

Zona Drilling 處理된 생쥐 卵자의 體外受精과 發達에 關한 研究

李相鎭 · 李貞載* · 朴欽大** · 崔暎文*** · 丘秉參* · 丁泰榮 · 鄭吉生

建國大學校 畜産大學 · 高麗大學校 醫科大學*

大邱大學校 工科大學** · 東亞大學校 農科大學***

In Vitro Fertilization and Development of Zona-Drilled Mouse Oocytes

Lee, S. J., J. J. Lee*, H. D. Park**, K. M. Choi***
P. S. Ku*, T. Y. Chung and K. S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

* College of Medicine, Korea University

** College of Engineering, Dae-Gu University

*** College of Agriculture, Dong-A University

SUMMARY

These experiments were carried out to investigate fertilizable and developmental ability after zona drilling the unfertilized eggs and the eggs not fertilized by the 1st insemination.

The results of *in vitro* fertilization of the mouse eggs treated by using micromanipulation and acid tyrode's solution with capacitated epididymal spermatozoa were as follows.

In the case of ovulated unfertilized eggs, according to sperm count (10^6 , 10^5 , 10^4 and 10^3 /ml) the rates of *in vitro* fertilization treated by zona drilling were 86.0%, 82.0%, 70.0% and 54.0%, respectively, and those of control were 58.0%, 52.0%, 12.0% and 8.0%, respectively.

The rates of *in vitro* fertilization of zona drilled eggs were significantly high compared with those of control, and there were no significant difference between two groups.

According to the sperm count the zona drilled eggs developed to the blastocysts were 51.4%, 40.5%, 23.3% and 17.4% and those of control were 35.7%, 26.3%, 0% and 0%, respectively.

Also, in the eggs not fertilized by 1st insemination, the fertilization rates of oocytes reinseminated after zona drilling was significantly higher (83.5%) than that of control (34.7%), and the rates of polyspermy were similar.

The rates of development to the blastocysts was 18.6% in the zona drilling treated eggs, and that of control was 27.3%, there was no significant difference between two groups.

These results indicated that oocytes not fertilized by 1st insemination as well as ovulated unfertilized eggs could be fertilized, improved fertilizing rates by zona drilling treatment, and development potential were normal.

I. 緒 論

卵巢에서採取한未成熟卵자를體外에서培養할 경우에는zona hardening이誘起되어精자의卵子內侵入이억제된다(Schmell과Gulyas, 1980; De Felici와Siracusa, 1982; De Felici等, 1985; Gianfortoni와Gulyas, 1985; Downs等, 1986). 따라서培養液內에Serum(Downs等, 1986)이나Glycosaminoglycan(De Felici等, 1985)을添加하거나卵丘細胞와共同培養(De Felici와Siracusa, 1982; Gianfortoni와Gulyas, 1985)을하든지 아니면透明帶를除去(Fukuda와Chang, 1978; Yanagimachi, 1984)하여受精을실시해야한다. 특히透明帶를除去하여受精에供試할 경우에는卵자에대한精자의比率을 현저하게 감소시킬 수 있다는 잇점은 있지만(Fukuda와Chang, 1978; Thadani, 1982),透明帶는多精子侵入을放止하고(Barros와Yanagimachi, 1972),着床前卵자의輸送이나保護 등과같은重要な機能을遂行(Gwatkin, 1982)하기 때문에透明帶가除去된卵자는受精後의發生에問題가 있다(Bowman과McLaren, 1970).

이러한問題點을 해결하고,授精時低濃度の精子로도 높은體外受精率을 얻을 수 있는方法을Gordon과Talansky(1986, 1988)가開發하였다. 즉 이들은微細操作法과Acid Tyrode溶液을併用한zona drilling技法으로透明帶에 작은구멍을만들어,透明帶의生物學的機能과卵자의生存성에損傷을주지 않으면서 높은體外受精率과胚發達率을 얻을 수 있었다고報告하였으며精子稀少症과같은男性不妊症의治療手段으로도活用할 수 있다는 점을示唆한 바 있다.

