ผลของสารเหนี่ยวนำและช่วงเวลาความพร้อมปฏิสนธิต่อความพร้อมปฏิสนธิและการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของไข่หนูเมาส์ และพัฒนาการของตัวอ่อนก่อนฝังตัว

นายอรรถกร กู้ตระกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สหสาขาวิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974–333–555-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19239178

EFFECTS OF INDUCERS AND MATURATION DURATION ON *IN VITRO* MATURATION AND FERTILIZATION OF MOUSE OOCYTES, AND PREIMPLANTATION EMBRYO DEVELOPMENT

Mr. Athakorn Kutrakul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-333-555-2

Thesis Title :	Effects of Inducers and Maturation Duration on *In Vitro* Maturation and Fertilization of Mouse Oocytes, and Preimplantation Embryo Development
By :	Mr. Athakorn Kutrakul
Inter-Department :	Physiology
Thesis Advisor :	Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.
Thesis Co- Advisor :	Professor Pramuan Virutamasen, MD.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor of Philosophy's Degree

.....Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Associate Prof. Prasong Siriviriyakul, M.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Prof. Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.)

.....Thesis Co- Advisor

(Professor Pramuan Virutamasen, MD.)

.....Member

(Associate Prof. Mongkol Techakumphu, D.V.M., Ph.D.)

.....Member

(Tanu Pinyopummintr, D.V.M., Ph.D.)

อรรถกร กู้ตระกูล : ผลของสารเหนี่ยวนำและช่วงเวลาความพร้อมปฏิสนธิต่อความพร้อมปฏิสนธิและการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของไข่หนูเมาส์ และพัฒนาการของตัวอ่อนก่อนฝังตัว อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ศ. นพ. ประมวล วีรุตมเสน, 139 หน้า, ISBN 974-333-555-2

อัตราการปฏิสนธิและพัฒนาการของตัวอ่อนภายนอกร่างกายซึ่งได้รับจากไข่ที่ทำให้พร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกายต่ำกว่าไข่ที่ทำให้พร้อมปฏิสนธิภายในร่างกาย ข้อมูลดังกล่าวนี้ชี้แนะว่าไข่ และ/หรือกระบวนการต่างๆสำหรับเตรียมความพร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกายยังไม่เหมาะสม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการต่างๆสำหรับเตรียมความพร้อมปฏิสนธิ การปฏิสนธิ และพัฒนาการของตัวอ่อนภายนอกร่างกายของไข่หนูเมาส์ โดยมุ่งศึกษาผลของสารเหนี่ยวนำความพร้อมปฏิสนธิ (PMSG และ hCG) ช่วงเวลาความพร้อมปฏิสนธิ (3-24 ชั่วโมง) และระดับของไซคลิกเอเอ็มพีภายในไข่ต่อความพร้อมปฏิสนธิและการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของไข่หนูเมาส์ และพัฒนาการของตัวอ่อนก่อนฝังตัว การศึกษาในส่วนที่หนึ่งมุ่งศึกษาผลของสารเหนี่ยวนำความพร้อมปฏิสนธิ โดยนำไข่ซึ่งไม่พร้อมปฏิสนธิในระยะโปรเฟส I , หลังจากกระตุ้นหนูเมาส์เพศเมียนาน 48 ชั่วโมงด้วยสารเหนี่ยวนำความพร้อมปฏิสนธิ (PMSG หรือ hCG) ความเข้มข้น 5, 7.5 หรือ 10 IU, มาเลี้ยงภายนอกร่างกายในน้ำยาเพาะเลี้ยงภายใต้เงื่อนไขที่ 5% CO_2 ในอากาศ อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นดูผลการพัฒนาเป็นไข่ที่พร้อมปฏิสนธิในระยะเมทาเฟส II การปฏิสนธิตลอดจนพัฒนาการของตัวอ่อนภายนอกร่างกายถึงระยะบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง T6 การศึกษาในส่วนที่สองมุ่งศึกษาผลของช่วงเวลาความพร้อมปฏิสนธิ โดยนำไข่ซึ่งไม่พร้อมปฏิสนธิหลังจากการกระตุ้นหนูเมาส์เพศเมียนาน 48 ชั่วโมงด้วยสารเหนี่ยวนำความพร้อมปฏิสนธิ (PMSG หรือ hCG) ความเข้มข้น 7.5 IU มาเลี้ยงภายนอกร่างกายในน้ำยาเพาะเลี้ยงนาน 3-24 ชั่วโมง จากนั้นแต่ละช่วงเวลาดูผลการพัฒนาเป็นไข่ที่พร้อมปฏิสนธิในระยะเมทาเฟส II การปฏิสนธิ และพัฒนาการของตัวอ่อนภายนอกร่างกายเหมือนการศึกษาในส่วนที่หนึ่ง ระดับของไซคลิกเอเอ็มพีภายในไข่ ความหนาและความแข็งของเปลือกหุ้มไข่ถูกศึกษาในครั้งนี้เพื่ออธิบายผลของช่วงเวลาความพร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกายต่อความพร้อมปฏิสนธิ การปฏิสนธิ และการพัฒนาการของตัวอ่อนก่อนฝังตัว

