

Hormone의 처리방법이 Mouse의 배란, 핵 성숙도 및 체외수정에 미치는 영향

박기상 · 김광식 · 서병부 · 송해범
대구대학교 농과대학

Influences of Hormone Treatment on the Ovulation Rates, Maturation and *In Vitro* Fertilization of Mouse

K. S. Park, K. S. Kim, B. B. Seo and H. B. Song
College of Agriculture, Taegu University

SUMMARY

This research was conducted to investigate the interrelationship among methods of injection of PMSG-hCG to the number of ovulated eggs, percentage of matured oocytes and *in vitro* fertilization using out-bred ICR mice. The results obtained are as follows,

- 1) The optimum dose was 5 IU for both PMSG and hCG, while the number of ovulated eggs was 42 ± 8 , percentage of M II was 73% and *in vitro* fertilization rate was 81%.
- 2) The optimum injection interval of PMSG-hCG was 48 hours, while the number of ovulated eggs was 48 ± 8 , percentage of M II was 80% and *in vitro* fertilization rate was 81%.
- 3) The optimum time for collecting eggs was between 16 and 18 hours after hCG injection, while the numbers of ovulated eggs were 44 ± 8 , 42 ± 7 and 43 ± 7 in 14, 16 and 18 hours after hCG injection respectively, and percentages of M II were 79 and 81%, and *in vitro* fertilization rates were 81 and 80% in 16 and 18 hours after hCG injection, respectively.
- 4) The repeat of superovulation decreased with the number of ovulated eggs, percentage of M II and *in vitro* fertilization rate, than in control. But it was recovered by increasing the repeat interval.

서론

대부분의 포유동물의 난자는 체내 호르몬의 농도 변화에 의해 난포가 자극되어 수정 직전의 상태인 제1극체를 방출한 제2성숙분열중기에 배란이 일어난다(Donahue, 1968, 1973; Gates, 1971; Tsafiriri, 1978).

안정되고 높은 체외수정율을 얻기 위해서는 발달 단계가 일정한 제2성숙분열 중기의 난자를 체외수

정에 공여하는 것이 효과적이라는 것이 일반적으로 알려져 있다(Gates, 1971; Donahue, 1973; Tsafiriri, 1978). 그러나 호르몬의 주사량(Gates, 1969, 1971; Maudlin 과 Fraser, 1977; Miller 와 Armstrong, 1981 a,b; 이와 정, 1989), PMSG-hCG의 주사간격(Gates, 1969; Maudlin 과 Fraser, 1977; Gianfortony 와 Gulyas, 1985), 과배란처리 후의 경과시간(Hiller 등, 1985; 이와 정, 1989) 그리고 과배란의 반복처리(Willet 등, 1953;

Linn과 Bailey, 1965; Turman과 Whettemann, 1978; Lubbadah 등, 1980; Kim 등, 1987)등에 따라서 배란율과 핵 성숙도 및 체외수정율에 차이가 있다.

따라서 본 실험은 국내에서 사육되고 있는 ICR 계통의 mouse를 사용할 때 호르몬의 여러가지 주사 방법이 배란율과 핵성숙도 및 체외수정율에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 본고 실험동물 사육실과 국내에서 사육중인 ICR 계통(이하 ICR)으로서, 수컷은 생후 12주령, 체중 35g 이상된 것을 사용하였으며, 암컷은 생후 3~6주령, 체중 15~25g인 것을 사용하였다. 일조시간은 명 14, 암 10시간으로 조절하였으며, 사료와 물은 자유채식시켰고, 실내온도는 18~24℃를 유지하였다. 또한 실험 1주일 전에 개체간의 차이를 최소화시키기 위하여 수컷은 1마리씩, 암컷은 3~4마리씩 분리하여 1개의 cage에 나누어 관리하였다.

2. 배양액의 제조

난자의 회수 및 정자의 회수에는 T6 배양액을 사용하였으며 그 화학적 조성은 Table 1과 같다.

