

家畜의 改良 및 繁殖效率 增進에 關한 研究

II. 토끼에서 體內 受精能 獲得精子에 의한 體外受精 및 受精卵의 移植에 關한 研究

鄭英彩 · 金昌根 · 尹鍾澤 · 方明杰

中央大學校 畜産學科

Studies on the Improvement of Performance and Reproductive Efficiency in Farm Animals

II. Study on vitro fertilization with in vivo capacitated sperm and embryo transfer in rabbits

Chung, Y. C., C. K. Kim, J. T. Yoon and M. G. Pang

Department of Animal Science, Chung-Ang University

Summary

As a part of in vitro fertilization (IVF) for farm animals, IVF experiment was conducted using New Zealand white rabbits with their sperm capacitated in vivo. The effect of uterine conditions on sperm capacitation and effect of sperm concentration and fertilization media on IVF rate and implantation of in vitro fertilized ova were studied.

The results obtained are summarized as follows;

1. Acrosomal reaction, noted after staining, of sperm recovered from ligated and intact uterus of capacitors was 83.0% and 65.7%, respectively.
2. IVF rate of ova inseminated with sperm from ligated uterus tended to be higher in DM or with higher concentration of sperm than in the modified F₁₂ medium or with lower sperm concentration. Cleavage rate of fertilized ova for 48hr in DM was 31.5% for 10⁶/ml and 30.0% for 10⁴/ml of sperm and that in modified F₁₂ medium was 26.0% for 10⁶/ml and 22.3% for 10⁴/ml of sperm.
3. Using the sperm from intact uterus, cleavage rate of fertilized ova showed same tendency as those shown with ligated uterus. The rate was 82.0% for 10⁶/ml and 66.5% for 10⁴/ml of sperm in DM and was 69.0% for 10⁶/ml and 56.5% for 10⁴/ml of sperm in the medium.
4. When normal ova up to 48hr after IVF were cultured for 4 days in either DM or modified F₁₂ medium, ova developed to blastocyst stage showed higher rate in the groups of higher sperm concentration in the both media. The rate was 80.9% and 60.0% for 10⁶/ml and 10⁴/ml of sperm in DM and 91.7% and 71.4% for 10⁶/ml and 10⁴/ml of sperm in the modified F₁₂ medium, respectively.
5. Rate of implantation after transfer of 4- or 8-cell embryos was 36.8%.

I. 緒 論

Austin(1951)과 Chang(1951)에 의하여 토끼精子가 암컷의 生殖器道 내에서 受精獲得이 先行되어야 卵子和 受精能力을 갖게 된다는 사실이 보고된 이후

아직까지도 受精能獲得 내지는 尖體反應의 機轉이 잘 설명되지 못하고 있다. 토끼精子의 體內受精能獲得 소요시간에 관한 보고를 보면 Chang(1955)은 발정토끼의 子宮에서 5~6 시간이라고 하였으나 受精能獲得 소요시간은 여러가지 요인에 따라 다르게

보고되어 왔다.

Adams와 Chang(1962)은 卵管보다 子宮에서 受精能獲得이 더 빠르며 偽妊娠 토끼子宮에서는 더욱 많은 시간이 소요된다고 하였고 Soupart(1967)는 受精能獲得 정도가 子宮內膜의 기능과 관련이 있다고 하였다. 또한 Bedford(1969)는 토끼에서는 卵管과 子宮이 受精能獲得에 함께 작용하기 때문에 子宮이 卵管과 분리된 때는 교배후 11시간이 소요되는 정상 시간보다도 늦게 15~16시간이나 소요됨을 보고한 바 있다.

한편 受精能獲得精자를 이용한 實驗動物의 體外受精에 관한 연구에서 실제 受精部位에 도달되는 정자수는 射出精子數에 비해 극히 일부인데 비해(Braden 등, 1954) 일반적으로 이보다 훨씬 많은 精子數로서 연구되고 있으며 注入精子數의 결정이 연구자마다 일관성이 없고 독자적인 경우가 많다. 그러나 體外受精時 注入되는 精子數에 대한 중요성이 원키(Niwa와 Chang, 1974 a, b; Tsunoda와 Chang, 1975), 웰스터(Talbot 등, 1974), 생키(Fraser와 Drury, 1975; Wolf와 Inoue, 1976) 그리고 토끼(Brackett 등, 1971; Lambert와 Hamner, 1975; Lambert 등, 1978)에서 보고되었다.