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเหนี่ยวนำความพร้อมปฏิสนธิในการกระตุ้นหนูเมาส์เพศเมียเพื่อนำไข่มาศึกษาการเตรียมความพร้อมปฏิสนธิ และการปฏิสนธิภายนอกร่างกายคือ 7.5 IU อย่างไรก็ตามสารเหนี่ยวนำความพร้อมปฏิสนธิ hCG มีประสิทธิภาพดีกว่า PMSG ต่อการเตรียมความพร้อมปฏิสนธิของไข่ (87.6 ± 3.4% กับ 76.4 ± 3.2%, $P<0.05$) การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (65.5 ± 3.4% กับ 51.0 ± 4.7%, $P<0.05$) ลดระดับของไซคลิกเอเอ็มพีภายในไข่ (0.03 เฟมโตโมล/ไข่ 1 ใบ กับ 0.08 เฟมโตโมล/ไข่ 1 ใบ, $P<0.05$) ลดเวลาการย่อยเปลือกหุ้มไข่ (1,882 ± 147 วินาที กับ 1,668 ± 103 วินาที, $P<0.05$) และเพิ่มการพัฒนาการของตัวอ่อนภายนอกร่างกายถึงระยะบลาสโตซิส (64.4 ± 2.5% กับ 57.6 ± 3.1%, $P<0.05$) ตามลำดับ โดยช่วงเวลาความพร้อมปฏิสนธิที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ศึกษาการเตรียมความพร้อมปฏิสนธิ และการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของหนูเมาส์คือ 15 ชั่วโมง การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สารเหนี่ยวนำความพร้อมปฏิสนธิ hCG เหมาะสมต่อการกระตุ้นหนูเมาส์มากกว่า PMSG และช่วงเวลาความพร้อมปฏิสนธิที่เหมาะสมต่อการนำมาศึกษาการเตรียมความพร้อมปฏิสนธิ การปฏิสนธิ และพัฒนาการของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสภายนอกร่างกายของหนูเมาส์คือ 15 ชั่วโมง นอกจากนี้การลดระดับของไซคลิกเอเอ็มพีภายในไข่จะเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความพร้อมปฏิสนธิ การปฏิสนธิ และการพัฒนาการของตัวอ่อน และลดการแข็งตัวของเปลือกหุ้มไข่ด้วย

ภาควิชา...สหสาขาวิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา...สรีรวิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

407 54285 30 : MAJOR PHYSIOLOGY
KEY WORD : GONADOTROPINS / MATURATION DURATION / IVM / IVF / EMBRYO DEVELOPMENT / cAMP / MOUSE