또Conover와Gwatkin(1988)은精子가Acid Tyrode溶液에 의하여形成된透明帶의 작은구멍으로 들어가서 실제로受精을誘導하는지의 여부를,精자의受容體인ZP3(zona pellucida 3)의Monoclonal Antibody를 사용하여確認함으로써,透明帶에 대한自家抗體가不妊의原因이라고 생각되는不妊女性의治療手段으로도利用될 수 있다는可能性을提示하였다.

한편Zona Drilling處理는體外成熟에 의해透明帶의hardening現象이誘起된회귀의卵子에서도體外受精率을有意하게 높였다는報告도 있다(Vanderhyden 등, 1989).

그러나Malter와Cohen(1989)은Acid Tyrode溶液을噴射하여透明帶를溶解하는時間이人間卵자는생쥐나회귀보다도 길고, 이로 인한卵자의細胞質損傷때문에受精된卵자는胚盤胞段階까지 제대로發達하지 못한다고報告함으로써zona drilling技法의效用性에 대하여疑問을提起하였다.

本 研究에서는排卵直後에zona drilling處理를실시한卵자와,第一次授精後回收된未受精卵자에 대하여zona drilling을 실시하여再授精을 실시함으로써體外受精과胚發達에 미치는zona drilling의效果를檢討하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

供試動物로는ICR系統의생쥐를사용하였는데雌性생쥐는생후4~6주령,體重15~25g이었고,雄性생쥐는생후10~14주령,體重30~45g이었다.

飼育條件으로서,日照時間은14時間(午前8時~午後10時)으로調節하였으며,固型飼料과물은무제한給與하였다.

2. 培養液

本 研究에 사용된培養液으로는3mg/ml의BSA(Bovine Serum Albumin; Sigma, U.S.A)가添加된修正Tyrode溶液(李와鄭, 1989)을基礎培養液으로 사용하였다. 먼저精子處理와體外受精用培養液은基礎培養液을 그대로 사용하였고, zona drilling處理를 위한培養液은25mM의Hepes(N-2-Hydroxy Ethyl Piperazine-N-2-Ethane Sulfonic Acid; Gibco, U.S.A)가 함유된基礎培養液이었으며,受精된卵자의體外培養에는基礎培養液에100 μ M의EDTA(Junsei Co., Japan)를添加한 것을 사용하였다. 이들培養液의pH는7.3~7.4,滲透壓은290~300mOsm로調整하였으며,使用

直前に 0.45 μ m의 Millipore filter (German Science Inc., U.S.A)를 사용하여 除菌한 후, 소량씩 분주하여 4°C 냉각고에서 2 주일 동안 보관하면서 사용하였다.

3. 精子和 卵자의 準備

1). 精자의 處理

雄性 생쥐를 屠殺하여 精巢上體 尾部만을 剔出한 후, 精子 浮遊用 培養液 小適(0.4 ml)이 들어있는 Petridish (Falcon Co., U.S.A) 내의 流動 Paraffin Oil (Shinyo Co., Japan)에 精巢上體尾部를 沈積한 다음 實體顯微鏡下에서 解剖針으로 精巢上體 尾部를 切開하여 漏出된 精子塊를 培養液 小滴으로 誘導하여 精子 浮遊液을 準備하였다. 精자의 受精能獲得을 위하여 精子 浮遊液을 5% CO₂, 95% 空氣 條件下的 CO₂ 培養器에서 1.5~2 時間 동안 培養하였다.

2) 過排卵處理 및 卵자의 回收

雌性 생쥐의 腹腔에 PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin; Intervet, Holland)와 hCG (Human Chorionic Gonadotropin; Sigma, U.S.A)를 각각 5 IU 씩 48 時間 간격으로 주사하여 過排卵을 誘導하였다.

hCG 주사 후 14~16 시간째에 생쥐를 屠殺하여 卵管을 剔出한 다음, 培養液 小滴이 들어있는 petridish 내의 流動 paraffin oil 속에 沈積하여 實體顯微鏡下에서 解剖針으로 卵管膨大部에서 卵丘細胞에 둘러싸인 卵자를 回收하였다. 回收된 卵자의 一部는 正常的인 體外受精에 供試한 다음 受精되지 않은 卵자만을 回收하여 zona drilling 處理에 供試하였고, 다른 一部의 卵자는 0.1% hyaluronidase 溶液으로 卵丘細胞만을 除去한 다음 그대로 zona drilling 處理에 供試하였다.

