

抗透明帶 抗體의 特性에 關한 研究 II. 抗透明帶 抗體가 돼지卵子和 생쥐卵자의 體外受精에 미치는 影響

金恩永 · 朴世必 · 鄭炯敏 · 鄭吉生 · 金鍾培

建國大學校 畜產大學

Studies on the Characteristics of Anti-Zona Antibody II. Effect of Anti-Zona Antibody on Fertilization of Porcine and Mouse Eggs *In Vitro*

Kim, E.Y., S.P. Park, H.M. Chung, K.S. Chung and J.B. Kim
College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were undertaken as a basic study to develop immunocontraceptive vaccine and to understand the role of zona pellucidae in early fertilization process by investigating the effect of monoclonal and polyclonal antibody to porcine zona pellucidae and polyclonal antibody to mouse zona pellucidae on the fertilization of porcine and mouse eggs *in vitro*.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. Treatment of porcine and mouse eggs with undiluted anti-zona serum produced intense precipitation layer on the porcine and mouse zonae, respectively, thus resulting in the total inhibition of sperm adherence on surface of zona.
2. *In vitro* fertilization of eggs pre-treated with 0.3~10% of various antibodies was examined, and resulting in that 5 and 10% of rabbit polyclonal antibodies to porcine zona inhibited completely both *in vitro* fertilization and polyspermy of porcine eggs while monoclonal to porcine zona and rabbit polyclonal antibody to mouse zona did not inhibit *in vitro* fertilization but monoclonal antibody reduced the rate of polyspermy compared to that of control group. Almost the same results were obtained in the study on the effect of anti-zona serum on *in vitro* fertilization of mouse eggs.

I. 緒 論

透明帶는 哺乳動物의 卵자를 둘러싸고 있는 extra-cellular structure로서 대부분이 糖蛋白(91%)으로 構成되어 있으며 受精과 初期胚 發達에 重要な 構造物이다. 여기에는 種特異의 精子受容體가 存在하여 受精 初期段階에 精子의 結合, 浸透가 이곳을 통하여 이루어

지는 것으로 알려져 있다(Gwatkin과 Williams, 1976, 1978b). 그러나 透明帶에 대하여 製作된 抗透明帶抗體는 受精을 遮斷하거나 抑制시킬 수 있을 뿐만 아니라(Oikawa와 Yanagiwachi, 1975; Gwatkin 등, 1977; Tsunoda와 Chang, 1978) 他種의 透明帶와 交叉反應한다고 報告되고 있다(Sacco 등, 1981a; Sacco, 1978).

最近에 human 과 돼지의 透明帶가 免疫學的으로 類似性을 지니고 있다는 것이 밝혀져 돼지 透明帶에 대한 研究가 활발히 進行되고 있다. 돼지 透明帶는 分子量이 明確한 4個의 heterologous glycoprotein 즉, 82,000(ZP I), 61,000(ZP II), 55,000(ZP III) 및 21,000(ZP IV)으로 構成되어 있고, 免疫學的인 面에서 特性이 多樣하여(Dunbar 와 Raynor, 1980; Sacco 등, 1983) 單一클론抗體의 경우 種間交叉反應(Species cross reactivity)에서 顯著的한 差異가 있으며(Isojima 등, 1981), 2D-IEF/SDS-PAGE에서 는 분자량 40,000~120,000 사이에 3個의 주된 構成分子들이 相異한 電荷를 띤 樣狀으로 나타난다고 報告되고 있다(Hedrick 과 Wardrip, 1980; Subramanian 등, 1981; Sacco 등, 1981b).

또한 Chromatography 와 electroelution 에 의해 分離된 ZP III는 人間에 있어서 避妊 Vaccine 開發의 標識抗原으로서 使用 가능성을 示唆하였고(Yurewicz, Sacco 와 Subramanian, 1983, 1985; Dunbar 와 Raynor, 1980), Gel filtration 과 Ion-exchange Chromatography 에 의해 精製된 透明帶로 抗體를 製作하여 種間交叉反應性과 避妊 가능성을 檢討한 結果, 그 程度는 順次的으로 human > squirrel monkey > rabbit > rat > mouse > 였으며 human, monkey 및 rabbit 의 透明帶에는 돼지와 類似한 抗原決定基가 存在한다는 것이 밝혀졌다(Sacco, 1981).

本 實驗에서는 避妊 vaccine 의 開發과 透明帶의 精子受容體 構造糾明을 위한 基礎研究로서 돼지 透明帶에 대한 單一클론抗體와 複合抗體가 受精過程에 미치는 影響을 檢討, 比較하고 생쥐 透明帶와의 交叉反應을 檢討해 보고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試材料

(1) 돼 지

1) 培養液

卵子處理用 基礎培養液으로는 TCM 199(Gibco, CAT NO. 400-1100)에 Na-Pyruvate 0.11g/l, Gentamycin 0.2mg/ml을 添加한 것을 사용하였으며, 卵巢로부터 卵胞卵의 回收와 體外成熟을 誘導하기 위해서는 金(1990)의 方法에 準하여 製造된 培養液을 사용하였다.