ATHAKORN KUTRAKUL : EFFECTS OF INDUCERS AND MATURATION DURATION ON *IN VITRO* MATURATION AND FERTILIZATION OF MOUSE OOCYTES, AND PREIMPLANTATION EMBRYO DEVELOPMENT. THESIS ADVISOR : ASSOC PROF. VITHAYA YODYINGYUAD, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : PROF. PRAMUAN VIRUTAMASEN, MD. 139 pp. ISBN 974-333-555-2

In vitro fertilization and development of embryos from oocytes matured *in vitro* are still by far much lower than those matured *in vivo*, suggesting that oocytes and/or procedures for the oocyte maturation being used are of suboptimum. This study was carried out on the purpose of developing improved procedures for IVM, IVF, and cultivation of embryos *in vitro*, concentrating on the effects of oocyte maturation inducers (PMSG and hCG), oocyte maturation durations *in vitro* (3-24 hours), and intraoocyte cyclic adenosine monophosphate (cAMP), on *in vitro* oocyte maturation, fertilization, and preimplantation embryo development. In the first experiment, the effect of oocyte maturation inducers was explored. Oocytes at germinal vesicle (GV) stage obtained from various groups of immature female mice 48 hours after injection of various concentrations (5, 7.5, 10 IU) of either PMSG or hCG were cultured in a maturation medium for 24 hours under an atmosphere of 5% CO_2 in air at 37°C. Oocytes developed to metaphase II (MII) stage were subsequently tested for their efficiencies for fertilization and development to blastocysts in T6 medium. In the second experiment, the effect of *in vitro* maturation durations was explored. GV stage oocytes obtained 48 hours after 7.5 IU PMSG or hCG injection were cultured in maturation medium for 3-24 hours. At various intervals, oocytes developed to MII stage were subsequently tested for their efficiencies for fertilization and development to blastocysts as in experiment I. The level of intraoocyte cAMP, zona thickness, and zona hardness, were also measured to elucidate the effect of oocyte maturation duration *in vitro* on these factors, which accordingly affect their fertilization and development .

Results from this study suggested that the suitable concentration of gonadotropins for the stimulation of immature female mice to obtain immature oocytes for IVM/IVF studies in the mouse model is 7.5 IU/mouse. However, hCG, more effective than PMSG, plays a major role in nuclear maturation (increase oocyte maturation : 87.6 ± 3.4% versus 76.4 ± 3.2%, $P< 0.05$), cytoplasmic maturation (increase the fertilization rate : 65.5 ± 3.4% versus 51.0 ± 4.7%, $P<0.05$; decrease the level of intraoocyte cAMP : 0.03 fmol/oocyte versus 0.08 fmol/oocyte, $P<0.05$; and decrease the zona digestion time : 1,882 ± 147 seconds versus 1,668 ± 103 seconds, $P<0.05$), and preimplantation embryo development (increase blastocyst development : 64.4 ± 2.5% versus 57.6 ± 3.1%, $P<0.05$) respectively. The optimum maturation duration of the GV stage oocytes for the highest rate of IVM/IVF studies in this mouse model is 15 hours. In conclusion, hCG is superior to PMSG, and 15 hours is the optimum duration for *in vitro* oocyte maturation yielding the highest rate of fertilization and preimplantation development of embryo *in vitro*. In addition, decreasing the level of intraoocyte cAMP increase the percentage of oocyte maturation, fertilization, and preimplantation embryo development, and decrease the zona hardness.

ภาควิชา...สหสาขาวิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา...สรีรวิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENT

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I would like very much to express my deepest sincere and gratitude to my advisor, Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, and my Co- Advisor, Professor Pramuan Virutamasen for their kind advice, guidance, keen interest, and constant encouragement throughout this study.

I would also like to thank Associate Professor Duangnarumon Prachankhadee, Associate Professor Chollada Buranakarl, Associate Professor Suthiluk Patumraj, Assistant Professor Juraiporn Somboonwong, and Assistant Professor Kanokwan Kutrakul for their kindness in suggestion and correction in my study.

