

TC-199액내에서 소 미성숙난자의 정자침입

박춘근 · 이준희 · 정희태 · 박수봉* · 양부근 · 김정익

강원대학교 축산대학

Sperm Penetration of Bovine Immature Oocytes in TC-199 Medium

Park, C. K., J. H. Lee, H. T. Choung, S. B. Park, B. K. Yang and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon University

SUMMARY

Bovine immature oocytes cultured for various times in TC-199 medium were inseminated with frozen-thawed spermatozoa in TC-199 medium supplemented with caffeine(5 mM) and heparin (10 μ g/ml). Sperm penetration was possible in oocytes at any stage of maturation, but penetration rates were lower in oocytes inseminated 0~16 h (60~76%) than 20 h (98%) after culture. Formation of male and female pronuclei were first observed in oocytes inseminated 8 h after culture. The proportions of polyspermy were high(50~76%) in oocytes inseminated at any stage of maturation. Sperm penetration into oocytes at the GV stage started at 8 h after insemination and the penetration rates gradually increased as time after insemination proceeds. The proportion(35%) of oocytes matured beyond metaphase-II 20 h after sperm-oocytes incubation was low. When oocytes were incubated without spermatozoa in TC-199 medium, maturation rates were significantly higher ($P<0.001$) in those without(45 and 84% for 16 and 20 h) than with (0 and 36% for 16 and 20 h) caffeine and heparin. These results indicate that TC-199 medium with caffeine and heparin is not suitable for maturation and fertilization of immature oocytes and may inhibit male pronuclear formation in the cytoplasm.

I. 서 론

포유동물에서 germinal vesicle단계에 있는 마우스(Iwamatsu와 Chang, 1972), 햄스터(Barrous와 Munoz, 1974), 토끼(Overstreet와 Bedford, 1974) 및 사람(Overstreet와 Hembree, 1976; Overstreet 등, 1980)의 미성숙난자는 정자의 침입이 가능하다는 것이 이미 보고되었다. 그러나 난세포질 내에서 정자 두부의 팽화는 관찰되지 않았으며, 위관강내에 침입한 정자는 미성숙난자의 세포막과 융합이 이루어지지 않는 것으로 알려져 왔다. 또한 현미경하에서

햄스터(Usui와 Yanagimachi, 1976; Moore와 Bedford, 1978)와 토끼(Berrios와 Bedford, 1979)의 정자는 미성숙난자의 세포질막과 융합은 일어나지만 정자핵의 팽화는 일어나지 않는 것으로 밝혀졌다. 이와같이 미성숙난자내에서 정자핵의 팽화를 저해하는 정확한 요인은 알려지지 않았지만 동물종에 따라 다를 것으로 추측되었다.

Niwa 등(1991)은 caffeine과 heparin이 첨가된 BO액은 소 난자의 성숙배양에 적당하지 않다고 보고 하였지만 germinal vesicle단계나 성숙 중인 난자는 체외에서 정자 침입이 가능하다고 보고했다. 따라서 난자의 성숙과 정자 침입이 동시에 일어날 수 있는 배

※ 축산기술연구소(National Livestock Research Institute)

양액을 사용하면 난자의 미성숙단계에서 침입한 정자핵의 발달과 난자성숙의 진행과정을 보다 구체적으로 밝혀낼 수 있을 것으로 생각된다. 일반적으로 소의 경우 미성숙난자의 체외성숙을 위한 배양액으로 혈청이나 난포액이 첨가된 TC-199액이 이용되고 있으나, 돼지에서는 TC-199액이 체외성숙과 수정을 위한 배양액으로 동시에 이용되고 있다((Zheng 과 Sirard, 1992). 그러므로 BO액과 같이 TC-199액내에서 정자침입이 이루어진다면 미성숙단계에서 침입한 정자핵의 발달과 난자의 성숙이 동시에 이루어질 수 있을 것으로 추측되나 이에 관한 보고는 아직 없다.