체외수정을 위한 배양액으로는 T6 + 15mg/ml bovine serum albumin(BSA, Sigma, Chemical Co. U.S.A.)을 사용하였으며, 배양액의 제조는 각각의 10 또는 100배의 stock을 만들어 0.5N의 NaOH 또는 1N의 HCl을 이용하여 pH 7.2~7.4로 조절한 후 2차 증류수로 정량하여 최종량을 맞추었으며, 0.2µm의 membrane filter(Whatman, Maidstone, England)로 각각의 stock을 여과하여 4℃ 이하의 냉장고에 보관하였다. 사용하기 1일 전에 BSA를 첨가하고 0.2µm의 membrane filter로 여과하여 난자의 회수를 위한 0.4ml drop과 정자 부유액을 얻기 위한 1ml의 drop 및 체외수정용 배양액 0.4ml drop을 만든 배양 dish를 37℃, 99% 습도, 95% O₂, 5% CO₂ 상태의 incubator내에 정치하여 평형을 시켰다.

3. 정자의 수정능획득

웅성 mouse를 경추탈골법으로 도살하여 웅성 생식기를 적출한 후, 정소상체 미부만을 회수하여 0.4ml의 T6 + 4mg/ml BSA drop으로 옮겨, 40~60배의 실체현미경 하에서 해부침으로 정자괴를 회수하여 15~20분 동안 CO₂ incubator내에서 배양하여 정자부유액을 형성시키고, 이렇게 하여 형성된 정자 부유액 중 활력이 우수한 것만을 정자의 수정능 획득을 위해 1.5~2시간 동안 전배양한 후, 정자의 최종 농도를 1.5×10⁶/ml로 조절하여 체외수정

Table 1. Composition of T6 medium (Quinn, *et al.*, 1982)

Compound	mM	Molecular weight	g /1
NaCl	97.84	58.450	5.719
KCl	1.42	74.557	0.106
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.78	147.200	0.262
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.47	203.330	0.096
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.36	358.160	0.129
NaHCO ₃	25.00	84.020	2.101
Na lactate	24.90	112.100	4.652(60% syrup)
Na pyruvate	0.47	110.000	0.052
Glucose	5.56	179.860	1.000
BSA			*
Penicillin G, K salt			0.060
Streptomycin sulphate			0.050
Phenol red			0.010

* BSA was supplemented 4mg/ml for sperm and egg washing, and 15mg/ml for fertilization.

에 공시하였다.

4. 과배란의 유기 및 난자의 회수

암컷은 오후 7시에 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG, Intervet, Holland)을 복강주사하고 실험의 종류에 따라 human chorionic gonadotropin(hCG, Intervet, Holland)을 24~72시간 쯤에 동일한 방법으로 주사하여 과배란을 유도하였으며, 난자의 회수는 hCG 주사 후 10~24시간에 mouse를 경추탈골법으로 도살한 다음 복부 정중선을 절개하여 난관을 난소와 자궁으로부터 분리하고 난관 주위의 혈액과 지방층을 충분히 제거하고 1 mg/ml의 hyaluronidase(Sigma, Chemical Co. U.S.A.)가 첨가된 배양액 drop에서 해부침으로 터뜨린 후 난자에 둘러 쌓인 난구세포를 제거하고 100~200배의 실체현미경 하에서 제1극체가 형성된 성숙란만을 채집했다.

호르몬의 주사량, 호르몬의 주사간격, 과배란처리후의 경과시간 및 과배란의 반복처리 간격은 다음과 같이 하였다.

1) 호르몬의 주사량

생후 3~6주, 체중 15~25g 사이의 암 mouse에 PMSG와 hCG를 각각 2.5IU, 5IU, 7.5IU, 10IU 및 20IU 까지 변화시키면서 48시간 간격으로 복강주사한 후 16~18시간에 난자를 회수하여 배란율과 핵 성숙도를 관찰하였고, 체외수정 후 6시간이 경과했을 때 염색하여 수정 여부를 관찰하였다.