體內受精能獲得精자와 體外受精시킨 受精卵의 移植 結果를 보면 Brackett 등(1972)은 31個 受精卵을 4 匹에 이식하여 22.6%의 수정란이 임신되었고 Mills 등(1983)은 83個를 14 匹에 이식하여 27.7%의 受精卵의 着床과 18.0%의 分娩, 그리고 Seidel 등(1976)은 177個 受精卵中 25.4%의 착상과 14.7%의 分娩成績을 얻었다. 한편 體外受精能獲得精자와 體外受精시켜 얻어진 受精卵의 移植結果에서는 Brackett와 Oliphant(1975)가 176個 受精卵을 14 匹에 移植 13.1%의 着床, Brackett 등(1982)은 39個 受精卵을 3 匹에 이식하여 17.9%의 子兔를 생산한 바 있다.

본 연구는 토끼정자의 體內受精能獲得을 위한 子宮條件의 영향, 體外受精時 精子濃도와 培養液의 영향 및 體外 受精卵의 發達狀態와 移植後 着床率을 比較 檢討하고자 실시하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 供試動物

本 實驗에서 採卵 및 精子의 子宮內 受精能獲得 用으로 供試된 未經産 암토끼는 체중 2.5~3.0kg,

精液採取 또는 交尾用으로 供試된 수토끼는 체중 3.5~4.0kg되는 성숙한 New Zealand white 種이었다.

2. 供試動物의 管理

1 일 200~250g의 토끼용 pellet 사료를 2 회로 나누어 給與하였고 물은 자유급수시켰다. 明暗시간은 14:10으로 조정하였으며 암토끼는 偽妊娠을 방지하기 위하여 供試하기 25일 전부터 개별 사육 관리하였다.

2. 精液採取 및 檢査

精液採取 間隔을 週 2 회로 하였고 精液採取前 假乘 駕시킨 뒤 人工腔로 採취하였다. 採取後 精子의 活力과 精子의 濃度를 檢査한 후 精液性狀이 양호한 3~4 마리의 精液을 混合하여 供試하였다.

4. 精子의 體內受精能獲得과 尖體反應 檢査

受精能獲得은 두가지 방법으로 區分하여 比較 調査하였다.

1) 結扎子宮內 精子注入: 암토끼에 HCG 100IU 를 靜脈內 주사한 후 1.5~2 시간 뒤에 마취시키고 開腹하여 子宮 卵管 接合部와 子宮頸管部位를 각각 結扎하고 준비된 混合精液을 注入하였다. 精液注入 12~14 시간 후에 도상하여 子宮內 精子를 회수하였다.

2) 自然交尾方法: 過排卵 처리된 암토끼를 精液性狀이 양호한 수토끼 2~3 마리와 3~4 회 자연 교미시킨 후 12~14 시간 뒤에 도상하여 子宮內 精子를 회수하였다.

3) 尖體反應 檢査: 精子를 採取하여 원심분리 직후의 混合精液과 子宮에서 회수된 精子를 Wells 와 Awa(1970) 방법에 따라 塗沫染色하여 尖體상태를 調査하였다. 즉 38°C로 가온된 슬라이드 위에 정자 부유액과 염색액을 동량 취하여 1 분간 정지시킨 후 혼합하여 塗沫乾燥시킨 후 1,000 배하에서 尖體가 消失된 精子를 尖體反應 精子로 하여 百分率을 구하였다.

5. 採卵方法

過排卵誘起를 위하여 FSH 0.5mg을 1 일 12 시간 간격으로 2 회씩 3 일간 총 3.0mg을 皮下注射하고 최종 FSH 주사후 24 시간에 HCG 200IU를 정맥내로 주사함과 동시에 精液注入用 피켓으로 交尾자극

을 주었다. 採卵은 HCG 주사후 16~17시간에 도달하여 子宮을 분리한 다음 37°C 항온실에서 上向性 채란법으로 채란하였고 즉시 卵子를 1 개씩 분리하여 3 회 배양액으로 세척하여 培養液滴에 옮겼다.