본 연구에서는 소의 미성숙난포난자를 TC-199액내에서 수정시켜 성숙과정의 여러 단계에서 정자 침입의 현상을 규명하고, 미성숙단계의 난자내에 침입한 정자두부의 변화를 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포난자의 회수

도축장에서 회수한 난소의 난포(직경 2~5mm)로부터 18-Gage의 주사침을 장착한 10ml의 주사기를 이용하여 채취한 미성숙 난포난자는 체외성숙배양을 위하여 25mM의 HEPES와 10%의 FCS를 첨가한 TC-199액을 사용하였다. 배양개시 3시간전에 100 μ l의 TC-199액 소적을 culture dish내에 작성해 유동 paraffin oil로 상면을 덮어 5% CO₂, 95% air 및 39 $^{\circ}$ C의 기상상태로 있는 탄산가스 배양기내에서 평형시켰다. 미성숙 난포난자는 상기의 배양액내에서 4회 세척후 성숙배양을 실시하지 않고 그대로 체외수정에 이용 또는 각각의 소적내에 난포난자를 10개씩 정지해 체외수정에 이용할 때까지 성숙배양을 실시했다.

2. 정자의 처리

정자의 처리 및 수정을 위한 배양액은 기본적으로 체외성숙용 배양액과 동일한 25 mM의 HEPES와 10%의 FCS가 첨가된 TC-199액에 10 mM의 caffeine을 첨가해 이용했다. 동결정액 straw는 35~37 $^{\circ}$ C의 water bath내에서 1분간 융해한 후 TC-199액을 8ml 첨가해 833 \times g으로 10분간 2회 원심분리로 세척하여 상등액을 제거한 후 정자의 농도가 2~5 \times 10⁶ spermatozoa /ml가 되도록 재부유시켜 준비하였다.

1) 실험 1

수정을 위한 배양액내에는 20 μ g /ml의 heparin을 첨가해 culture dish내에 50 μ l을 작성해 탄산가스 배양기 내에서 3시간 평형시켰다. 한편 미성숙난포난자가 체외에서 성숙하는 동안 정자의 침입상황을 검토하기 위하여 체외성숙배양 0, 4, 8, 12, 16 및 20시간 배양한 난자를 수정용 배양액에서 2회 세척후 각 소적당 5개씩 투입했다. 그후 상기의 방법으로 준비한 정액 50 μ l를 각각의 배지내에 첨가해 체외수정을 실시했다. 따라서 최종수정배지는 5mM caffeine, 10 μ g /ml heparin 및 1~2.5 \times 10⁶ /ml로 조정되었다. 수정후 20~22시간에서 난자를 고정·염색하여 난자의 성숙상태와 정자의 침입상황을 관찰했다.

2) 실험 2

난포로부터 채취한 난자는 세척후 체외성숙배양을 전혀 실시하지 않고 즉시 체외수정에 이용하였다. 정자의 처리와 배양액의 조건은 위에서 기술한 내용과 동일하다. 즉 GV 기에서 수정후 4, 8, 12, 16 및 20시간에서 고정, 염색하여 난자의 성숙과 정자의 침입상황을 검토했다.

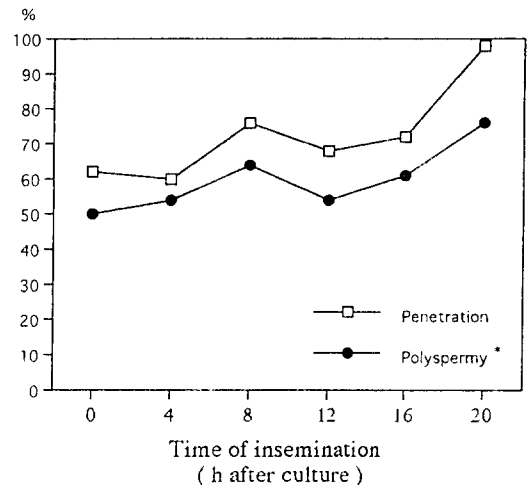


Fig. 1. Polyspermy on bovine immature oocytes inseminated in TC-199 medium at various times after culture.