2) 호르몬의 주사간격

생후 3~6주, 체중 15~25g 사이의 암 mouse에 PMSG 5IU를 주사하고 24~72시간 까지 8시간 간격으로 hCG 5IU를 복강주사한 후 16~18시간에 난자를 회수하여 배란율과 핵 성숙도를 관찰하고 형태적으로 정상적인 성숙란을 체외수정 후 6시간이 경과했을 때 염색하여 수정 여부를 관찰하였다.

3) 과배란처리 후의 경과시간

생후 3~6주, 체중 15~25g 사이의 암 mouse에 PMSG와 hCG를 각각 5IU 씩 48시간 간격으로 복강주사한 후 10~24시간 사이에 2시간 간격으로 난자를 회수하여 배란율과 핵 성숙도를 관찰하고 형태적으로 정상적인 성숙란을 체외수정 후 6시간이 경과했을 때 염색하여 수정 여부를 관찰하였다.

4) 과배란의 반복처리 간격

생후 3~6주, 체중 15~25g 사이의 암 mouse를 처음 과배란처리한 것, 1주일 간격과 2주일 간격으로 과배란처리한 것으로 나누어 PMSG와 hCG를 각각 5IU 씩 48시간 간격으로 복강주사한 후 16~18시간에 난자를 회수하여 배란율과 핵 성숙도를 관찰하고 형태적으로 정상적인 성숙란을 체외수정 후 6시간이 경과했을 때 염색하여 수정 여부를 관찰하였다.

5. 체외수정과 수정의 판정

배란된 성숙란자는 0.4ml의 T6+15mg/ml BSA drop으로 옮긴 다음 수정능획득이 완료된 정자를 최종농도 1.5×10^6 /ml로 조절하여 난자가 들어있는 소적으로 옮겨서 6시간 동안 배양하면서 수정을 유도하였으며 난자의 핵 성숙도와 수정 여부의 관찰을 위한 난자의 고정과 염색은 먼저 2.5% glutaraldehyde 용액내에 침지하여 난자의 투명대를 고정한 다음 4℃의 냉장고에서 10% 중성 formalin 용액에 4~12시간 동안 난자의 세포질을 고정한 후 0.25% lacmoid 용액으로 염색하거나 quick dry method(Byun 등, 1991)로 염색하였다.

난자의 수정 여부는 난자의 세포질내에 정자가 침입하였거나, 정자 두부의 팽화, 응성 및 자성전핵의 형성 및 난자의 세포질 속에 정자의 미부에 대응하는 부분 등이 관찰되는 난자를 수정란으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 호르몬의 주사량에 따른 배란율, 핵 성숙도 및 체외수정율

PMSG와 hCG의 주사량이 배란된 난자의 수, 핵 성숙도 및 체외수정율에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 각각 2.5IU, 5IU, 7.5IU, 10IU 및 20IU 까지 변화시키면서 주사한 결과는 Table 2와 같다.

PMSG를 2.5IU로 고정시키고 hCG의 주사량을 2.5IU, 5IU, 7.5IU, 10IU 및 20IU로 했을 때 배란수는 마리당 각각 20 ± 4 , 31 ± 3 , 25 ± 8 , 21 ± 5 및 24 ± 8 개, MII형성율은 각각 61%, 73%, 70%, 65% 및 60%, 체외수정율은 각각 63%, 75%, 72%, 66% 및 72%로서 PMSG가 2.5IU인 경우, hCG 5

Table 2. Effects of dosage of PMSG and hCG on the number of ovulated eggs, maturation and *in vitro* fertilization