6. 體外受精

1) 培養液: 體外受精用 培養液은 Defined medium(이하 DM, Brackett와 Oliphant, 1975)과 Ham's F₁₂(GIBCO, Lab)를 약간 수정한 修正 F₁₂ 培養液을 사용하였다. 修正 Ham's F₁₂ 培養液(이하 수정 F₁₂)은 培地粉末 1.06g, NaHCO₃ 0.21g, glucose 0.18g, BSA 0.3g을 100ml에 용해하여 잘 혼합한 후 pH 7.7로 조정하였다. 培養液은 배 실험때마다 제조하였고 사용직전에 1.22 μ m millipore filter로 여과하여 사용하였다. petri dish(Falcon plastics #1006)에 滴을 만든 후 5% CO₂, 95% air, 38°C로 유지된 CO₂ incubator에서 2 시간 平衡시켜 사용하였다.

2) 精子注入: 結札子宮으로부터 회수된 精子注入을 위하여는 petri dish내에 DM 또는 수정 F₁₂ 배양액 0.25ml 滴을 만들고 그 안에 6~8 개의 卵子를 넣은 다음 體外受精 培養液内の 精子濃度가 10⁶/ml과 10⁴/ml이 되도록 조정된 정자부유액 약 0.05 ml을 滴에 注入하고 培養하였다. 한편 自然交尾子宮으로부터 회수된 精子의 注入을 위하여는 먼저 petri dish에 10~15개씩의 卵子를 넣은 다음 정자 부유액 약 1 ml를 넣으면서 총배양액 내에 精子濃度가 10⁶/ml과 10⁴/ml이 되도록 조정하기 위하여 體外受精 培養液을 추가 첨가하였다. 卵子에 精子注入이 끝난 후 그 위에 paraffin oil을 덮고 CO₂ incubator에서 일정시간 배양하였고 精子注入 후 48시간에 卵子의 正常卵割상태를 기준으로 受精與否를 判定하였다.

7. 受精卵의 移植

體外受精後 4 내지 8 細胞期에 도달된 受精卵을 同期化된 受卵兔의 卵管漏斗部에 micropipette로 移植하였다. 受卵兔의 同期化는 供卵兔의 HCG 投與와 같은 날에 GnRH 1 μ g를 皮下注射하였으며 그 후 1.5~2일에 腹正中線을 절개하여 子宮狀態와 排卵點을 확인한 후에 受精卵을 移植하였다.

III. 實驗成績 및 考察

1. 精子의 體內受精能獲得

두가지 方法, 즉 結札子宮과 自然交尾子宮에서 12~14시간이 지난 뒤에 회수된 精子의 尖體反應은 表 1 과 같이 각각 83.0%와 65.7%로 배양전보다 크게 높아졌다. 그리고 자연교배자궁보다는 結찰자궁내에서 배양된 精子의 尖體反應률이 다소 높은 경향이 있었다. 結札子宮內에서 培養된 精子의 尖體反應이 높은 결과는 Soupart와 Orgebin-crist(1966), Soupart(1967)가 자연교미 토끼 자궁에서보다 結찰된 토끼의 子宮에서 精子의 受精能獲得이 늦었다는 보고와 Bedford(1969)가 卵管과 子宮을 外科的으로 분리시킨 子宮에서 正常子宮보다 受精能獲得 소요 시간이 지연되었다는 보고와는 다른 결과였다. 그러나 이들의 결과는 직접 난자와의 수정율에 근거한 결과이기 때문에 본 실험의 精子染色法은 측정 방법에 다소 차이가 있을 수 있으며, 한편 본 실험에서 結찰자궁내 정자의 소실이 개체간에 차이가 있었고 동시에 結札시킨 자궁의 상태가 Bedford(1969)와 같은 外科的 方法이 아니었던 점, 그리고 過排卵시킨 토끼였던 점 등의 여러가지 조건들이 尖體反應에 영향을 주었기 때문으로 생각된다. Overstreet와 Cooper(1979)도 排卵과 함께 일어나는 內分

Table 1. Percent acrosome reaction of ejaculated spermatozoa inseminated into ligated or intact uterus

Method of capacitation	No. of replicates	% Acrosome-reacted spermatozoa
Before capacitation	3	16.3 \pm 2.3
In ligated uterus	3	83.0 \pm 5.0
In intact uterus	3	65.7 \pm 1.5

Spermatozoa without acrosomal caps after staining were expressed as acrosome-reacted spermatozoa.