* Percentage of total number of oocytes penetrated.

3) 실험 3

TC-199액내에서 난자가 성숙하는 동안 caffeine과 heparin의 영향을 검토하기 위하여 수정배지와 동일한 조건인 5mM의 caffeine과 10 μ g/ml의 heparin을 첨가 또는 무첨가하여 정자와의 수정을 행하지 않고 4, 8, 12, 16 및 20시간 배양후 난자의 성숙상태를 검토했다.

III. 결 과

Table 1은 소의 미성숙난자를 성숙배양의 여러 시간에서 수정했을 때 정자 침입란의 성숙단계를 나타낸 것이다. 난포난자를 0, 4, 8, 12 및 16시간 배양한 후

체외수정에 이용했을 때 정자침입율은 62, 60, 76, 68 및 72%로 큰 차이는 나타내지 않았으나 20시간 배양한 경우 98%로 높은 비율을 나타냈다. 한편 난자의 성숙배양시간이 0, 4, 8, 12, 16 및 20시간으로 길어지면 서 자웅진핵 형성율은 0, 0, 40, 26, 28 및 69%로 증가되었다. 그러나 다정자 침입율은 난자의 성숙배양시간에 관계없이 50, 54, 64, 54, 61 및 76%로 매우 높은 수치를 나타냈다(Fig. 1).

Table 2는 미성숙 난포난자를 성숙배양없이 GV단계에서 수정한 후 여러 시간에서 난자의 성숙상태와 정자침입상황을 관찰하여 나타낸 결과이다. 수정 후 4시간에서 정자 침입란은 관찰되지 않았으나 8, 12, 16 및 20시간에서 15, 46, 51 및 69%로 수정후 시간이 경과하면서 정자 침입율의 증가를 나타냈다. 한편 정자

Table 1. Penetration *in vitro* of bovine immature oocytes inseminated in TC-199 medium at various times after culture

Time of insemination (h after culture)	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes penetrated*				
		Total (%)	With decondensing sperm head at the stage of:			With male and female pronuclei(%)**
			Prometaphase- I ~ Telophase- I	Metaphase- II	Female pronucleus	
0	55	34(62)	29	5	0	0(0)
4	40	24(60)	11	12	1	0(0)
8	55	42(76)	3	18	4	17(40)
12	62	42(68)	6	25	0	11(26)
16	79	57(72)	0	35	6	16(28)
20	50	49(98)	1	13	1	34(69)

* Oocytes were examined 20 to 22 h after insemination.

** Percentage of total number of oocytes penetrated.

Table 2. Time of penetration *in vitro* of bovine oocytes inseminated at germinal vesicle stage in TC-199 medium

Time of examination (h after insem.)	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes penetrated at the stage of :			
		Total (%)	Germinal vesicle	GVBD~ Telophase- I	Metaphase- II (%)*
4	38	0(0)	0	0	0(0)
8	34	5(15)	4	1	0(0)
12	35	16(46)	0	16	0(0)
16	57	29(51)	0	28	1(3)
20	45	31(69)	0	20	11(36)

* Percentage of total number of oocytes penetrated.

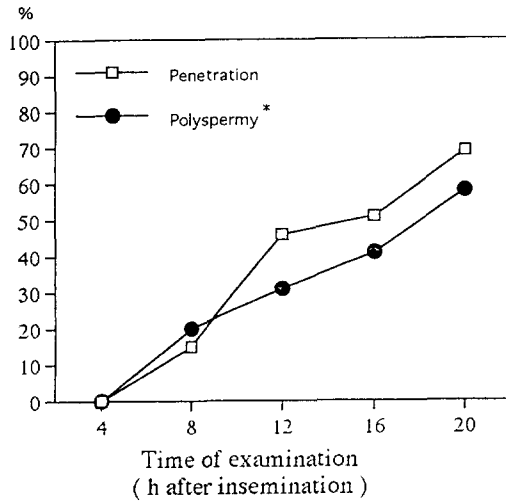


Fig. 2. Polyspermy on bovine oocytes inseminated at germinal vesicle stage in TC-199 medium with caffeine and heparin.
*Percentage of total number of oocytes penetrated.