My thanks would also express to Dr. Pornpimon Tangchaisin, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chaing Mai University and all members in the Division of Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for providing advice and the facilities used in experimental works and laboratory techniques.

I would like to thank Professor Pramuan Virutamasen, the committee of Rangsit University, and the Graduate School, Chulalongkorn University for the research grant to support this study.

Finally, I am also indebted to all experimental mice for their sacrifice which bring me to succeed in my study.

CONTENTS

page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....xiii

ABBREVIATIONS.....xvi

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

Rationale.....1

Review of literature.....3

Correlation of oocyte and follicular development.....4

Oocyte maturation inhibitor and stimulator.....10

Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes.....19

In vitro oocyte maturation.....21

Cyclic AMP and oocyte maturation.....28

The objectives of the study.....32

The hypothesis of the study.....33

II. MATERIALS AND METHODS.....34

Experimental animals.....34

Media preparation.....34

Kreb Ringer Bicarbonate (KRB) medium preparation.....34

Percoll in KRB with Hepes solution preparation.....36

T6 medium preparation.....37

Immature oocytes preparation for IVM.....38

Percoll-gradient centrifuged sperm preparation.....39

IVF procedure and embryo development.....40

Cyclic AMP enzymeimmunoassay system.....40

Intraoocyte cAMP extraction procedure.....41

Measurement of intraoocyte cAMP procedure.....42

Experiment I- III..... ..44-46

Data collection and analysis.....48

Conceptual framework.....49

III. RESULTS.....52

IV. DISCUSSION.....98

REFERENCES.....117

BIOGRAPHY.....138

PUBLICATIONS.....139

LIST OF TABLES

page

Table 1.1 Morphological parameters used for assessment of oocyte maturity.....11

Table 1.2 Mammalian follicular fluid components.....25

Table 3.1 *In vitro* maturation of denuded and cumulus cell-enclosed immature oocytes were obtained from either 5, 7.5, or 10 IU PMSG stimulated immature female mice.....57

Table 3.2 *In vitro* maturation of denuded and cumulus cell-enclosed immature oocytes were obtained from either 5, 7.5, or 10 IU hCG stimulated immature female mice.....58

Table 3.3 *In vivo* maturation of oocytes after immature female mice were i.p. injected with 7.5 IU PMSG and recorded the development and maturation of oocytes at 12, 24, 36, 48, and 60 hours later.....62

Table 3.4 *In vivo* maturation of oocytes after immature female mice were i.p. injected with 7.5 IU hCG and recorded the development and maturation of oocytes at 12, 24, 36, 48, and 60 hours later.....63

Table 3.5 *In vitro* fertilization rate of *in vitro* matured denuded and cumulus cell-enclosed oocytes were obtained from either 5, 7.5, or 10 IU PMSG stimulated immature female mice.....64

Table 3.6 *In vitro* fertilization rate of *in vitro* matured denuded and cumulus cell-enclosed oocytes were obtained from either 5, 7.5, or 10 IU hCG stimulated immature female mice.....65

Table 3.7 Blastocyst development of 2-cell embryos were obtained from of *in vitro* matured denuded and cumulus cell-enclosed oocytes of either 5, 7.5, or 10 IU PMSG stimulated immature female mice.....69

Table 3.8 Blastocyst development of 2-cell embryos were obtained from of *in vitro* matured denuded and cumulus cell-enclosed oocytes of either 5, 7.5, or 10 IU hCG stimulated immature female mice.....70

Table 3.9 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on *in vitro* maturation of oocytes at the MII stage. The cumulus cell-enclosed immature oocytes were obtained from 7.5 IU PMSG- primed mice.....74

Table 3.10 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on *in vitro* maturation of oocytes at the MII stage. The cumulus cell-enclosed immature oocytes were obtained from 7.5 IU hCG- primed mice.....75

Table 3.11 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on *in vitro* fertilization rate of *in vitro* matured oocytes. The cumulus cell-enclosed immature oocytes were obtained from 7.5 IU PMSG- primed mice.....78

