하여 2週 間隔으로 3회에 걸쳐 雄性토끼에 皮內注射한 후 1주일째에 test bleeding 을 實施하여 間接 酵素免疫分析法으로 抗卵丘細胞抗體의 存在를 確認하였으며, 最終적으로 한번 더 booster injection 後 6일째에 採血하여 4°C에서 하룻밤 定置시킨 다음 2,500rpm 에서 30分間 遠心分離하여 抗血清을 分離하였다.

이어 0.22 $\mu$ m의 membrane filter 로 濾過한 다음 사용 직전까지 -20°C에서 保管하였다. 對照血清으로는 抗體生產을 實施하기 이전에 同一한 토끼에서 採取한 血清을 使用하였다.

#### 5. 抗卵丘細胞抗體의 確認

間接酵素免疫分析法 (indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; ELISA)에 의해 抗卵丘細胞抗體의 生成 與否를 確認하였다. 즉, 無處理卵丘細胞의 endogeneous peroxidase 를 除去하기 위하여 卵丘細胞를 70% ethanol (v/v)에 10分, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 含有된 methanol (v/v)에 10分 그리고 70% ethanol (v/v)에서 10分間씩 연속적으로 處理하였다.

無處理 혹은 熱處理卵丘細胞를 紫外線 吸光度 (ultra-violet absorption)를 利用한 蛋白質 濃度 測定方法 (Alan Johnstone 과 Robin Thorpe, 1982)에 따라 濃度を 換算한 후, 5 $\mu$ g/ml의 濃도로 調整하여 polyvinyl microtiter plate 의 각 well 에 100 $\mu$ l씩 分注, 4°C에서 하룻밤 被覆시킨 다음 3% BSA-PBS 로 4°C에서 1時間 blocking 하였다.

이어 抗血清과 對照血清을 1:100~1:12,800으로 double dilution 하여 2時間동안 反應시킨 후 1:500으로 稀釋된 Goat anti-rabbit IgG-HRP (Bio-yeda, Israel)를 添加하여 2時間동안 反應시켰다. 또한 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v)와 0.04% O-phenylene diamine (w/v)을 含有한 0.15M Citrate-phosphate 를 30分間 反應시켜 490nm에서 ELISA Reader (Dynatech, USA)로 O.D. (Optical density)價를 測定하였다.

#### 6. 抗卵丘細胞抗體의 製法

1) Ammonium Sulfate Precipitation 에 의한 精製

5ml의 抗血清에 100%의 Ammonium Sulfate 飽和溶液을 4ml 添加하여 (Cooper, 1977) 4°C에서 1時間 攪拌시킨 후 3,000 $\times$ g에서 30分間 遠心分離하였다. 沈澱物은 PBS buffer (pH 7.2)로 4°C에서 48時間 透析 (M.W. 3,000 BRL)한 다음 ultrafiltrator (M.W. 10,000 Millipore)로 濃縮시켰다.

2) Sepharose CL-4B protein-A affinity column 에 의한 IgG의 分離

濃縮된 劃分을 column (1.8 $\times$ 8cm)에 加注하여 상온에서 反應시킨 후 PBS buffer (pH 7.2)로 吸光度가 0으로 떨어질 때까지 充分히 洗滌한 다음 1.0M acetic acid (pH 4.0)로 分當 2ml씩 溶出시켰다.

溶出된 劃分은 Spectrophotometer (Spectronic -21, Bausch & Lomb, Germany)로 吸光度 280mm에서 濃度を 確認하였으며 PBS buffer (pH 7.2)로 4°C에서 透析한 다음 ultrafiltrator로 濃縮시켜 作用하였다.

#### 7. 卵胞卵의 體外成熟 및 成熟度 調査

前述한 體外成熟用 培養液에 精製된 抗體가 1.25~5.0% 含有되어 있는 100 $\mu$ l 小滴을 petri dish 에 滴下한 다음 流動 paraffin oil로 被覆하고 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 培養器내에서 5~6時間 平衡시킨후 이 培養液 小滴에 回收된 卵胞卵을 沈漬하여 24~26時間 培養하였다.

培養이 끝난 卵胞卵은 0.1% aceto-orcein (1mg/ml orcein in 45% acetic acid)으로 染色을 實施하여 卵胞卵의 核成熟度を 判別하였다 (Toyoda 와 Chang, 1974 ; Park 등, 1989).