精子處理用 基礎培養液으로는 BO液(Brackett 와 Oliphant, 1975)을 사용하였는데 精子洗滌用 培養液에는 5mM caffeine을 添加한 것을, 受精能獲得과 體外受精用 培養液은 基礎培養液에 5mg/ml의 BSA 와 2.5mM caffeine을 添加한 것을 사용하였다.

이들 모든 培養液은 pH 7.2~7.4, 滲透壓 285~290 mOsmol/kg으로 調整하여 사용하였으며 사용직전에 0.2 μ m의 membrane filter(German Science Inc., USA)를 사용하여 除菌한 다음 10ml씩 分注하여 4℃에서 保管하면서 사용하였다.

2) 卵胞卵의 回收

屠殺直後에 切取된 卵巢로부터 卵胞卵을 回收하기 위해서는 金(1990)의 方法에 準하여 實施하였다.

3) 精巢上體 尾部 精子의 回收

屠殺場에서 入手한 精巢를 0.9%의 生理食鹽水로 洗滌한 다음, 精巢上體尾部만을 잘라내어 3ml의 注射器에 附着된 22 gauge 의 注射針을 精巢上體管內腔에 插入하여 精子를 灌流하였다(Lenz 등, 1983).

(2) 생 쥐

1) 培養液

未受精卵의 回收, 培養 및 體外受精에는 T6培養液(Whittingham, 1982)을 使用하였다. 이때 培養液의 pH는 7.8, 滲透壓은 285~290 mOsmol/kg으로 調整하였으며 使用直전에 0.2 μ m millipore filter 로 除菌시킨 후 사용하였다.

2) 多排卵誘起

供試動物로는 年齡 4~6週齡, 體重 20~25g의 ICR 系統의 雌性생쥐를 사용하였으며 5IU의 PMSG와 hCG를 48시간 간격으로 各各 腹腔에 注射함으로써 多排卵을 誘起하였다.

3) 精巢上體 尾部 精子 回收

供試動物로는 年齡 10~12週齡, 體重 25~30g의 雄性생쥐를 사용하여 精巢上體 尾部로부터 精子를 회수하였다.

(3) 抗透明帶抗體

돼지 透明帶에 대한 單一클론抗體와 複合抗體는 돼지 透明帶를 免疫시킨 BALB/C mouse 와 Myeloma cell; SP2/0-Ag14을 融合하여 製作된(劉 등, 1989) 것과 金(1990)의 方法에 準하여 製作된 것을 각각 사용하였다. 또한 생쥐 透明帶에 대한 複合抗體는 本 實驗室에서 製作된(徐 등, 1987) 것을 사용하였다.

2. 試驗方法

(1) 透明帶 沈澱反應(Precipitation; PPT)

돼지卵자의 경우 採取된 卵核胞期(Germinal Vesicle: GV) 狀態의 未成熟卵胞卵을 39°C, 5% CO₂ 및 95%의 空氣條件을 갖춘 CO₂培養器에서 45~48 시간 培養하여 體外成熟을 誘導하였다. 成熟이 이루어진 卵子(Metaphase II: M II)만을 골라 抗血清과 對照血清내에서 1시간 培養한 후, 新鮮한 培養液으로 5회 洗滌하여 位相差顯微鏡(Leitz, West Germany)下에서 透明帶를 觀察하였다.

생쥐卵자의 경우 多排卵誘起에 의해 回收한 후 37°C, 5% CO₂ 및 95% 空氣條件의 CO₂培養器내에서 前記한 方法과 同一하게 實施하였다.

(2) 精子附着(Sperm attachment)

돼지卵자와 생쥐卵자를 抗血清과 對照血清내에서 1시간 培養시킨 후 新鮮한 배양액으로 5회 洗滌하여 各各의 精子가 含有된 小滴(1.5 × 10⁶ cells/ml)내에서 20 hr 동안 反應시켰다. 이어 新鮮한 배양액으로 1회 洗滌한 후 slide glass에 옮겨서 cover slip으로 덮은 후 位相差顯微鏡하에서 透明帶에 대한 精子의 附着狀態를 觀察하였다.

(3) 體外受精(In vitro fertilization; IVF)

1) 精子의 受精能獲得

돼지의 경우 精巢上體 尾部로부터 採取된 精子를 遠心分離(1,000 rpm × 5 min)에 의하여 BSA 非含有, 5 mM caffeine-BO 액으로 2~3회 洗滌하였다. 이때 最終 遠心分離에 의하여 上層液을 除去한 다음 2.5 mM caffeine과 5mg/ml BSA를 含有한 배양액을 첨가하여 20分間 CO₂培養器내에서 배양함으로써 精子浮遊를 誘導하였다. Petri dish(Falcon Plastic #1006)내에 100 μl(15 × 10⁶ cells/ml)의 精子浮遊液 小滴을 製作한 다음 流動 paraffin oil로 被覆하여 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건인 CO₂배양기내에서 2~3 시간 前培養을 실시함으로써 受精能을 獲得시켰다(Goto 등, 1988)

생쥐의 경우 精巢上體 尾部로부터 採取한 精子는 T6 배양액 400 μl drop 내에서 90분간 배양함으로써 受精能을 獲得시켰다.