4. Zona Drilling 處理

微細操作은 micromanipulator (M & M Co., U.S.A)를 Inverted Microscope (Olympus, Japan)에 장치하여 실시하였다.

卵자 保定用 Pipette 과 drilling 用 Pipette 은 Micropuller (Narishige Co., Japan), Microforge (Narishige Co., Japan) 및 Microgrinder (Narishige Co., Japan)를 사용하여 製作하였다.

卵자 保定用 pipette 은 外徑이 75~80 μ m, 內徑

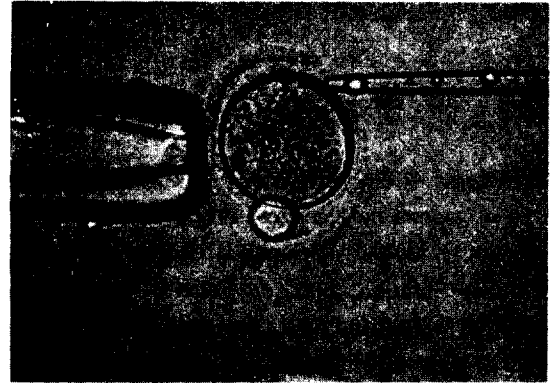


Fig 1. Showing small area of the zona pellucida is dissolved by using the micromanipulation technique and acid tyrode's solution.

이 25~30 μ m, drilling 用 pipette 은 Tip의 直徑이 10 μ m 가 되도록 製作하여 Alcohol 과 蒸溜水로 반부 세척한 후 사용하였다.

卵자의 drilling 處理는 卵丘細胞가 除去된 排卵直後의 卵자와, 正常的인 體外受精後 6 時間째에 回收된 受精되지 않은 卵자에 대하여 실시하였다. 즉 HEPES 가 함유된 zona drilling 用 培養液 小滴(0.4 ml)에 15~20 個의 卵자를 넣은 다음 micromanipulator 의 Holding pipette 으로 卵자의 極體가 12 時 또는 6 時 方向으로 향하게끔 卵자를 固定한 후, 미리 준비된 Acid Tyrode 溶液 (NaCl : 8.0 g/l, KCl : 0.24 g/l, MgCl₂ : 0.1 g/l 및 glucose : 1.0 g/l, pH 2.5)을 drilling 用 pipette 에 吸引하여 透明帶 부근에 까지 접근시키고, 이어 Acid Tyrode 溶液을 천천히 噴射하여 細胞質이 희미하게 보일 때까지 透明帶를 融解시켰다 (Fig. 1). Drilling 處理가 끝난 卵자는 回收하여 新鮮한 培養液으로 洗滌한 다음 體外受精에 供試하였다.

5. 體外受精

排卵直後에 zona drilling 處理된 卵자와, 第一次 授精後 受精되지 않은 未受精卵을 zona drilling 處理하여 體外受精用 培養液 小滴(0.4 ml)에 15~20 個씩 넣은 다음 精子濃도를 각각 10⁶/ml, 10⁵/ml, 10⁴/ml 및 10³/ml 이 되도록 調整하여 授精한 후 5% CO₂, 95% 空氣條件의 CO₂ 培養器內에서 6 時間 동안 培養하여 受精을 誘導하였다. 授精後 6 時間째에 卵자를 回收하여 中性 formalin 과 Lacmoid 溶液으로 固定·染色한 후, 位相差顯微鏡下에서 受

Table 1. Effect of zona-drilling on *in vitro* fertilization of mouse oocytes

Treatment	Conc. of sperm (sperm/ml)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertilized			No. of oocytes unfertilized (%)
			Total	Mono-spermic	Poly-spermic	
Control	10 ⁶	50	^b 29(58.0)	27(54.0)	2(4.0)	21(48.0)
Zona-drilled	10 ⁶	50	^c 43(86.0)**	40(80.0)	3(6.0)	7(14.0)
Control	10 ⁵	50	^b 26(52.0)	25(50.0)	1(2.0)	24(48.0)
Zona-drilled	10 ⁵	50	^{bc} 41(82.0)**	39(78.0)	2(4.0)	9(18.0)
Control	10 ⁴	50	^a 6(12.0)	6(12.0)	0	44(88.0)
Zona-drilled	10 ⁴	50	^{ab} 35(70.0)**	35(70.0)	0	15(30.0)
Control	10 ³	50	^a 4(8.0)	4(8.0)	0	46(92.0)
Zona-drilled	10 ³	50	^a 27(54.0)**	27(54.0)	0	23(46.0)

^{a, b, c.} Values with different superscripts between treatment groups are significantly different, P<0.05.