### III. 結果 및 考察

#### 1. 間接酵素免疫分析法에 의한 抗卵丘細胞 抗體의 力價 調査

抗原인 牛卵丘細胞를 coating 한 후 抗血清과 對照血清을 1:100~1:12,800으로 稀釋, 각 well 에 分注하여 反應시킨 다음 ELISA Reader 로 490nm에서 O.

Table 1. Titration of anti-cumulus cell antibody by indirect ELISA

Sample	Optical density of antiserum at different dilution rate							
	×100	×200	×400	×800	×1,600	×3,200	×6,400	×12,800
A	1.10	1.09	0.97	0.91	0.87	0.84	0.83	0.78
B	1.04	0.99	0.98	0.90	0.97	0.96	0.86	0.74
C	1.41	1.33	1.25	1.20	1.07	0.90	0.66	0.33
D	1.45	1.34	1.40	1.19	1.39	0.88	0.62	0.57
E	0.27	0.05	0.05	0.01	0.06	0.06	0.08	0.01
F	0.23	0.17	0.16	0.02	0.11	0.26	0.04	0.08

Ag : Intact cumulus cell

Ab : A, B : Rabbit anti-bovine intact cumulus cell

C, D : Rabbit anti-bovine solubilized cumulus cell

E, F : Control serum

D. 價를 測定한 結果는 Table 1에서 보는 바와 같았다.

Table 1에서 보는 바와 같이 對照區의 血清 E, F의 O.D. 價는 處理區인 A-D의 그것과 비교하여 有意하게 낮았으며 이러한 結果로 보아 無處理卵丘細胞와 溶解卵丘細胞 다같이 抗體를 生成하였음을 確認할 수 있다.

한편, IgG 만을 分離, 精製한 후, 無處理抗原과 溶解抗原에 대한 抗體 生成 與否를 測定한 結果는 Table 2에서 보는 바와 같았다.

즉, Table 2에서 보는 바와 같이 分離, 精製後 無處理抗原에 대한 抗體反應性은 Table 1에 提示

된 O.D. 價와 類似하였다. 또, 溶解抗原에 대한 抗體反應性은 無處理抗原에 대한 反應性보다 약간 높았지만 稀釋濃度가 증가함에 따라 反應性도 점차 낮아지는 傾向을 보여 精製된 抗體의 使用 可能性을 提示하였다.

이상의 結果를 綜合하여 檢討해 볼 때 抗原인 無處理卵丘細胞와 溶解卵丘細胞 다같이 抗體를 生成시켰으며 抗原-抗體 反應面에 있어서 兩者가 비슷한 反應정도를 나타내는 것을 알 수 있다.

## 2. 抗卵丘細胞抗體의 精製

精製된 抗卵丘細胞抗體(IgG)를 供試하여 Spectro-

Table 2. Titration of purified anti-cumulus cell antibody by indirect ELISA

Sample	Optical density of antiserum at different dilution rate							
	×100	×200	×400	×800	×1,600	×3,200	×6,400	×12,800
A	0.96	0.85	0.85	0.84	0.85	0.73	0.83	0.74
B	0.88	0.76	0.84	0.82	0.77	0.78	0.82	0.70
C	1.03	1.00	0.96	0.85	0.86	0.86	0.73	0.83
D	0.96	0.92	0.88	0.83	0.85	0.84	0.78	0.81
E	1.17	1.00	1.05	1.04	0.85	0.76	0.78	0.60
F	1.04	1.00	0.99	1.01	0.80	0.71	0.74	0.67
G	1.38	1.20	0.90	0.66	0.67	0.76	0.51	0.44
H	1.32	1.19	0.88	0.62	0.63	0.71	0.70	0.46