泌 변화에 따라 子宮內 尖體反應 정도에 차이가 많다고 보고한 바 있다.

2. 體外受精率

卵割에 의한 受精率을 結札子宮으로부터 회수한 精子에 의하여 培養液 및 注入된 精子의 濃度別로 體外受精率을 조사한 결과는 표 2와 3과 같다. 즉 DM에서 48시간 배양후까지의 卵割率은 10^6 /ml區가 31.5%, 10^4 /ml區가 30.0%였으며 修正 F_{12} 배양액에서의 卵割率은 10^6 /ml區와 10^4 /ml區에서 각각 26.0%와 22.3%였다. 이상에서 볼 때 培養液間에는 수정 F_{12} 배양액보다 DM이 약간 높았으며 精子濃度間에는 10^6 /ml區가 10^4 /ml區보다 약간 높았으나 이들 각 比較區間에 큰 차이는 없었다. 자연교배 자궁내에서 회수된 精子에 의한 體外受精率은 표 3에서와 같이 DM에서 48시간 培養후의 卵割率은 10^6 /ml區가 82.0%, 10^4 /ml區가 66.5%였으며, 修正 F_{12} 배양액에서는 각각 69.0%와 56.5%로서 10^6 /ml 區가 10^4 /ml 區보다 역시 약간 높았다. 그러나 표 2와

3의 결과를 비교해 볼 때 자연교미 자궁내의 精子가 두가지 培養液과 精子의 濃度에서 모두 卵割率 이 높았다. 結札子宮내의 精子에서 이와 같이 自然交尾子宮내의 精子보다 卵割率이 낮은 이유는 앞에서 언급한 바와 같이 結札子宮精子가 正常子宮의 精子보다 受精率이 낮았다고 한 Soupart와 Orgebin-crist (1966) 및 Bedford(1969)의 결과와 일치된다. 한편 Soupart (1967)가 HCG 투여 또는 交尾刺戟에 기인된 下垂體로부터의 LH 방출효과가 子宮內 精子의 受精能獲得과 관계가 있다고 한 점으로 보아 자연교미자궁 정자에서 卵割率이 높았던 것은 LH의 効果와 관련이 있다고 할 수 있겠으나 그는 과도한 HCG투여는 오히려 受精能獲得 소요시간을 연장시킬 수도 있다고 하였다.

한편 Nishimura 등(1982)은 흰쥐에서 子宮內 受精能獲得精子를 注入전에 회석할 경우 受精率이 현저히 감소됨을 보고하였는데 본 실험에서는 結札子宮 精子를 卵子培養液에 넣기 전에 精子濃度を 조절

Table 2. In vitro fertilization rate at 48 hr after insemination with spermatozoa capacitated in ligated uterus

IVF Medium	Sperm concentration (sperm/ml)	No. of trials	No. of ova	No. of ova cleaved	% Normal cleavage
Defined medium	10^6	2	16	5	31.5 ± 6.5*
	10^4	2	17	5	30.0 ± 8.0
	Total		33	10	30.8 ± 4.2
Modified F_{12}	10^6	2	19	5	26.0 ± 4.0
	10^4	2	18	4	22.3 ± 21.8
	Total		37	9	24.1 ± 9.1

*Mean ± SE.

Table 3. In vitro fertilization rate at 48 hr after insemination with spermatozoa capacitated in intact uterus

IVF Medium	Sperm concentration (sperm/ml)	No. of trials	No. of ova	No. of ova cleaved	% Normal cleavage
Defined medium	10^6	3	35	20	82.0 ± 11.0*
	10^4	2	27	21	66.5 ± 16.5
	Total		62	41	74.3 ± 7.8
Modified F_{12}	10^6	3	32	22	69.0 ± 4.2
	10^4	2	12	7	56.5 ± 6.5
	Total		44	29	62.8 ± 6.3

*Mean ± SE.