^{ab, b)} Values with different superscripts between control groups are significantly different, P<0.05.

** Significantly different from each control group, P<0.01.

精與否를 判定하였다.

6. 受精卵의 培養

授精後 6 時間째에 卵子를 回收하여 雌性 前核과 雄性 前核이 모두 觀察되는 受精卵만을 골라서 洗滌한 후 100 μM의 EDTA가 함유된 培養液 小滴(10~20 μl)으로 옮겨서 CO₂ 培養器에서 培養하면서 그 發達狀態를 觀察하였다.

III. 結果 및 考察

1. 생쥐 卵자의 體外受精에 미치는 Zona Drilling의 影響

Zona drilling 處理된 排卵直後の 생쥐 卵자의 精子濃度別(10⁶/ml, 10⁵/ml, 10⁴/ml 및 10³/ml) 受精率은 Table 1 과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 精子濃度(10⁶/ml, 10⁵/ml, 10⁴/ml 및 10³/ml)別 對照區와 處理區의 體外受精率은 각각 58.0, 52.0, 12.0 및 8.0%와 86.0, 82.0, 70.0 및 54.0%로 處理區의 成績이 有意하게 높았다(p<0.01). 또 對照區에 있어서도 精子濃度가 10⁶/ml 와 10⁵/ml 이었을 때의 受精率은 10⁴/ml 와 10³/ml 일 때의 것보다 有意하게 높았다(p<0.05). 이러한 현상은 處理區에서도 나타났는데, 精子濃度가 높으면 높을수록 受精率도 向上되었으며, 특히 精子濃度 10⁶/ml 區는 10⁴/ml 區나 10³/ml 區보다도 有意하게 높았다(p<0.05).

그러나 가장 낮은 10³/ml의 精子濃度에서도 50% 이상의 높은 受精率이 얻어졌다.

한편 多精子 侵入率은 精子濃度에 관계없이 對照區와 處理區에서 다같이 10% 이하로 낮았으며, 특히 精子濃度가 10⁴/ml 區와 10³/ml 區에서는 多精子 侵入이 전혀 일어나지 않았다.

本 試驗의 이러한 結果는 Gordon 과 Talansky (1986), Conover 와 Gwatkin(1988) 및 Talansky 와 Gordon(1988)의 성적과 거의 유사한 것이었다.

한편 흰쥐의 未成熟 卵子를 體外에서 成熟시켜 zona drilling 處理를 실시하여 體外受精을 誘導한 Vanderhyden 등(1989)은 多精子 侵入率이 높다고 報告했으나 Malter 와 Cohen(1989)이 Human 卵子에서 얻은 結果와 本 研究의 結果에서는 多精子 侵入率이 處理區나 對照區 사이에 有意差가 나타나지 않았다.

따라서 本 研究에서 사용한 zona drilling 技法은 적어도 생쥐 난자의 體外受精에 있어서는 受精의 效率을 增進시킬 수 있는 有用한 手段이라고 생각된다.

2. Zona Drilling 處理를 실시한 受精卵의 體外發生

Zona drilling 處理를 실시한 다음에 授精하였을 때 受精된 卵자의 精子濃度別 體外發生率은 Table 2에 提示된 바와 같다.