Ag : A-D : Intact cumulus cell, E-H : Solubilized cumulus cell

Ab : A, B, E, F : Rabbit anti bovine intact cumulus cell

C, D, G, H : Rabbit anti bovine solubilized cumulus cell

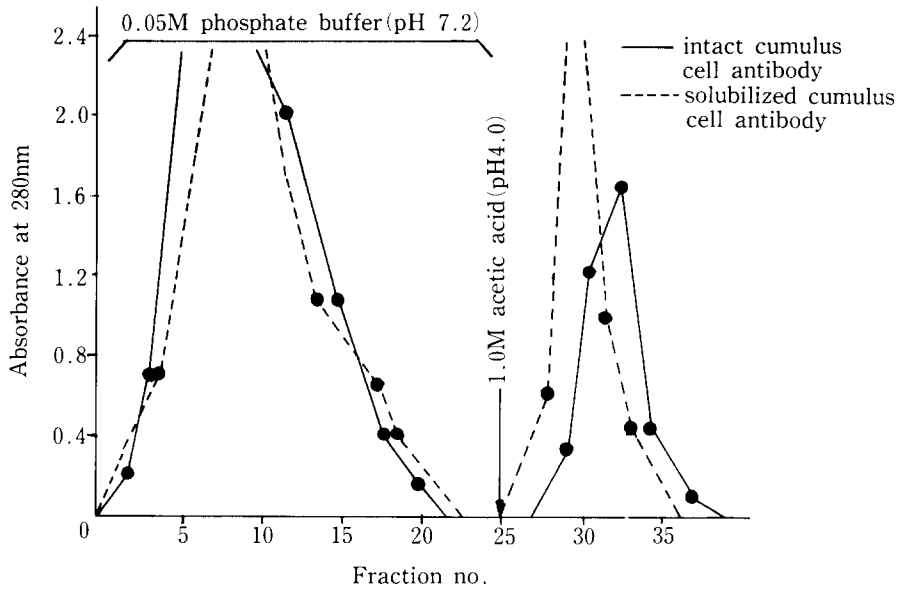


Fig 1. Chromatography of rabbit antisera on a protein A-Sepharose affinity column. 0.05M phosphate buffer(pH 7.2) was used as a washing buffer and 1.0M acetic acid(pH 4.0) was added to elute the bound IgG.

photometer (Spectronic-21, Bausch & Lomb)로 280nm 에서 O.D. 價를 測定한 結果는 Fig. 1에서 보는 바와 같았다.

Fig. 1에서 Fraction No. 27~38 (實線)과 25~37 (點線)의 O.D. 價는 각각 無處理卵丘細胞에 대한 抗血清과 溶解卵丘細胞에 대한 抗血清으로부터 抗體를 分離해 낼 때, 精製된 IgG의 O.D. 價를 나타내는 것으로서 O.D. 價가 最高值를 나타내고 있는 Fraction No. 는 각각 29~31 (over)과 33 (1.19mg/ml)이었다.

이러한 結果는 本 實驗에서 採擇한 方法에 의하여 抗卵丘細胞抗體가 生成되었다는 것을 確認하는 것으로 解析된다.

### 3. 抗卵丘細胞抗體 處理를 받은 卵胞卵의 體外 成熟

精製된 抗體가 1.25~5.0% 含有되어 있는 體外 成熟用 培養液내에서 卵胞卵을 24~26時間 培養하면서 體外成熟을 誘導하였을 때의 結果는 Table 3과 4에서 보는 바와 같았다.

Table 3에서 보는 바와 같이 卵丘細胞가 치밀하게 附着되어 있는 卵胞卵과 그것이 除去된 卵胞卵

에 1.25~5.0%의 精製된 無處理卵丘細胞에 대한 抗體를 處理한 結果, 最終 成熟段階인 Metaphase II 段階에 까지 發達한 것은 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵의 경우 對照區는 78.8%로서 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 47.6~59.1%보다 有意하게 높았다 ( $p < 0.05$ ).

한편, Table 4에서 보는 바와 같이 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵과 그것이 除去된 卵胞卵에서 1.25~5.0%의 溶解卵丘細胞에 대한 抗體를 處理한 結果, 最終 成熟段階인 Metaphase II 段階에 까지 發達된 卵胞卵의 比率는 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵의 對照區가 82.1%로서, 卵丘細胞가 除去된 경우의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 46.7~59.1%보다 有意하게 높았다 ( $p < 0.05$ ).