2) 體外受精(In vitro fertilization; IVF)

抗血清과 對照血清이 여러 농도별로 함유되어 있는 培養液 小滴을 製作한 다음 paraffin oil로 被覆하여

돼지의 경우 39°C, 생쥐의 경우 37°C의 5% CO₂, 95% 공기조건인 CO₂ 배양기내에서 6시간 이상 平衡을 實施하였다. 體外成熟된 돼지 卵자와 多排卵誘起에 의해 회수된 생쥐卵자는 上記培養液 小滴으로 옮겨 30분간 배양한 다음 신선한 배양액으로 5회 洗滌한 후, 돼지卵자는 受精能을 獲得한 精子가 含有된 精子浮遊液 小滴(15 × 10⁶ cells/ml)으로 옮겨 體外受精을 誘導하였고, 생쥐卵자는 精子濃도가 1~1.5 × 10⁶ cells/ml이 되도록 調整하여 體外受精을 실시하였다.

3) 體外受精 與否判定

돼지卵자는 20 hr, 생쥐난자는 5~6 hr 동안 各各 追加 배양한 후 固定, 染色(1mg/ml orcein in 45% acetic acid)을 실시하여 位相差顯微鏡下에서 受精與否를 判定하였다(Toyoda와 Chang, 1974; Park 등, 1989).

體外受精의 判定基準으로서는 第2極體의 放出, 細胞質내에 侵入한 精子頭部의 膨化와 尾部의 觀察 및 雌雄前核의 確認등을 基準으로 判定하였다(Toyoda와 Chang, 1974; Park 등, 1989).

III. 結果 및 考察

1. 透明帶 沈澱反應과 正字附着 有無確認

透明帶 沈澱反應程度와 精子의 附着有無를 確認하기 위하여 體外成熟이 이루어진 돼지卵자와 多排卵誘起에 의해 회수된 생쥐卵자를 各各의 抗血清과 對照血清에서 1시간동안 배양시켰고, 이어 抗血清을 처리한 돼지卵자와 생쥐卵자를 同種의 精子小滴내에서 20 hr 처리한 후의 결과는 Table 1과 Fig. 1, 2에서 보는 바와 같았다.

돼지卵자에 各各의 抗血清과 對照血清을 처리한 결과 돼지透明帶에 대한 複合抗體만이 透明帶 周邊에 뚜렷한 沈澱現象이 나타나(Fig. 1.A) 이로 인해 透明帶에 對한 精子와의 結合이 遮斷됨을 알 수 있었다(Fig. 2.A). 한편, 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體와 생쥐透明帶에 대한 複合抗體는 沈澱現象이 弱하거나 나타나지 않아(Fig. 1.B, C) 수 많은 精子가 돼지透明帶에 附着되어 있음을 確認할 수 있었다(Fig. 2.B, C).

또한 생쥐卵자에 各各의 抗血清과 對照血清을 처리했을 경우 생쥐透明帶에 대한 複合抗體만이 透明帶 周邊에 뚜렷한 沈澱現象(Fig. 1.F)과 精子와의 結合이 遮

Table 1. Correlation between the ability of anti-zona antisera to inhibit sperm binding and their ability to induce a precipitate on the outer zona surface

Antisera	Porcine		Mouse	
	PPT ^{a)}	Inhibition of sperm adherence	PPT ^{a)}	Inhibition of sperm adherence
RAPZP	++++	Yes	-	No
MAPZP	+	No	-	No
RAMZP	-	No	++++	Yes
CONTROL	-	No	-	No

^{a)} Intensity of precipitation layer formed on surface of zonae :

++++, intense; +++, dense; ++, moderate; +, faint; -, no PPT

斷되었으며 (Fig. 2.F), 그 외의 抗血清과 對照血清에 서는 透明帶에 대한 침전현상이 나타나지 않아 (Fig. 1. D, E) 수 많은 精子가 생쥐 卵子에 附着되어 있음을 確認할 수 있었다 (Fig. 2.D, E). 이러한 결과를 考察하여 볼때 精子結合의 遮斷 및 抑制는 抗透明帶抗體가 透明帶 外部表面에 沈澱物을 형성시켜 (Shivers 등, 1972; Aitken 과 Richardson 1981) 透明帶에 存在하는 種特異的의 精子受容體에 精子가 결합하여 圍卵腔 內로 侵入하는 것을 抗體에 의해서 막을 수 있기 때문 일 것으로 推料된다 (Aitken 과 Richardson, 1981).