침입란중 수정후 8시간에서 GV기에 정자 침입란 4개가 관찰되었으며 Metaphase-II기에서의 정자 침입란은 수정후 16시간에서 처음 관찰되었고 20시간에서

는 31개의 정자 침입란중 11개가 관찰되었다. 그러나 정자침입란 중 다정자 침입율은 수정후 0, 4, 8, 12, 16 및 20시간에서 0, 20, 31, 41 및 58%로 시간이 경과할 수록 증가하였다(Fig. 2).

TC-199배양액내에서 caffeine과 heparin을 첨가 또는 무첨가하여 정자와의 수정없이 난자 성숙에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 3에 나타냈다. 난자의 성숙배양후 8시간까지 Metaphase-II로 발육한 난자는 관찰되지 않았다. 그러나 caffeine과 heparin이 첨가된 경우, 성숙배양 16시간에서 성숙율이 0%인데 비하여 이들 물질의 무첨가시 7%의 난자가 Metaphase-II기로 발육했으며, 성숙배양후 16 및 20시간에서 caffeine과 heparin무첨가시 난자의 성숙율은 45와 84%로 이들 물질의 첨가시 0과 36%에 비해 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈다($P < 0.001$).

IV. 고 찰

본 연구는 소의 미성숙 난포난자를 체외에서 배양하는 동안 여러 시기에서 TC-199액을 이용해 체외수정한 후 미성숙난자의 정자 침입상황을 검토한 결과를 나타냈다. Niwa 등(1991)은 caffeine과 heparin이 첨가된 BO수정액내에서 GV기 또는 성숙단계에 있는 소의 난포난자도 성숙난자와 같이 체외수정에 의한 정

Table 3. Maturation of bovine oocytes cultured in TC-199 medium with or without caffeine and heparin

Time of examination (h after culture)	Presence of caffeine and heparin	No. of oocytes examined	(% No. of oocytes at the stage of :		
			GV	Prometaphase~ Telophase-I	Metaphase-II
4	+	34	33	1	0(0)
	-	42	30	12	0(0)
8	+	44	16	28	0(0)
	-	58	32	58	0(0)
12	+	52	2	50	0(0)
	-	59	0	55	4(7)
16	+	49	2	47	0(0) [†]
	-	44	0	24	20(45)
20	+	72	0	46	26(36) [†]
	-	76	0	12	64(84)

[†] $P < 0.001$, difference between with and without caffeine and heparin.

자의 침입(95~100%)이 가능한 것으로 보고했는데, GV기의 모든 난자는 수정후 20~22시간에서 정자 두부의 핵이 위축된 상태로 관찰되었으며 GVBD가 일어나기 전에도 발견되었는데 개(Mahi와 Yanagimachi, 1976)를 제외한 다른 동물종에서는 보고된 예가 없다. 그러나 본 연구결과에서 TC-199액을 이용해 수정한 경우 20시간 성숙배양한 난자에서만 98%의 정자 침입율을 나타냈을 뿐 0~16시간 성숙배양한 난자는 60~76%(Table 1)로 BO액보다 낮은 수정율을 나타냈다. 이와 같은 결과는 caffeine과 heparin이 첨가된 TC-199액내에서 정자의 수정능력획득이 유지되지만 미성숙단계에 있는 난자내의 정자침입은 억제되고 있음을 시사했다. Usui와 Yanagimachi(1976)는 정자 핵을 위축시키는 인자가 난세포질에서 합성되어 GV기로 전이되어 축적되고 GVBD시 난세포질에서 방출된다는 사실을 밝혀냈다. 이와 같은 인자는 소의 미성숙난자의 경우 GV기의 물질들이 난세포질로 방출되기 전에 작용한다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 TC-199을 이용한 체외수정시 caffeine과 heparin이 첨가되었기 때문에 그와 같은 인자의 작용을 촉진시켰을 가능성이 있으나 현재의 체외수정계 하에서 caffeine과 heparin을 첨가하지 않을 경우 정자의 침입이 불가능한 상태(Niwa 등, 1988)이므로 이와 같은 문제점을 규명하는데 어려운 문제점이 남아있는 것으로 생각된다.