이러한 結果는 添加된 抗體가 卵胞卵 주변을 둘러싸고 있는 卵丘細胞와 抗原-抗體反應을 일으켜 卵丘細胞로부터 分泌되는 代謝動物 즉, Glycosaminoglycans (GAGs)의 分泌를 (Eppig, 1979; Ball 등, 1980) 抑制하므로 그 結果 卵丘細胞와 卵子간의 gap junction의 分離 (Moor 등, 1980; Racowsky, 1985; Moltik 등, 1986)가 抑制되어 減數分裂이 抑制되는 것으로 생각된다.

**Table 3. Effect of rabbit anti-bovine intact cumulus cell antibody on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes with or without cumulus cell mass**

Oocytes	Antibody (%)	No. of oocytes examined	Nuclear stages						
			GV (%)	GVBD (%)	Met I (%)	Ana I (%)	Tel I (%)	Met II (%)	Deg (%)
With compacted cumulus cell	0	33			3 (9.1)		4 (12.1)	26 (78.8) *	
	1.25	44			6 (13.6)	7 (15.9)	5 (11.4)	26 (59.1)	
	2.50	43			8 (18.6)	5 (11.6)	3 (7.0)	25 (58.1)	2 (4.7)
	5.00	45	1 (2.2)	3 (6.7)	9 (20.0)	1 (2.2)	4 (8.9)	23 (51.1)	4 (8.9)
Without <sup>a)</sup> cumulus cell	0	35			9 (25.7)	1 (2.9)	6 (17.1)	18 (51.4)	1 (2.9)
	1.25	41		1 (2.4)	7 (17.1)	4 (9.8)	5 (12.2)	21 (51.2)	3 (7.3)
	2.50	44		2 (4.5)	8 (18.2)	3 (6.8)	8 (18.2)	21 (47.7)	2 (4.5)
	5.00	42		1 (2.4)	10 (23.8)	3 (7.1)	7 (16.7)	20 (47.6)	1 (2.4)

<sup>a)</sup>Cumulus cell removed with pipetting

\*p<0.05

**Table 4. Effect of rabbit anti-bovine solubilized cumulus cell antibody on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes with or without cumulus cell mass**

Oocytes	Antibody (%)	No. of oocytes examined	Nuclear stages						
			GV (%)	GVBD (%)	Met I (%)	Ana I (%)	Tel I (%)	Met II (%)	Deg (%)
With compacted cumulus cell	0	28			2 (7.1)		3 (10.7)	23 (82.1) *	
	1.25	44			10 (22.7)	4 (9.1)	4 (9.1)	26 (59.1)	
	2.50	44			9 (20.5)	3 (6.8)	6 (13.6)	24 (54.5)	2 (4.5)
	5.00	45	3 (6.7)		9 (20.0)	2 (4.4)	4 (8.9)	22 (48.9)	5 (11.1)
without <sup>a)</sup> cumulus cell	0	32			7 (21.9)		7 (21.9)	6 (50.0)	2 (6.3)
	1.25	41			5 (12.2)	6 (14.6)	9 (22.0)	20 (48.8)	1 (2.4)
	2.50	46		3 (6.5)	8 (17.4)		8 (17.4)	24 (52.1)	3 (6.5)
	5.00	45		2 (4.4)	12 (26.7)	1 (2.2)	5 (11.1)	21 (46.7)	4 (8.9)

<sup>a)</sup>Cumulus cell removed with pipetting

\*p<0.05

이상의 결과를 종합하여考察할 때, 卵丘細胞는 未成熟 卵胞卵의 核成熟에 대하여 肯定的인 影響을 미치는 것으로 判斷된다.

#### IV. 摘要

本 研究에서는 牛卵丘細胞에 대한 抗血清을 製造하여

Sepharose CL-4B protein-A affinity column 에 의해 IgG 만을 分離, 精製한 다음 이 抗體를 卵胞卵에 處理하여 卵丘細胞가 體外成熟에 미치는 影響을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 無處理卵丘細胞와 溶解卵丘細胞를 抗原으로 處理한 個體로부터 血清을 採取하여 間接酵素免疫分析法으로 抗體 形成與否를 確認한 結果, 두 가지 形態의 抗原이 다같이 抗卵丘細胞抗體를 生産하는 것으로

確認되었다.