Table 2. *In vitro* development of mouse oocytes fertilized after zona-drilling

Treatment	Conc. of sperm (sperm/ml)	No. of oocytes fertilized/examined	No. (%) of oocytes developed to			
			2-cell	4-8 cell	Morula	Blastocyst
Control	10 ⁶	56/98	50(89.3)	43(76.8)	29(51.8)	20(35.7)
Drilled	10 ⁶	111/129	103(92.8)	92(82.9)*	^c 75(67.6)*	^b 57(51.4)
Control	10 ⁵	19/37	17(89.5)	14(73.6)	8(42.1)	5(26.3)
Drilled	10 ⁵	37/45	35(94.6)	28(75.7)	^{bc} 20(54.1)	^b 15(40.5)
Control	10 ⁴	5/44	5(100.0)	4(80.0)	2(40.0)	0
Drilled	10 ⁴	30/43	27(90.0)	23(76.7)	^{ab} 12(40.0)	^a 7(23.3)
Control	10 ³	3/44	3(100.0)	3(100.0)	1(33.3)	0
Drilled	10 ³	23/42	21(91.3)	14(60.9)	^{ab} 8(34.8)	^a 4(17.4)

^{a,b,c} Within each column, Values with different superscripts between treatment groups are significantly different, P<0.05.

* Significantly different from each control group, P<0.05.

Table 2에서 보는 바와 같이 精子濃度 10⁶/ml, 10⁵/ml, 10⁴/ml 및 10³/ml에서 受精된 卵子가 桑實胚로 發達하는 比率은 zona drilling 處理를 하지 않은 對照區에서는 각각 51.8, 42.1, 40.0 및 33.3% 였으나 zona drilling 處理를 실시한 處理區에서는 각각 67.6, 54.1, 40.0 및 34.8% 로 對照區보다 양호하였으며, 특히 10⁶/ml 區는 對照區보다 有意하게 증가하였다(p<0.05). 또 같은 處理區에 있어서도 10⁶/ml 區는 10⁴/ml 과 10³/ml 區보다도 有意하게 증가하였다(p<0.05).

胚盤胞까지의 胚發生率도 桑實胚의 경우와 비슷한 경향을 나타내었다. 즉 精子濃度 10⁶/ml, 10⁵/ml, 10⁴/ml 및 10³/ml에서 受精된 卵子가 胚盤胞까지 發達하는 비율은 對照區의 경우, 각각 35.7, 26.3, 0 및 0% 였으나 處理區의 경우는 각각 51.4, 40.5, 23.3 및 17.4% 로 對照區의 성적보다 높았고 處理區 중에서도 10⁶/ml 區와 10⁵/ml 區는 10⁴/ml 區와 10³/ml 區보다도 유의하게 높았다(p<0.05).

本研究의 結果에 의하여 zona drilling 處理를 받은 卵子도 胚盤胞 段階에 까지 發達할 수 있다는 Conover와 Gwatkin(1988)의 연구결과를 확인하는 것이었다.

한편 zona drilling 處理를 실시한 결과, 體外受精 卵子가 發達하는 과정에서 割球의 일부가 透明帶를 脫出하는 현상이 관찰되었는데, 이러한 현상은 zona drilling 處理時 Acid Tyrode 용액을 너무 많

이 사용했거나 아니면 장시간 처리하여 透明帶에 너무 큰 구멍이 생겼기 때문인 것으로 판단된다. 이 탈된 割球들은 계속 발달하여 2개의 胞胚腔을 形成하였는데, 이러한 사실로 보아 형태학적으로 非正常的인 割球는 아니었다고 생각된다.

3. 再授精된 卵자의 體外受精과 發達에 미치는 Zona Drilling 處理의 影響

排卵된 생쥐의 卵자를 體外受精시킨 후 6時間이 지나도 受精이 되지 않는 卵자를 回收하여 zona drilling 處理를 실시한 다음, 再授精을 실시하여 體外受精率과 胚發達率을 調査한 結果는 Table 3 과 4에서 보는 바와 같다.

Table 3은 受精되지 않은 卵자를 zona drilling 處理를 실시한 다음 再授精을 실시한 結果로서 이때의 精子濃度는 10⁶/ml 이었다.

Zona drilling 處理를 하지 않은 對照區의 受精率은 34.7% 였으나 zona drilling 處理를 한 處理區의 그것은 83.6% 로서 對照區보다 有意하게 向上되었다(p<0.01).