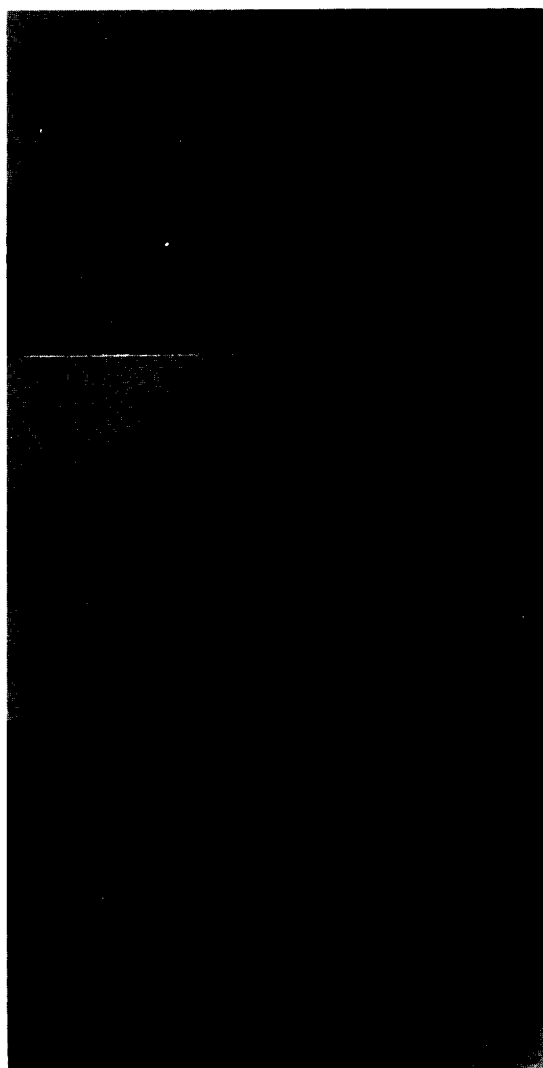
2. 抗透明帶抗體가 생쥐 卵子와 돼지 卵子의 體外受精에 미치는 影響調查

돼지 卵子에 抗透明帶抗體를 處理한 후 *in vitro* 에서 受精시켰을때의 結果는 Fig. 3, Table 2에서 보는 바 와 같았다.

抗血清과 對照血清이 0.3~10%까지 各各 含有된 培養液내에서 體外受精을 실시하였을 때의 受精率과 多精子 侵入率은 對照區에서 各各 50.0~59.6%, 70.0~78.0%였던 반면 돼지 透明帶에 대한 複合抗體는 各各 0~35.5%와 0~58.3%로서 受精率이 낮아짐을 알

Fig. 3. Nuclear stage of porcine eggs fertilized *in vitro*.

- A) Sperm penetration (SP) 6hr after insemination. (X 800)
- B) A porcine egg in Telo II stage. (X 800)
- C) A porcine egg 20hr after insemination, showing female pronucleus (FP) and male pronucleus (MP). (X 800)