하였던 점으로 보아 그 과정이 卵割率의 低下 원인이 되었을 가능성도 없지 않다. 표 3에서 自然交尾子宮에서 회수된 精子를 $10^4/\text{ml}$ 注入시켰을 때의 卵割率은 토끼에서 Brackett 등(1971)과 Lambert 등(1978)이 $4 \sim 5 \times 10^4/\text{ml}$, Siddiquey와 Cohen(1982)이 생쥐에서 $4 \times 10^4/\text{ml}$, 그리고 Nishimura 등(1982)이 흰쥐에서 $1 \sim 3 \times 10^4/\text{ml}$ 로서 각각 최적 受精率을 얻었다고 한 보고들보다는 약간 낮은 결과였으며 한편 $10^6/\text{ml}$ 주입시의 卵割率은 Niwa와 Chang(1974 a, b)이 흰쥐에서 $3 \sim 12 \times 10^5/\text{ml}$, 그리고 Talbot 등(1974)이 햄스터에서 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 주입했을 때 좋은 결과였다고 한 것과 비교해 볼 때도 다소 낮은 결과였다. 그러나 Wolf와 Inoue(1976)가 생쥐에서 $10^5/\text{ml}$ 이하 주입에서 受精率이 저하된다는 것보다는 다소 높은 결과였다.

3. 體外受精卵의 發達

自然交尾子宮內에서 培養 후 회수된 精子로 體外受精시킨 후 48시간 배의 正常卵子를 재수 4일간 즉 精子注入後 6일까지 培養시킨 결과는 표 4와 같다. 즉 DM에서 $10^6/\text{ml}$ 와 $10^4/\text{ml}$ 의 精子濃度로 體外受精시킨 경우 胚盤胞까지 發達한 卵子는 각각 80.0%와 60.0%였으며 修正 F₁₂ 배양액에서도 각각 91.7%와 71.4%로서 두 培養液에서 모두 $10^6/\text{ml}$ 濃度區에서 좋은 경향이었다. 한편 두 培養液間의 卵割率에서는 DM이 수정 F₁₂ 培養液보다 약간 높았고, 胚盤胞까지 發達된 受精卵數와 發達성도는 DM에서보다 수정 F₁₂ 배양액에서 높았으나 발달상태는 오히려 DM에서 빠른 경향이었다. 본 실험에서 $10^6/\text{ml}$ 區가 卵割率이나 다소 높았던 것은 앞에서 언급한 바

와 같이 $10^4/\text{ml}$ 區 보다 $10^6/\text{ml}$ 區가 더 적정 정자주입 수준이었던 것으로 생각된다. 한편 두 培養液間의 卵割率이 DM에서 다소 높았던 결과는 Seidel 등(1976)의 결과와 같았다. 그런데 DM에서보다 수정 F₁₂ 배양액에서 胚盤胞까지의 발달이 많았으나, 발달상태가 오히려 DM보다 낮았던 이유는 분명치 않았다. 다만 이와 같은 차이의 원인이 精子의 體外受精能 획득조건 또는 注入精子數의 차이에 기인되었는지 보다는 培養液組成의 差異에 기인하는 것 같다. 그 증거로서 Written과 Biggers(1968)가 DM만으로는 생쥐卵子가 胚盤胞까지 발달하는데 제한을 받는다는 보고가 있으며 Kane와 Foote(1970)가 토끼 卵子培養液 Hams F₁₀에 1.5% BSA 첨가로 양호한 결과를 얻었으며, 한편 Kane(1975)은 卵子發育中 胚盤胞形成에 carbonate가 필수적 성분임을 보고하였고 bicarbonate가 없을 때 胚盤胞로의 발달이 불가능하다고 하였다. Seidel 등(1976)도 培養液의 滲透壓, bicarbonate 및 아미노酸, 미량성분의 차이가 卵子發達에 영향을 미침을 보고한 바 있다. 본 실험에서도 두가지 培養液間에 sodium bicarbonate 수준의 차이가 있었다.