그러나 多精子 侵入率은 處理區나 對照區 다같이 5.0% 이하로서 양자 사이에 유의차는 없었다. 한편 受精된 卵子가 桑實胚나 胚盤胞로 發達하는 比率은 Table 4에서 보는 바와 같이 排卵直後에 受精된 卵子(Table 2)와는 反對의 傾向을 보였다. 즉 對照區의 그것은 각각 45.5와 27.3% 였으나 處理區의

Table 3. *In vitro* fertilization of zona-drilled mouse oocytes not fertilized at first insemination

Treatment	No. of oocytes subjected to reinsemination	No. of oocytes fertilized			No. of parthenogenetic oocytes(%)	No. of oocytes unfertilized(%)	No. of fragmented or degenerated(%)
		Total(%)	Mono spermic(%)	Poly spermic(%)			
Control	49	17(34.7)	16(32.7)	1(2.0)	0	31(63.3)	1(2.0)
Zona drilled	55	46(83.6)**	44(80.0)	2(3.6)	1(1.8)	8(14.5)	0

**Significantly different from control group, $p < 0.01$.

Table 4. *In vitro* development of zona-drilled mouse oocytes not fertilized at first insemination

Treatment	Conc. of sperm (sperm/ml)	No. of oocytes fertilized /reinseminated	No. (%) of oocytes developed to			
			2-cell	4-8-cell	Morula	Blastocyst
Control	10^6	22/60	22(100.0)	17(77.3)	10(45.5)	6(27.3)
Drilled	10^6	43/55	36(83.7)	25(58.1)	15(34.9)	8(18.6)

그것은 각각 34.9와 18.6%로서 오히려 對照區보다 處理區가 낮았지만, 有意差는 認定되지 않았다.

Table 3과 4에 의하여 再授精에 供試된 卵子가 正常的인 受精能과 胚發生能을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 다만, 對照區의 성적은 Table 1과 2의 그것보다 저조한 것이었는데 그것은 再授精에 供試된 卵子가 體外에서 培養될 때 誘起되는 透明帶의 자연적인 hardening 현상(De Felici와 Siracusa; 1982, 1985)에 기인하는 것으로 생각된다.

그렇지만 zona hardening 현상에도 불구하고 受精되지 않은 卵子를 zona drilling 處理를 실시하였을 때의 受精率은 正常排卵 卵子의 그것(Table 1)과 거의 일치하는 것이었다. 따라서 zona drilling 技法은 zona hardening 이 일어난 卵子의 體外受精率을 높일 수 있는 유효한 수단이라고 말할 수 있다.

한편 再授精된 卵子가 胚盤胞로 발달하는 比率(Table 4)은 排卵直後の 卵子가 受精되어 胚盤胞로 發達하는 比率(Table 2)과 比較하여 볼 때, 對照區에서는 큰 差異가 認定되지 않았다.

이러한 結果는 再授精된 卵子도 正常的인 發達能을 가지고 있다는 것을 示唆하였다.

이상의 結果를 종합하여 고찰할 때 zona drilling 技法이 생쥐 卵子의 體外受精率을 向上시킬 수 있는 유용한 수단이라는 것을 알 수 있다.

IV. 摘要

本 研究은 zona drilling 處理가 생쥐 卵子의 體外受精과 胚發達에 미치는 影響을 調査하기 위하여 實施하였다.

採卵直後の 卵子와 第一次 採精에 의하여 受精이 이루어지지 않은 未受精卵을 授試하여 微細操作法에 의해 Acid Tyrode 용액으로 透明帶의 一部에 작은 구멍을 만든 다음, 受精能을 獲得한 精巢上體尾部の 精子로 體外受精을 實施한 結果, 排卵直後の 未受精卵의 경우 精子濃度 $10^6/ml$, $10^5/ml$, $10^4/ml$ 및 $10^3/ml$ 區에 있어서의 受精率은 Zona drilling 處理區에서 각각 86.0, 82.0, 70.0 및 54.0% 인데 대하여 對照區의 그것은 각각 58.0, 52.0, 12.0 및 8.0% 로 後者가 前者보다 有意하게 높았다.