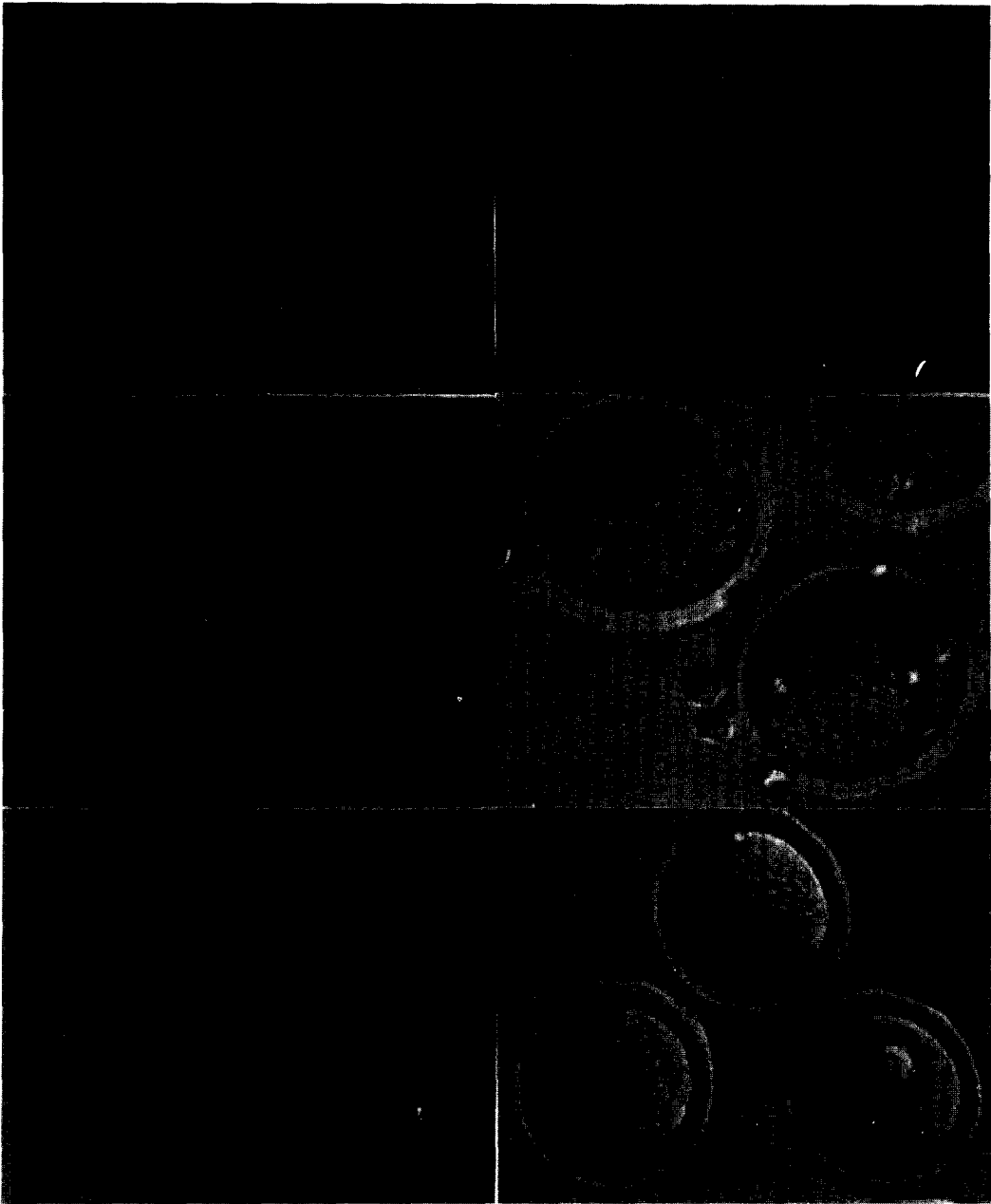


Fig. 1. Precipitation(PPT) layer produced on the surface of porcine and mouse zona by undiluted anti-zona serum.

A,B,C) Porcine zona treated with RAPZP, MAPZP and RAMZP, respectively. Note intense PPT layer(arrow) on surface of pig zona treated with RAPZP(A : $\times 100$) and faint layer(arrow) at surface of MAPZP-treated zona($\times 200$). No PPT layers are visible on surface of RAMZP-treated zona(C).

D,E,F) Mouse zona treated with RAPZP, MAPZP and RAMZP, respectively. Note intense PPT layer(arrow) on surface of mouse zona treated with RAMZP(F) and no PPT layers are visible on surface of RAPZP, MAPZP-treated zona(D : $\times 200$, E : $\times 600$.)