Hormone		No. of eggs			
PMSG (IU)	hCG (IU)	Recovered (/ head)	Examined	Matured (%)	Fertilized (%)*
2.5	2.5	20±4	101	62(61)	39(63)
	5	31±3	156	114(73)	85(75)
	7.5	25±8	124	87(70)	62(72)
	10	21±5	106	69(65)	45(66)
	20	24±7	119	71(60)	51(72)
5	2.5	30±7	152	106(70)	72(68)
	5	42±8	211	154(73)	125(81)
	7.5	39±7	195	146(75)	115(79)
	10	32±8	160	109(68)	75(69)
	20	27±9	136	88(65)	57(65)
7.5	2.5	23±8	115	79(69)	56(70)
	5	27±7	137	105(78)	84(80)
	7.5	25±6	124	93(75)	73(78)
	10	23±5	116	80(69)	56(70)
	20	21±5	105	76(72)	51(67)
10	2.5	12±5	61	33(54)	11(32)
	5	15±13	75	47(63)	26(56)
	7.5	17±12	87	54(62)	31(58)
	10	11±9	54	28(52)	12(43)
	20	9±8	45	21(47)	7(35)
20	2.5	2±2	10		
	5	2±2	10		
	7.5	2±2	10		
	10	2±2	10		
	20	2±2	10		

* Percentage of the number of eggs matured.

IU에서 좋았으나, PMSG를 5IU로 고정시키고 hCG의 주사량을 2.5IU, 5IU, 7.5IU, 10IU 및 20IU로 했을 때 배란수는 각각 30±7, 42±8, 39±7, 32±8 및 27±9개, MII 형성율은 각각 70%, 73%, 75%, 68% 및 65%, 체외수정율은 각각 68%, 81%, 79%, 69% 및 65%로서 5IU와 7.5IU에서 좋았으며, PMSG를 7.5IU로 고정시키고 hCG의 주사량을 2.5IU, 5IU, 7.5IU, 10IU 및 20IU로 했을 때 배란수는 각각 23±8, 27±7, 25±6, 23±5 및 21±5개였으며 MII 형성율은 각각 69%, 78%, 75%, 69% 및 72%, 체외수정율은 각각 70%, 80%,

78%, 70% 및 67%로써 5IU와 7.5IU에서 좋았다. 그러나 PMSG의 주사량이 10IU 이상이 될 경우에는 hCG의 주사량에는 관계없이 배란수, MII 형성율 및 체외수정율이 급격하게 저하하였으며, 20IU에서는 배란수가 0~4개였으며 전부 비정상적인 형태로 배란되었고, MII 형성율 및 체외수정율은 0%였다.

PMSG와 hCG의 농도를 2.5~20IU까지 변화시키면서 과배란을 유기시킬 시 PMSG와 hCG 각각 5IU에서 회수된 난자가 42±8개로 가장 많았다. 이는 Gates(1971)가 보고한 89~90개보다는 배란수

가 현저히 떨어졌으나 이와 정(1989)의 20개보다는 많았다.

제2극체가 확인된 M II 단계 난자로의 핵 성숙도는 PMSG와 hCG 각각 5~7.5IU 사이에서 75~78%로 가장 좋았는데. 이는 rabbit에서 성선자극 호르몬의 주사량의 증가에 따라 염색체 이상이 현저히 증가하였다는 Fujimoto 등(1974, 1975)의 보고와 mouse에서 PMSG의 투여량의 증가에 따라 염색체 이상이 증가하다가 1.5IU에서는 8%이던 것이 10IU에서는 20.8%로 급격히 증가하는 현상을 보였다는 Maudlin 과 Fraser(1977)의 보고와 일치하는 경향이였다. 체외수정율에 있어서는 본실험의 81%는 Fraser와 Drury(1975), Maudlin과 Fraser(1977) 그리고 Niwa 등(1980)의 90% 이상의 체외수정율에 비하여 떨어지는 경향이였다. 그러나 이러한 성적의 차이는 여러가지 실험변수가 작용했고 mouse의 계통과 수정용 media의 차이에 기인된 것 같다(Steven 등, 1983).

2. 호르몬의 주사간격에 따른 배란율, 핵 성숙도 및 체외수정율

PMSG와 hCG의 주사간격을 각기 다르게 처리한 후 배란된 난자의 수 및 핵 성숙도와 체외수정율의 시간대 별 분포는 Table 3과 같다.