그러나 多精子 侵入率은 處理區와 對照區間에 有意差가 認定되지 않았다. 또 精子濃度에 따라 受精된 卵子가 胚盤胞로 發達하는 比率은 處理區의 경우 각각 51.4, 40.5, 23.3 및 17.4% 인데 대해 對照區의 그것은 각각 35.7, 26.3, 0 및 0% 로 處理區의 成績이 양호하였으나 處理區와 對照區間에는 精子濃度에 따른 有意差는 認定되지 않았다.

한편 第一次 授精에 의해 受精이 되지 않은 未受精卵에 대해 zona drilling 處理를 實施한 후 再授精을 하였을 때의 體外受精率은 83.5% 로서 對照區의 34.7% 보다 유의하게 높았으나 多精子 侵入率은 對照區와 類似한 傾向을 보였다. 그리고 受精된 卵子가 胚盤胞로 發達하는 比率은 處理區의 18.6% 에 비

해 對照區의 그것은 27.3% 로서 處理區가 낮았으나 유의차는 인정되지 않았다.

이러한 결과를 종합하여 고찰할 때 zona drilling 技法은 생쥐 卵자의 體外受精 成績을 向上시킬 수 있는 有用한 方法이라는 것을 알 수 있다.

V. 引用文獻

1. Austin, C.R. and A.W.H. Braden. 1986. *J. Exp. Biol.* 33 : 358.
2. Barros, C. and R. Yanagimachi. 1972. Polyspermy preventing mechanism in golden hamster eggs. *J. Exp. Zool.* 180 : 544-545.
3. Bowman, P. and McLaren, 1970. Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. *J. Embryol. Exp. Morph.* 23 : 693-704.
4. Conover, J.C. and R.B.L. Gwatkin. 1988. Fertilization of zona-drilled mouse oocytes treated with a monoclonal antibody to the zona glycoprotein, ZP 3. *J. Exp. Zool.* 247 : 113-118.
5. De Felici, M. and G. Siracusa. 1982. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. *Gamete Res.* 6 : 107-113.
6. De Felici, M., A. Salustri and G. Siracusa. 1985. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture II. The effect of follicular fluid and Glycosaminoglycans. *Gamete Res.* 12 : 227-235.
7. Downs, S.M., A.C. Schroeder and J.J. Eppig. 1986. Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing hardening of the zona pellucida. *Gamete Res.* 15 : 115-122.
8. Fukuda, Y. and M.C. Chang. 1978. Relationship between sperm concentration and polyspermy in intact and zona-free mouse eggs inseminated in vitro. *Arch. Androl.* 1 : 267-273.
9. Gianfortoni, J.G. and B.J. Gulyas. 1985. The effects of short-term in cubation (aging) of mouse oocytes on in vitro fertilization, zona solubility, and embryonic development. *Gamete Res.* 11 : 59-68.
10. Gorden, J.W. and B.E. Talansky. 1986. Assisted fertilization by zona drilling : a mouse model for correction of oligospermia. *J. Exp. Zool.* 239 : 347-354.
11. Gwatkin, R.B.L. 1982. Receptor for sperm on the mammalian ovum. In vitro Fertilization and Embryo Transfer. MTP Press Limited. P : 3-12.
12. Malter, H.E. and J. Cohen. 1989. Partial zona dissection of the human oocyte : a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fert. Steril.* 51 : 139-148.
13. Schmell, E.D. and B.J. Gulyas. 1980. Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence of the enzyme's role in hardening the zona pellucida. *Gamete Res.* 10 : 301-318.
14. Talansky, B.E. and J.W. Gordon. 1988. Cleavage characteristics of mouse embryos inseminated and cultured after zona pellucida drilling. *Gamete Res.* 21 : 277-287.
15. Thadani, V. 1982. Mice produced from eggs fertilized in vitro at a very low sperm : egg ratio. *J. Exp. Zool.* 219 : 277-283.
16. Vanderhyden, B.C., K.J. Laughlin, J.M. Rutledge, and D.T. Armstrong. 1989. Zona drilling increase the penetrability of rat oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* 40 : 953-960.
17. Yanagimachi, R. 1984. Zona free hamster eggs : Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.* 10 : 187-232.
18. 李相鎭·鄭吉生. 1989. 過排卵 處理後의 經過時間이 생쥐 卵자의 核成熟과 體外受精에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會誌 13(2) : 70-79.