본 연구에서 난자를 8시간 이상 성숙배양후 체외수정에 이용했을 때 응성전핵의 발달이 가능하다는 것을 나타냈다(Table 1). 소의 경우 체내에서 LH peak후 4~8시간에서 GVBD가 일어나며 (Kruip 등, 1983). 이와 같은 간격은 체외에서 성숙한 난자와 거의 일치했다(Sirard 등, 1989 ; Niwa 등, 1991). 따라서 전핵 발달인자(Thibault와 Gerard, 1973) 또는 응성전핵 발달인자(Yanagimachi, 1981)는 GVBD후 즉시 부분적으로 활성화 되는 것으로 추측되는데, 이들 인자의 활성화는 난자의 GVBD로 부터 Metaphase-II기까지의 성숙기간동안 점진적으로 증가되는 것으로 보여진다. 이와 비슷한 연구결과는 mouse(Iwamatsu와 Chang, 1972), rat(Niwa와 Chang, 1975) 및 hamster(Usui와 Yanagimachi, 1976)에서 보고되었으나, 본 연구에서 체외성숙배양을 전혀 실시하지 않고 수정한 난자 중에서 수정 후 4~16시간에서 정자

침입란의 대부분은 GVBD에서 Telophase-I기에 있었으며, 20시간후에도 Metaphase-II기로 발육한 난자는 31개의 정자 침입란중 11개가 관찰되어 35%의 낮은 성숙율을 나타냈다. 그러나 정자 침입난자중 자성전핵 또는 응성전핵을 가지고 발달한 난자는 관찰되지 않았는데, 이와 같은 현상은 본 연구에서 GV기 상태의 미성숙난자에 정자의 침입은 가능하지만 세포질내에서 응성전핵의 발달을 촉진시키는 물질의 부족에 기인된 것으로 추측되며, Hirao와 Yanagimachi(1979)는 한개의 hamster난자에 9개 이상의 정자가 침입했을 때 정자의 두부가 전핵으로 발달한 것을 관찰하지 못했다고 보고해 본 연구의 결과를 간접적으로 뒷받침해 주고 있다. 일반적으로 미성숙난자의 체외성숙배양을 위하여 Hapes와 혈청이 첨가된 TC-199액을 이용하는데 본 연구의 경우 수정을 위해 첨가된 caffeine과 heparin은 난자의 성숙을 저해하는 요인으로 추측된다. 따라서 정자와의 수정없이 난자의 성숙에 caffeine과 heparin이 미치는 영향을 검토했는데(Table 3), 일반적인 체외수정의 방법에서 TC-199액에 이들 물질을 첨가하지 않고 20~22시간(84%) 성숙시킨 난자는 BO액을 이용해 체외수정에 이용하는 경우 매우 높은 정자 침입율과 전핵 형성율을 나타낼 것으로 추측된다. 따라서 TC-199 액내에 caffeine과 heparin이 첨가되면 난자의 성숙(36%)을 저해하는 것으로 밝혀졌는데, 이들 물질은 난자의 성숙뿐만 아니라 정자 침입난자의 전핵 형성도 저해하는 것으로 추측된다. 그러나 현재의 연구에서 TC-199배양액을 이용해 미성숙단계서 수정된 난자는 정자 두부의 팽창 및 전핵 형성이 왜 이루어지지 않는지 확실하게 규명하기는 어려운 상태다.