호르몬의 주사간격을 24시간부터 72시간까지 8시간 간격으로 변화시킨 후 hCG 주사 후 16~18시간째에 mouse를 도살하여 배란율과 핵 성숙도 및 체외수정율을 관찰한 결과 배란수는 32, 40, 48 및 56시

간에 55±7, 45±8, 48±8 및 43±6개로 높은 성적을 보여주었으나 64시간 이후부터는 18±14개로 급격히 저하하였으며, M II 형성율은 32, 40 및 48시간에 각각 73, 76 및 80%로 시간이 경과하면서 증가하였으나 56시간에는 69%로 현저하게 저하하였고, 체외수정율도 시간이 경과하면서 증가하여 48시간에 81%였으나 56시간에는 71%로 저하하였다.

Gates(1971)는 주사간격을 45시간으로 했을 때 89.5±4개의 배란수와 95%의 수정율을 보고하였고, Martin(1988)은 48시간과 54시간의 주사간격에서 가장 높은 배란율을 얻었을 뿐만 아니라 수정율도 각각 84%와 90%로 가장 높은 것으로 보고하여 본 실험의 결과와 비슷한 경향이였다. 따라서 32~56시간 간격으로 PMSG와 hCG를 주사하였을 경우에 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 48시간 간격이 특히 우수하다는 것을 알 수 있었다.

3. 과배란처리후의 경과시간에 따른 배란율, 핵 성숙도 및 체외수정율

과배란처리 후, 각기 다른 시간에 난자를 회수하였을 경우, hCG 주사후 시간대 별 난자의 회수율과 핵 성숙도 및 체외수정율은 Table 4와 같다.

호르몬의 주사간격은 48시간으로 고정하고, hCG 주사 후 10시간부터 28시간까지 2시간 간격으로 mouse를 도살하여 배란수와 핵 성숙도 및 체외수정율을 관찰한 결과, 배란수는 14, 16 및 18시간에 회수한 것이 각각 44±8, 42±7 및 43±7개로 가장 많

Table 3. Effects of PMSG-hCG injection interval to mice on the number of ovulated eggs, maturation and *in vitro* fertilization

Interval of PMSG-hCG (h)	No. of eggs			
	recovered (/ head)	examined	matured (%)	fertilized (%)*
24	14±11	61	25(41)	15(59)
32	55±7	187	137(73)	93(68)
40	45±8	152	114(76)	84(74)
48	48±8	149	119(80)	97(81)
56	43±6	163	43(69)	31(71)
64	18±14	78	42(54)	27(65)
72	20±18	85	44(52)	26(59)

* Percentage of the number of eggs matured.

Table 4. Effects of time levels after superovulation of mice on the number of ovulated eggs, maturation and *in vitro* fertilization

Time after injection of hCG (h)	No. of eggs			
	recovered (/ head)	examined	matured (%)	fertilized (%)*
10	11 ± 9	55	17(30)	4(25)
12	31 ± 8	156	114(73)	73(64)
14	44 ± 8	220	161(73)	122(76)
16	42 ± 7	209	165(79)	134(81)
18	43 ± 7	259	210(81)	168(80)
20	33 ± 14	167	125(75)	63(50)
22	39 ± 15	215	110(51)	49(45)
24	34 ± 7	170	70(41)	31(45)

* Percentage of the number of eggs matured.

았으며, M II 형성율은 16시간과 18시간에 회수한 것이 각각 79%와 81%로 가장 높았고, 체외수정율도 16시간과 18시간에 회수한 것이 81%와 80%로 가장 높았다.

이러한 결과는 난자가 배란되어 난관팽대부에 도달하는 시기가 hCG 주사 후 11~13시간째라고 보고한 Gates(1971), Iwamatsu 와 Chang(1971), Fraser(1979) 및 이와 정(1989)의 보고와 일치하는 결과였다. 그러나 회수된 난자수는 Gates(1971)와 Fraser(1979)의 62.4±7.3개보다는 적었으나 이와 정(1989)이 보고한 18.2±20.9개보다는 많았다. 이러한 차이는 생쥐의 계통에 따른 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

따라서 난자의 배란율, 핵 성숙도 및 체외수정율이 가장 높은 hCG 주사 후 16~18시간에 난자를 회수하는 것이 난자의 이용성에 가장 효과적이라고 생각된다.