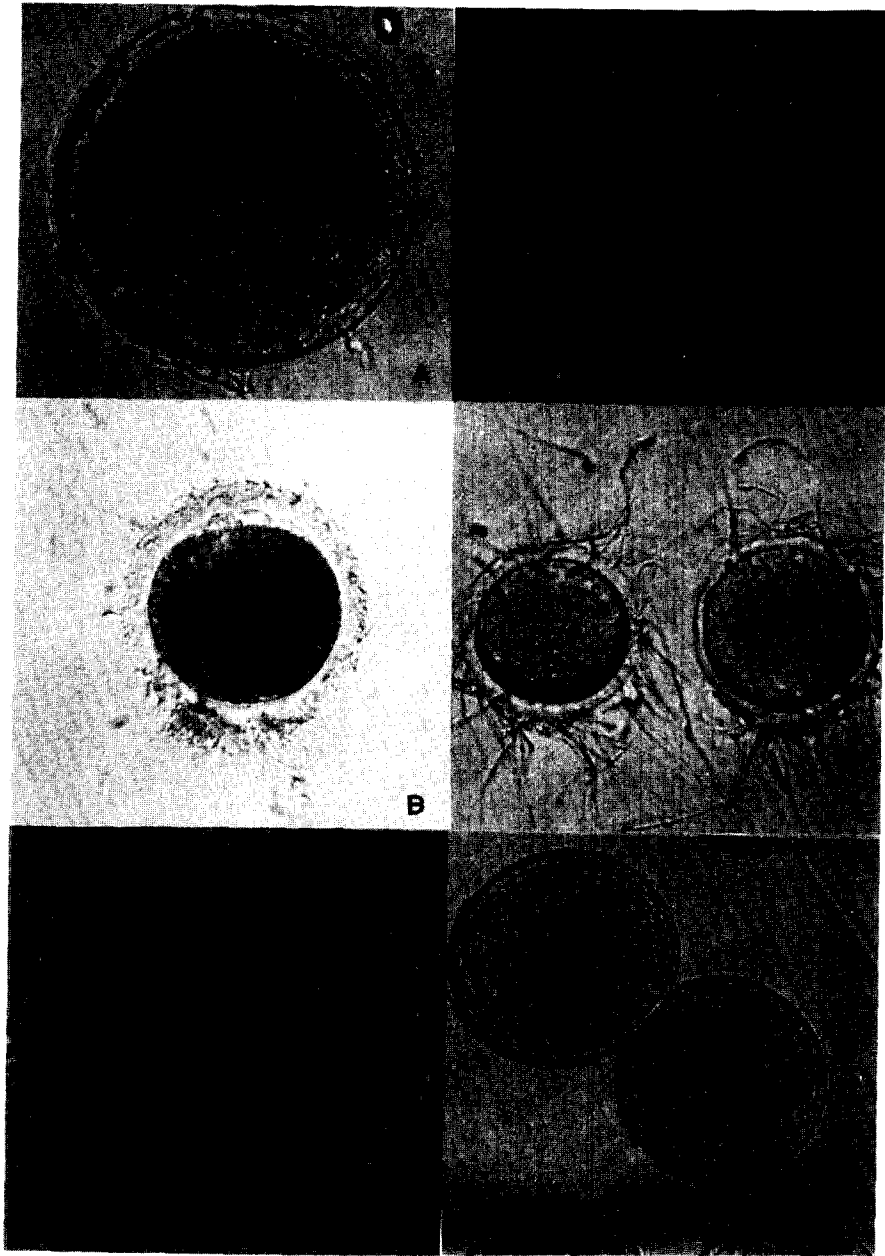


Fig. 2. Effect of anti-zona serum pre-treatment of porcine and mouse on homologous sperm attachment.

A,B,C) Porcine zona treated with RAPZP, MAPZP and RAMZP, respectively. Note numerous sperm attached to MAPZP and RAMZP-treated zona(B: $\times 200$), (C: $\times 400$) while no sperm are attached to RAPZP-treated zona(A: $\times 400$)

D,E,F) Mouse zona pre-treated with RAPZP, MAPZP and RAMZP, respectively. RAPZP MAPZP-treated and MAPZP-treated oocytes each have numerous sperm attached to zona(D,E: $\times 400$). Arrow designates PPT layer on RAMZP-treated oocytes(F: $\times 450$)

Table 2. Effect of anti-zona sera on in vitro fertilization of porcine eggs.

Antisera	Conc. of serum (%)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fert.	No. (%) of polyspermic oocytes
Control	10	45	25(55.5)	18(72.0)
	5	60	30(50.0)	21(70.0)
	2.5	52	31(59.6)	23(74.2)
	1.2	43	25(58.1)	19(76.0)
	0.6	50	27(54.0)	21(77.7)
	0.3	55	30(54.5)	24(78.0)
	RAPZP	10	66	0(0)
5		70	0(0)	0(0)
2.5		54	3(5.5)	1(33.3)
1.2		57	11(19.2)	6(54.5)
0.6		47	12(21.3)	7(58.3)
0.3		45	16(35.5)	7(49.0)
MAPZP		10	47	24(51.0)
	5	53	30(56.6)	16(53.3)
	2.5	60	29(48.3)	13(44.8)
	1.2	55	29(52.7)	16(55.2)
	0.6	45	25(55.5)	17(68.0)
	0.3	50	28(56.0)	21(75.0)
	RAMZP	10	63	31(49.2)
5		71	36(50.7)	25(69.4)
2.5		61	32(52.4)	23(71.9)
1.2		52	24(46.2)	18(75.0)
0.6		47	28(59.6)	19(67.9)
0.3		48	32(47.0)	24(72.6)

수 있었으며 5%이상이었을때 體外受精이 완전히 抑制되었다. 이러한 結果는 透明帶抗原에 대한 抗體가 體外受精을 抑制 또는 遮斷한다는 報告를 確認하는 것이며 (Trounson 등, 1982; Yanagimach 등, 1985; Aitken 과 Richardson, 1981) 이는 抗體가 透明帶와 結合함으로써 透明帶와의 構造의 性質을 變化시켜 蛋白質分解酵素에 대한 抵抗性이 增加함에 따라 精子가 透明帶에 結合하여 通過하는 것을 抑制하기 때문인 것으로 思料된다.

한편 돼지 透明帶에 대한 單一클론抗體에서는 受精率과 多精子侵入率이 各各 48.3~56.6%, 41.6~75%로써 受精率에 있어서는 對照血清과 類似한 結果를 얻었으나 多精子侵入率에서 약간 낮은 것은 抗體에 의한 精子侵入의 立體的障蔽(steric hindrance)때문인 것으로

思料된다(Aitken 과 Richardson 1981).