한편 본 연구에서 체외성숙배양을 전혀 실시하지 않고 수정된 난자는 20~22시간 후 정자 침입란중 50%가 다정자침입란(polyspermy)으로 판명되었으며 성숙배양시간이 증가되어도 54~76%의 높은 비율을 나타냈다(Fig. 1). Fulka 등(1982)은 체외성숙 후 투명대를 제거한 소의 난자를 수정시켰을 때 정자 침입란의 50%가 다정자 침입란으로 난세포막에서 다정자 침입을 강하게 억제하는 것으로 보고했다. Niwa 등(1991)은 성숙배양시간에 관계없이 BO액에서 수정했을 때 95~100%의 정자 침입율을 보였으나 성숙배양시간이 늘어남에 따라 다정자 침입율(100→20%)이

현저히 감소하는 것으로 보고했으며, 또한 GV기의 난자를 BO액을 이용해 수정한 후 8~20시간에서 이미 95~100%의 정자침입율과 73~100%의 다정자 침입율을 보고했다. 이와 같은 결과는 TC-199액 내에서 수정후 시간이 경과함에 따라 수정율(0→69%)과 다정자 침입율(0→58%)이 증가한 본 연구결과(Fig. 2)와 다른 경향을 나타냈는데 그 원인은 배양액의 차이에 기인된 것으로 생각되며 소의 미성숙난자는 투명대 또는 난세포질막에서 다정자 침입을 억제할 수 없는 것으로 추측된다. 어떤 동물종에서는 수정이 이루어지는 동안 cortical granules로부터 위관강내로 방출된 물질이 투명대의 특성을 변화시키며 다정자 침입을 막아하는 것으로 알려졌다(Wolf, 1981). 그러나 현재의 연구는 GV기에서 난자가 수정하는 동안 일어나는 cortical granules가 어떻게 변화하는지 시험되지 않았으나 hamster(Moore와 Bedford, 1978) 와 토끼(Berrios와 Bedford, 1979)의 경우 GV기의 미성숙난자에서 cortical granule의 완전한 결핍이 증명되었다.

본 연구의 결과에서 caffeine과 heparin이 첨가된 TC-199액은 소 미성숙난자의 정자 침입은 가능하지만 난자의 성숙이 억제되므로 난자의 성숙과 정자의 침입에 적당한 배양액이 개발된다면 GV기 또는 성숙중에 있는 난자에서 정자 침입 후 정자핵의 발달 등 더 자세한 수정의 초기현상을 규명할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 적 요

본 연구는 소의 미성숙난포난자를 이용해 TC-199액내에서 체외수정 실시후 정자의 침입과 난자성숙과정의 변화를 검토하였다. 미성숙난자를 TC 199배양액내에서 0, 4, 8, 12, 16 및 20시간 성숙배양후 caffeine(5 mM)과 heparin(10 μ g/ml)을 첨가한 배지내에서 수정한 결과 성숙배양시간에 관계없이 정자의 침입이 관찰되었다. 그러나 정자 침입율은 성숙배양 20시간(98%)에 비해 0~16시간(60~76%)에서 수정한 경우 낮게 나타났으며, 다정자침입도 50~76%로 높은 수치를 나타냈다. 정자침입란에 있어서 자웅양전핵의 형성은 성숙배양 8시간후 수정한 난자에서 처음 관찰되었다. 한편 GV기의 난자에 수정한 경우

수정후 8시간에서 정자 침입란이 처음 관찰되었고, 20~22시간후에는 62%의 침입율을 얻었지만 Metaphase-II 까지 성숙한 난자의 비율이 낮았으며, 수정후 시간이 경과할수록 다정자 침입의 비율은 증가하였다. 정자와의 수정없이 caffeine 과 heparin이 첨가된 TC-199액내에서 난자를 배양한 결과, 이들 물질이 첨가(36%)된 경우 배양 20시간에서 Metaphase-II기로 성숙한 난자가 처음 관찰된데 비하여 이들 물질의 부첨가(84%)시 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈다($P<0.001$). 이상의 결과로 부터 TC-199액을 이용한 경우 미성숙난자의 정자 침입은 가능하지만 난자의 성숙이 억제되었는데, 이와 같은 원인은 정확히 알 수 없으나 caffeine과 heparin의 존재에 의한 것으로 추측되었다.