2. 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵과 除去된 卵胞卵에 無處理卵丘細胞에 의해 生成된 抗體를 處理한 結果, Metaphase II段階에까지 發達한 卵胞卵은, 卵丘細胞가 附着된 경우의 對照區는 78.8로서 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 47.6~59.1%보다 有意하게 높았다( $p < 0.05$ ).
3. 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵과 除去된 卵胞卵에 溶解卵丘細胞에 의해 生成된 抗體를 處理한 結果, Metaphase II段階에까지 發達한 卵胞卵은, 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵의 對照區는 82.1%로서 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵의 對照區를 包含한 모든 抗體 處理區의 46.7~59.1%보다 有意하게 높았다( $p < 0.05$ ).

이상의 結果를 綜合하여 考察할 때 卵丘細胞는 卵胞卵의 核成熟을 促進하는 機能이 있으며, 이러한 機能은 抗卵丘細胞抗體에 의해 抑制된다는 것을 알 수 있다.

## V. 引用文獻

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax and N.L. First. 1983b. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 19: 112.
2. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. reprod., 28: 717-725.
3. Critser, E.C.S., M.L. Leibfried-Lutledge, W.H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology, 25: 150 (Abstract).
4. Cross, P.C. and R.L. Brinster. 1970. *In vitro* development of mouse oocytes. Biol. Reprod., 3: 298-307.
5. DeFelici, M. and G. Siracusa. 1982. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. Gamete Res., 6: 107-113.
6. Edwards, R.G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature. 208: 349.
7. Foote, W.E. and C. Thibault. 1969. Recherches experimentales sur la maturation *in vitro* des oocytes de truie et de veau. Anns. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 9: 329.
8. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 42: 114-119.
9. Hensleigh, H.C. and A.G. Hunter. 1985. *In vitro* maturation of bovine enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. J. Dairy Sci., 68: 1456-1462.
10. Iritani, A. and K. Niwa. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* cattle follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert., 50: 119-121.
11. Kennedy, J.F. and R.P. Donahue. 1969. Human oocytes: maturation in chemically defined media. Science. 164: 1292-1293.
12. Leibfried, M.L. and B.D. Bavister. 1983. Fertilizability of *in vitro* oocytes from golden hamster. J. Exp. Zool., 226: 481-485.
13. Leibfried-Rutledge M.L., E.S. Critser, W. H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. Biol. Reprod., 36: 376-383.
14. Lu, K.H., M.P. Boland, T.F. Crosby and I. Gordon. 1987. *In vitro* fertilization and cattle oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 27: 251 (Abstract).
15. Moor, R.M. and A.O. Trounson. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J.

- Reprod. Fert., 49 : 101-109.
16. Pincus, G. and E.U. Enzman. 1935. The comparative behave of mammalian eggs *in vitro*. 1. the activation of ovarian eggs. J. Exp. Med., 62 : 665-675.
  17. Robertson, J.E. and R.D. Baker. 1969. Role of female sex steroids as possible regulators of oocytes maturation. Second Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, University of California, Davis : 57 (Abstract).
  18. Sanbuissho, A. and W.R. Threlfall. 1985. The effect of estrus cow serum on the maturation and fertilization of bovine follicular oocytes *in vitro*. Theriogenology, 23 : 226.
  19. Schroeder A.C. and J.J. Eppig. 1984. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. Dev. Biol., 102 : 493-497.
  20. Sirard, M.A., J.J. Parrish, C.B. Ware, M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1989. The culture of bovine oocytes to obtained developmentally competent oocytes. Biol. Reprod., 39 : 546-552.
  21. Thibault, C. 1977. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? J. Reprod. Fert., 51 : 1-15.
  22. Toyoda, Y. and M.C. Chang. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. J. Reprod. Fert., 36 : 9-22.
  23. Vanderhyden, B.C. and D.T. Armstrong. 1989. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. Biol. Reprod., 40 : 720-728.
  24. 박세필, 김은영, 정형민, 정길생. 1990. 체외성숙 우난포란의 체외수정과 발달에 관한 연구. I. 난구세포가 체외성숙 우난포란의 체외수정과 발달에 미치는 영향. 한국가축번식학회지. 14(1) : 1-8.
  25. 박세필, 박태균, 윤산현, 고대환, 정길생. 1989. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구. III. 체외성숙 우난포란의 체외수정과 발달. 한국가축번식학회지. 13(2) : 105-112.