그러나 생쥐 透明帶에 대한 複合抗體를 처리한 群에 있어서 受精率과 多精子侵入率은 各各 46.2~59.6%와 64.5~75.0%로서 對照群의 그것들과 類似한 成績을 나타냈다. 이러한 結果는 Immunofluorescence, Precipitation 등에서 알 수 있었던 바와 같이 돼지 透明帶와의 交叉反應性은 있으나 그 程度가 낮은 결과, 體外受精時에는 影響을 미치지 못하는 것으로 思料된다.

한편, 抗透明帶抗體가 생쥐 卵자의 體外受精에 미치는 影響을 調査하였을때의 結果는 Table 3에서 보는 바와 같았다.

抗血清과 對照血清이 0.3~10%까지 各各 含有된 培養液내에서 體外受精을 실시하였을때의 受精率은 對照

Table 3. Effect of anti-zona sera on *in vitro* fertilization of mouse eggs.

Con. of serum (%)	CONTROL		RAMZP		MAPZP		RAPZP	
	No. of eggs exem.	No. (%) of eggs fert.	No. of eggs exam.	No. (%) of eggs fert.	No. of eggs exam.	No. (%) of eggs fert.	No. of eggs exam.	No. (%) of eggs fert.
10	110	82(74.5)	96	0(0)	114	66(57.8)	84	41(48.8)
5	92	64(69.5)	80	0(0)	80	44(55.0)	102	65(63.7)
2.5	98	70(71.4)	102	0(0)	66	40(60.6)	64	34(53.1)
1.2	96	67(69.7)	82	7(8.5)	72	36(50.1)	68	32(47.0)
0.6	82	59(71.2)	76	20(26.3)	60	41(68.3)	72	41(56.9)
0.3	87	62(71.2)	70	25(35.7)	71	39(54.9)	66	35(53.0)

群에서 69.5~74.5%의 受精率을 보인 반면, 생쥐透明帶에 대한 複合抗體 處理群에서는 0~35.7%로서 受精率이 매우 낮았다. 특히 2.5% 이상이었을 때 體外受精이 완전히 抑制된 것은 1987년 서 등이 報告한 내용과 거의 일치되는 成績이었다. 그러나 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體 및 複合抗體 處理群에 있어서 受精率 50.1~68.3% 및 47.0~63.7%는 대조군의 그것보다도 稀釋血清濃도에 관계없이 낮았는데 이러한 結果는 抗體의 불분명한 간접적 요인에 의한 遮斷 또는 抑制에 起因되는 것으로 思料된다.

IV. 摘 要

本 實驗은 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體와 複合抗體 및 생쥐透明帶에 대한 複合抗體가 돼지卵子和 생쥐卵자의 受精過程에 미치는 影響과 交叉反應등을 檢討해 보고자 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 돼지 및 생쥐卵자를 稀釋되지 않은 抗透明帶血清으로 各各 處理한 後 觀察하였을때 돼지 및 생쥐透明帶 周邊에 뚜렷한 沈澱現象이 나타나 그 結果 透明帶에 대한 精子와의 結合이 遮斷되었다.

2. 抗血清과 對照血清이 各各 0.3~10%까지 含有된 培養液으로 豫備培養한 다음 體外受精을 實施하였을때, 돼지卵자의 경우 돼지透明帶에 대한 複合抗體는 5~10%의 稀釋濃度에서 體外受精과 多精子侵入이 완전히 抑制된 반면, 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體와 생쥐透明帶에 대한 複合抗體는 體外受精率에 별 差異가 없었으나, 多精子侵入率에 있어서 單一클론抗體 處理群은 對照群과 比較해 볼때 약간 감소가 있었다. 이러한

結果는 생쥐卵자를 이용한 體外受精에서 얻어진 結果와 거의 類似하게 나타났다.

V. 引用文獻

1. Aitken, R.J. and D.W. Richardson. 1981. Mechanism of sperm binding inhibition by anti-zona antisera. *Gamete Res.*, 4: 41-47.
2. Aitken, R.J., E.A. Rudak, D.W. Richardson, J. Dor, O.Djahanbakch and A.A. Templeton. 1981. The influence of anti-zona and anti-sperm antibodies on sperm-egg interaction. *J. Reprod. Fert.*, 62: 597-606.
3. Blandau, R.J. 1980. *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 33: 3-11.
4. Bleil, J.D. and P.M. Wassarman. 1980a. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 20: 873-882.
5. Dunbar, B.S., D.W. Drell, D.M. Wood and D.S. Bundman. 1987. Immunological comparison of antibodies to porcine zona pellucida in rats and rabbits. *Biol. Reprod.* 30: 435-444.
6. Dunbar, B.S., D.D. Raynor. 1980. Characterization of porcine zona pellucida antigens. *Biol. Reprod.* 22: 941-54.