4. 受精卵의 移植

體外受精시킨 후 24時間 體外培養으로 4 또는 8細胞期에 도달된 정상 受精卵을 發情同期化된 受卵兎에 移植한 결과는 표 5와 같다. 1首에서는 9個 受精卵 중 7個가 着床되었고 移植 14日까지 正常發達을 보여주었고, 10個 受精卵을 이식한 1首에서는 모두 着床되지 못하여 着床率은 36.8%였다. 이 결과는 Brackett 등(1972)의 22.6%, Mills 등(1973)의

Table 4. Development of embryo from 48 hr to 6 days insemination

IVF Medium	Sperm concentration (sperm/ml)	No. of trials	No. of 48hr-egg* (A)	Stage of blastocyst			Total (B)	B/A (%)
				Early blastocyst (%)	Late blastocyst (%)	Hatching or hatched blastocyst (%)		
Defined medium	10^6	2	20	3 (18.8)	8 (50.0)	5 (31.3)	16(100)	80.0
	10^4	2	21	4 (33.0)	8 (67.0)	0 (0.0)	12(100)	60.0
	Total		41	7 (25.0)	16(57.1)	5 (17.9)	28(100)	68.3
Modified F ₁₂	10^6	2	12	7 (63.6)	3 (27.3)	9 (9.0)	11(100)	91.7
	10^4	2	7	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	5 (100)	71.4
	Total		19	11 (68.8)	4 (25.0)	1 (6.0)	16(100)	84.2

*Eggs were fertilized with spermatozoa capacitated in intact uterus.

Table 5. Implantation of embryo fertilized in vitro

No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of embryos implanted up to 14 days
19	2	7 (36.8%)

27.7%, 그리고 Seidel등(1976)의 25.4%, Brackett와 Oliphant(1975)의 13.1%의 着床率보다 다소 높은 成績이었다.

IV. 摘 要

家畜의 體外受精試驗의 일환으로 體內受精能獲得精子에 의한 體外受精試驗을 위하여 New Zealand 백색종 토끼를 실험동물로 사용하였다. 精子의 體外受精能獲得을 위한 子宮條件의 영향, 體外受精率에 대한 注入精子濃度와 培養液의 영향 및 體外受精卵의 發達狀態와 移植후의 착상율을 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 染色法에 의한 精子의 尖體反應率이 結紮子宮과 自然交尾子宮에서 회수한 精子에서 각각 83.0%와 65.7%였다.
2. 結紮子宮에서 회수한 精子로 수정된 난자의 卵割率은 DM과 높은 정자농도區에서 修正 F₁₂나 낮은 정자농도區보다 높았고 DM과 修正 F₁₂에서 10⁶과 10⁴精子注入後 48시간때의 卵割率은 각각 31.5%와 30.0%, 26.0%와 22.3%였다.
3. 自然交尾子宮에서 회수한 精子의 경우도 受精卵의 卵割率이 結紮子宮의 精子와 같은 경향으로서 DM과 修正 F₁₂에서 10⁶과 10⁴精子注入後 48시간에서 각각 82.0%와 66.5%, 69.0%와 56.5%였다.
4. 體外受精 48시간까지의 正常卵子를 DM에서 4일간 배양시킬 때 胚盤胞까지 발달한 受精卵이 두 培養液에서 모두 精子가 많이 注入된 卵子에서 많았으며 DM과 修正 F₁₂에서 10⁶과 10⁴精子注入의 경우 각각 80.0%와 60.0%, 91.7%와 71.4%였다.
5. 體外受精卵의 이식후 着床率은 36.8%였다.

V. 引用文獻

1. Adams, C.E. and M.C. Chang. 1962. Capacitation of rabbit spermatozoa in the Fallopian tube and in the uterus. *J. Exp. Zool.*, 151: 159.
2. Austin, C.R. 1951. Observations on the penetra-

tion of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B.*, 4: 581-596.