4. 과배란의 반복처리 간격에 따른 배란율, 핵 성숙도 및 체외수정율

과배란의 반복처리에 의해 배란되는 난자의 배란율과 핵 성숙도를 관찰하고 체외수정 후 6시간이 경과했을 때 수정 여부를 관찰한 결과는 Table 5와 같다.

대조구, 1주일 간격 및 2주일 간격 과배란처리구에서의 배란수는 각각 43±8, 37±7 및 40±9개였으며, M II 형성율은 79%, 74% 및 77%였고 체외수정율은 81%, 73% 및 76%로서 과배란의 반복 처리는 다소 억제 효과를 나타내었으나, 그 간격을 길게 할수록 정상으로 회복할 수 있음을 알 수 있었다.

호르몬의 연속투여에 의한 배란수와 체외수정율의 저하현상은 mouse(Linn과 Bailey, 1965; Gates, 1969)에서 보고된 바 있으며 소(Willet 등, 1953; Turman과 Whettemann, 1978; Kim 등,

Table 5. Effects of repeat interval of superovulation of mice on the number of ovulated eggs, maturation and *in vitro* fertilization

Repeat interval of superovulation (week)	No. of eggs			
	recovered (/ head)	examined	matured (%)	fertilized (%)*
Control	43 ± 8	215	170(79)	138(81)
1	37 ± 7	196	145(74)	106(73)
2	40 ± 9	152	117(77)	89(76)

* Percentage of the number of eggs matured.

1987)에서도 보고되었다.

반복과배란 시 배란수와 체외수정율의 감소 원인에 대하여는 여러 가지 해석이 있으나 같은 호르몬 제제의 연속투여에 따른 개체의 항체 형성(Lubbadeh 등, 1980), 난소의 유착과 손상(Willet 등, 1953) 및 반복투여에 따라 난소내에 있는 난포수의 감소(Maurer 등, 1968)등에 기인될 것이라는 보고와 관계가 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 실험은 국내에서 사육되고 있는 ICR 계통의 mouse를 사용할 때 과배란 유기조건이 배란율과 핵성숙도 및 체외수정율에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위해 hormone의 여러가지 주사방법을 비교 검토하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. PMSG와 hCG의 적정 주사량은 PMSG 5IU와 hCG 5IU에서 배란수 42 ± 8 , M II 형성을 73% 및 체외수정율 81%로 가장 좋았다.
2. 호르몬의 주사간격은 48시간 간격에서 배란수 48 ± 8 개, M II 형성을 80% 및 체외수정율 81%로서 가장 좋았다.
3. hCG 주사 후 14, 16 및 18시간에 배란수는 각각 44 ± 8 , 42 ± 7 및 43 ± 7 개, M II 형성을 및 체외수정율은 16시간과 18시간에 각각 79%와 81% 및 81%와 80%로 가장 좋았다.
4. 과배란의 반복 처리에 따른 영향은, 대조구에서 배란수 43 ± 8 개와 M II 형성을 79% 및 체외수정율 81%에 비하여 과배란의 반복 처리는 다소 억제 작용을 하였으나, 그 간격을 길게 할수록 정상으로 회복 되었다.