7. Gwatkin, R.B.L., D.T. Williams and D.J. Carlo. 1977. Immunization of mice with heat solubilized hamster zonae: production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. *Fertil. Steril.*, 28 : 871-877.
8. Hedrick, J.L. and N. Wadrip. 1980. The macromolecular composition of the porcine zona pellucida. *Fed. Proc.* 39, 2081(Abstr. 2516)
9. Isojima, S., K.K Oyama, A. Hasegawa, Y. Tsunoda and A. Hanada. 1983. Monoclonal antibodies to porcine zona pellucida antigens and their inhibitory effects on *in vitro* fertilization of porcine, hamster and human oocytes. In *Reproductive Immunology*, S. Isojima and W.D. Billington, ed. Elsevier Science Publishers, pp. 91-102.
10. Jilek, F. and A. Pavlok. 1975. Antibodies against mouse ovaries and their effect on fertilization *in vitro* and *in vivo* in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 42 : 377-380.
11. Lenz, R.W., G.D. Ball, J. K. Lohse, M. L. First and R.L.Ax. 1983. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 28 : 683-690.
12. Modlinski, J.A. 1970. The role of the zona pellucida in the development of mouse egg *in vivo*. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 23 : 539-547.
13. Mori, T., T. Nishimoto, M. Kitagawa, Y. Noda, T. Nishimura and T. Oikawa, 1978. Possible presence of autoantibodies to zona pellucida in infertile women. *Experientia*, 34 : 797-799.
14. Nishimoto, T., T. Mori, I. Yamada and T. Nishimura. 1980. Autoantibodies to zona pellucida in infertile and aged women. *Fertil. Steril.*, 34 : 552-556.
15. Oikawa, T. and R. Yanagimachi. 1975. Block of hamster fertilization by anti-ovary antibody. *J. Reprod. Fert.*, 45 : 487-494.
16. Sacco, A.G. 1978. Immunological Specificity of Anti-Zona Binding to Zona Pellucida. *J. Exp. Zool.*, 204 : 181-186.
17. Sacco, A.G. 1979. Inhibition of fertility in mice by passive immunization with antibodies to isolated aonae pellucidae. *J. Reprod. Fert.*, 56 : 533-537.
18. Sacco, A.G., E.C. Yurewicz, M.G. Subramanian and F.J. Demay. 1981. Zona pellucida composition: Species cross reactivity and contraceptive potential of anti-serum to a purified pig zona antigen (PPZA). *Biol. Reprod.*, 24 : 997-1008.
19. Sacco, A.G., M.G. Subramanian and E.C. Yurewicz. 1981. Active immunization of mice with porcine zonae pellucidae: Immune response and effect on fertility. *J. Exp. Zoology*, 281 : 405-418.
20. Sacco, A.G., E.C. Yurewicz and M.G. Subramanian. 1983. Isolation and preliminary characterization of a purified pig zona antigen(PPZA) from porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 29 : 511-523.
21. Sacco, A.G., E.C. Yurewicz and M.G. Subramanian. 1986. Carbohydrate influences the immunogenic and antigenic characteristics of the ZP III macromolecule(Mr 55,000) of the pig zona pellucida. *J. Reprod. Fert.*, 76 : 575-586.
22. Subramanian, M.G. E.C. Yurewicz and A. G. Sacco. 1981. Specific radioimmunoassay for the detection of a purified porcine zona pellucida (PPZA). *Biol. Reprod.* 24 : 933-943.
23. 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.* 81 : 501-504.
24. Trounson, A.D., C.A. Shivers, R.

- McMaster and A. Lopata, 1980. Inhibition of sperm binding and fertilization of human ova by antibody to porcine zona pellucida and human sera. Arch. Androl., 4 : 29-36.
25. Tsunoda, Y. and M.C. Chang. 1978. Effect of antisera against eggs and zonae pellucidae on fertilization and development of mouse eggs *in vivo* and in culture. J. Reprod. Fertil. 54, 233-237.
26. Tsunoda, Y. and T. Sugie. 1977. Inhibition of fertilization in mice by anti-zona pellucida antiserum. Jpn. J. Zootech. Sci., 48 : 784-786.
27. Wood, D.M., C. Liu and B.S. Dunbar. 1981. The effect of alloimmunization and heteroimmunization with zonae pellucidae on fertility in rabbit. Biol. Reprod., 25 : 439-450.
28. 서광영. 1987. Studies on the production of antibody to mouse zona pellucida and its effect on the fertilization of mouse effects. 건국대학교 대학원 석사학위 청구논문.
29. 유영춘. 1989. Studies on the production of monoclonal antibody to porcine zona pellucida and its characterization. 건국대학교 대학원 석사학위 청구논문.
30. 박세필, 박태균, 윤산현, 고대환, 정길생. 1989. Studies on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes; III. *in vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. 한축지. 13(2) : 105-112.
31. 김은영, 유영춘, 박세필, 정형민, 정길생, 김종배. 1990. Studies on the characteristics of anti-zona antibody ELISA and indirect Immunofluorescence test, 한국가축번식학회지. 14(2). 107-114.