VI. 인용문헌

1. Barros, T. and G. Munoz. 1974. Sperm penetration *in vitro* of mouse oocytes at various times after maturation. J. Reprod. Fert., 31:237-247.
2. Berrios, M. and J. M. Bedford. 1979. Oocyte maturation : aberrant post-fusion responses of the rabbit primary oocyte to penetrating spermatozoa. J. Cell Sci., 39:1-12.
3. Fulka, J., A. Jr. Pablok and J. Fulka. 1982. *In-vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert., 64:495-499.
4. Hirao, Y. and R. Yanagimachi. 1979. Development of pronuclei in polyspermic eggs of the golden hamster : is there any limit to the the number of sperm heads that are capable of developing into pronuclei ? Zool. Mag.(Tokyo), 88:24-33.
5. Iwamatsu, T. M. and C. Chang. 1972. Sperm penetration *in vitro* of mouse oocytes at various times after maturation. J. Reprod. Fert., 31:237-247.
6. Kruip, T. A. M., D. G. Cran, T. H. Van beneden and S. J. Dielemann. 1983. Structural

- changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. Gamete Res., 8:29-47.
7. Mahi, C. A. and R. Yanagimachi. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. J. Exp. Zool., 196:189-196.
 8. Moore, H. D. M. and J. M. Bedford. 1978. Ultrastructure of the equatorial segment of hamster spermatozoa during penetration of oocytes. J. Ultrastruct. Res., 62:110-117.
 9. Niwa, K. and M. C. Chang. 1975. Fertilization of rat eggs *in vitro* at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert., 43:435-451.
 10. Niwa, K., O. Ohgoda and M. Yuhara. 1988. Effects of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on *in-vitro* penetration of cattle oocytes. Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Dublin 3, 346(3 pages).
 11. Niwa, K., C. K. Park and K. Okuda. 1991. Penetration *in vitro* of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. J. Reprod. Fert., 91:329-336.
 12. Overstreet, J. W. and J. M. Bedford. 1974. Comparison of the penetrability of the egg vestments in follicular oocytes, unfertilized and fertilized ova of the rabbit. Devl. Biol., 41:185-192.
 13. Overstreet, J. W. and W. C. Hembree. 1976. Penetration of the zona pellucida of non-living human oocytes by the human spermatozoa *in vitro*. Fert. Steril., 27:815-831.
 14. Overstreet, J. W., R. Yanagimachi, D. F. Kats, K. Hayashi and F. W. Hanson. 1980. Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg : a study of fertile donors and infertile patients. Fert. Steril., 33:534-542.
 15. Sirard, M. A., H. M. Florman, M. L. Leibfried-Rutledge, F. L. Barnes, M. L. Sims and N. L. First. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biol. Reprod., 40:1257-1263.
 16. Thibault, C. and M. Gerard. 1973. Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes *in vitro*. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 13:145-156.
 17. Usui, N. and R. Yanagimachi. 1976. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stage of maturation, fertilization and early development : the appearance and disappearance of factors involved in sperm chromatin decondensation in egg cytoplasm. J. Ultrastruct. Res., 57:276-288.
 18. Wolf, D. P. 1981. The mammalian egg's block to polyspermy. In: Fertilization and Embryonic Development *In Vitro*, pp.183-197. Eds L. Mastroianni, Jr and J.D. Biggers. Plenum Press, New York.
 19. Zheng, Y. S. and M. A. Sirard. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. Theriogenology, 37:779-790.