참고문헌

- Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Development of staining method for nucleus of the oocyte from domestic animals. Korean J. Anim. Sci., 33(1): 25-31.
- Donahue RP. 1968. Maturation of the mouse oocyte *in vitro*: 1. Sequence and timing of nuclear progression. J. Exp. Zool., 169: 237-250.
- Donahue RP. 1973. Fertilization of the mouse oocyte: Sequence and timing of nuclear progression to the two-cell stage. J. Exp. Zool., 180: 305-318.
- Fraser LR. 1979. Rate of fertilization *in vitro* and subsequent nuclear development as a function of the post-ovulatory age of the mouse eggs. J. Reprod. Fert., 55: 153-160.
- Fraser LR, and Drury LM. 1975. Mouse sperm genotype and the rate of egg penetration *in vitro*. Biol. Reprod., 13: 513-518.
- Fujimoto S, Pahlavan N and Dukelow RW. 1974. Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. J. Reprod. Fert., 40: 177-181.
- Fujimoto S, Passantino TJ and Koenczoel I. 1975. A preliminary note on chromosome abnormalities in intratubal rabbit embryos. Proc. JPN. Acad., 51: 51-55.
- Gates AH. 1969. Time relationship between neural stimulus for LH-releasing factor and ovulation in the PMS-treated mouse. Am. Zoologist, 9: 1080.
- Gates AH. 1971. Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In Daniel, J. C. Jr(ed): "Methods in Mammalian Embryology." San Francisco: W. H. Freeman and Co., pp, 64-75.
- Gianfortoni JG and Gulyas BJ. 1985. The effect of short term incubation (aging) of mouse oocytes on *in vitro* fertilization, zona solubility, and embryonic development. Gamete Res., 11: 59-68.
- Hiller SG, Siddiquey AKS and Winston RMC. 1985. Fertilization *in vitro* of cumulus-enclosed mouse oocytes: Effect of timing of the ovulatory hCG injection. Int. J. Fert., 30:34-38.
- Iwamatsu T and Chang MC. 1971. Factors involved in the fertilization of mouse eggs *in vitro*. J. Reprod. Fert., 26: 197-208.

- Kim HN, Rorie RW, Young CR, White KL and Godke RA. 1987. The use of Anti-PMSG antibodies with PMSG for superovulating beef cattle. *Theriogenology*, 21(1): 243.
- Linn TP and Bailey DW. 1965. Difference between two inbred strains of mice in ovulatory response to repeated administrations of gonadotrophins. *J. Reprod. Fert.*, 10: 253-259.
- Lubbadeh WF, Graves CN and Spahr SL. 1980. Effect of repeat superovulation on ovulatory response of dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 50: 124-127.
- Martin AG. 1988. An analysis of the effect of the PMSG-HCG interval on the two-cell block. *Human Reprod.*, 3(2): 249-250.
- Maudlin I and Fraser LR. 1977. The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 50: 275-280.
- Maurer RR, Hunt WL and Foote RH. 1968. Repeated superovulation, following administration of exogenous gonadotropins in dutch-belted rabbits. *J. Reprod. Fert.*, 15: 93-102.
- Miller BG and Armstrong DT. 1981a. Superovulatory doses of pregnant mare sperm gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rat. *Biol. Reprod.*, 25: 253-260.
- Miller BG and Armstrong DT. 1981b. Effect of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol, and progesterone levels and early embryo development in immature rat. *Biol. Reprod.*, 25: 261-271.
- Niwa K, Araki M and Iritani A. 1980. Fertilization *in vitro* of eggs and first cleavage of embryos in different strains of mice. *Biol. Reprod.*, 25(5): 1155-1159.
- Quinn P and Whittingham DG. 1982. Effect of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos *in vitro*. *J. Androl.*, 3: 440-444.
- Steven BA, Swanson RJ, Adams PJ and Wortham JWE, Jr. 1983. Comparison of strains and culture media used for mouse *in vitro* fertilization. *Gamete Res.*, 7: 103-109.
- Tsafrifi A. 1978. Oocyte maturation in mammals. In Johnes, RE.(ed): "The Vertebrate Ovary." Plenum Publishing Co., pp. 409-442.
- Turman EJ and Whettemann RP. 1978. Follicular growth and superovulation in beef cows following repeated treatment with PMSG. *J. Anim. Sci.*, 47(Suppl. 1):396.
- Willet EL, Buckner PJ and Mcshan WH. 1953. Refractoriness of cows repeatedly superovulated with gonadotrophins. *J. Dairy. Sci.*, 36: 1083-1088.
- 이상진 · 정길생, 1989. 과배란 처리후의 경과시간이 생쥐난자의 핵 성숙과 수정에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 14: 70~78.