3. Bedford, J.M. 1969. Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 8: 19-26.
4. Brakett, B.G., D. Bousquet and M.A. Dressel. 1982. In vitro capacitation and in vitro fertilization with normal development in the rabbit. *J. Androl.*, 3: 402-411.
5. Brackett, B.G., D.E. Killen and M.D. Peace. 1971. Cleavage of rabbit ova inseminated in vitro after removal of follicular cells and zonae pellucidae. *Fertil. Steril.*, 22: 816-828.
6. Brackett, B.G., J.A. Mills and G.G. Jeitles. 1972. In vitro fertilization of rabbit ova recovered from ovarian follicles. *Fertil. Steril.*, 23: 898-909.
7. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation or rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12: 260-274.
8. Braden, A.W.H., C.R. Austin and H.A. David. 1954. The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7: 391-409.
9. Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature, Lond.*, 163: 697.
10. Chang, M.C. 1955. Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature, Lond.*, 175: 1036.
11. Fraser, S.R. and L.M. Drury. 1975. The relationship between sperm concentration and fertilization "in vitro" of mouse eggs. *Biol. Reprod.* 13: 513-518.
12. Kane, M.T. and R.H. Roote. 1970. Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133: 912-915.
13. Kane, M.T. 1975. Bicarbonate requirements for culture of one-cell rabbit ova to blastocysts.

- Biol. Reprod., 12: 552-555.
14. Lambert, R.D. and C.E. Hammer. 1975. In vitro fertilization of rabbit eggs in oviduct secretions from different days before and after ovulation. *Fertil. Steril.*, 26: 660-664.
 15. Lambert, R.D., S.G. Blanchette and M. Tourigny. 1978. The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of rabbit ova. *Anim. Reprod. Sci.*, 1: 43-47.
 16. Mills, J.A., G.G. Jeitles and B.G. Brackett. 1973. Embryo transfer following in vitro and in vivo fertilization of rabbit ova. *Fertil. Steril.*, 24: 602-608.
 17. Nishimura, H., K. Niwa, M. Miyake and A. Iritani. 1982. The effects of sperm concentration during preincubation and at insemination on fertilization of rat eggs in vitro. *J. Exp. Zool.*, 223: 75-78.
 18. Niwa, K. and M.C. Chang. 1974a. Effects of sperm concentration on the capacitation of rat spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 189: 353-356.
 19. Niwa, K. and M.C. Chang. 1974b. Optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa for fertilization in vitro of rat eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 40: 471-474.
 20. Overstreet, J.W. and G.W. Cooper. 1979. The time and location of the acrosome reaction during sperm transport in the female rabbit. *J. Exp. Zool.*, 209: 97-104.
 21. Seidel, G.E., R.A. Bowen and M.T. Kane. 1976. In vitro fertilization, culture, and transfer of rabbit ova. *Fertil. Steril.*, 27: 861-871.
 22. Siddiquey, A., K.S. and J. Cohen. 1982. In vitro fertilization in the mouse and the relevance of different sperm/egg concentrations and volumes. *J. Reprod. Fertil.*, 66: 237-242.
 23. Soupart, P. 1967. Studies on the hormonal control of rabbit sperm capacitation. *J. Reprod. Fert.*, 2(Suppl.); 49-63.
 24. Soupart, P. and M.C. Orgebin-crist. 1966. Capacitation of rabbit spermatozoa delayed in vivo by double ligation of uterine horn. *J. Exp. Zool.*, 163: 311-318.
 25. Talbot, P., L.E. Franklin and E.N. Fussell. 1974. The effect of the concentration of golden hamster spermatozoa on the acrosome reaction and egg penetration in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 36: 429-432.
 26. Tsunoda, Y. and M.C. Chang. 1975. Penetration of mouse eggs in vitro: Optimal sperm concentrations and minimal number of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 44: 139-142.
 27. Wells, M.E. and O.A. Awa. 1970. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 53: 227-232.
 28. Wolf, D.P. and M. Inoue. 1976. Sperm concentration dependency in the fertilization and zona sperm binding properties of mouse eggs inseminated in vitro. *J. Exp. Zool.*, 196: 27-38.
 29. Written, W.K. and J.D. Biggers. 1968. Complete development in vitro of the pre-incubation stages of the mouse in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.*, 17: 399-401.