Table 3.12 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on *in vitro* fertilization rate of *in vitro* matured oocytes. The cumulus cell-enclosed immature oocytes were obtained from 7.5 IU hCG- primed mice.....79

Table 3.13 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on blastocyst development of 2-cell embryos were obtained from *in vitro* matured oocytes. The *in vitro* matured oocytes were obtained from 7.5 IU PMSG-primed mice.....82

Table 3.14 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on blastocyst development of 2-cell embryos were obtained from *in vitro* matured oocytes. The *in vitro* matured oocytes were obtained from 7.5 IU hCG-primed mice.....83

Table 3.15 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on zona pellucida digestion time of *in vitro* matured oocytes were obtained from 7.5 IU PMSG- primed mice.....87

Table 3.16 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on zona pellucida digestion time of *in vitro* matured oocytes were obtained from 7.5 IU hCG- primed mice.....88

Table 3.17 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on zona pellucida thickness of *in vitro* matured oocytes were obtained from 7.5 IU PMSG- primed mice.....91

Table 3.18 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on zona pellucida thickness of *in vitro* matured oocytes were obtained from 7.5 IU hCG- primed mice.....92

Table 3.19 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on intraoocyte cAMP of *in vitro* matured oocytes were obtained from 7.5 IU PMSG- primed mice.....95

Table 3.20 Effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on intraoocyte cAMP of *in vitro* matured oocytes were obtained from 7.5 IU hCG- primed mice.....96

LIST OF FIGURES

page

Figure 1.1 Mammalian oocyte maturation.....8

Figure 1.2 Morphology of a mouse oocyte at germinal vesicle (GV) stage.....12

Figure 1.3 Morphology of a mouse oocyte at germinal vesicle breakdown (GVBD ; MI) stage.....13

Figure 1.4 Morphology of a mouse oocyte at metaphase II (MII) stage.....14

Figure 1.5 Mechanism of mammalian oocyte maturation.....30

Figure 3.1 *In vitro* preimplantation mouse embryo development.....53-55

Figure 3.2 Comparison of the effect of either 5, 7.5, or 10 IU PMSG or hCG on *in vitro* maturation at the MII stage of denuded oocytes.....59

Figure 3.3 Comparison of the effect of either 5, 7.5, or 10 IU PMSG or hCG on *in vitro* maturation at the MII stage of cumulus cell- enclosed oocytes.....60

Figure 3.4 Comparison of the effect of either 5, 7.5, or 10 IU PMSG or hCG on *in vitro* fertilization rate of denuded oocytes.....67

Figure 3.5 Comparison of the effect of either 5, 7.5, or 10 IU PMSG or hCG on *in vitro* fertilization rate of cumulus cell-enclosed oocytes.....68

Figure 3.6 Comparison of the effect of either 5, 7.5, or 10 IU PMSG or hCG on blastocyst development of denuded oocytes.....72

Figure 3.7 Comparison of the effect of either 5, 7.5, or 10 IU PMSG or hCG on blastocyst development of cumulus cell-enclosed oocytes.....73

Figure 3.8 Comparison of the effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on *in vitro* maturation of oocytes at the MII stage.....77

Figure 3.9 Comparison of the effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on *in vitro* fertilization rate of *in vitro* oocyte matured oocytes.....80

Figure 3.10 Comparison of the effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on the blastocyst development.....84

Figure 3.11 Comparison of the effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on zona pellucida digestion time.....89

Figure 3.12 Comparison of the effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on zona pellucida thickness.....93

Figure 3.13 Comparison of the effect of *in vitro* oocyte maturation duration, 3-24 hours, on intraoocyte cAMP.....97

ABBREVIATIONS

BSA.....bovine serum albumin

$CaCl_2$.....calcium chloride

cAMP.....cyclic adenosine 3',5'monophosphate

CaMK.....calmodulin-dependent kinase

CD.....cervical dislocation

DG.....diacylglycerol

e.g.....exempli gratia (Latin) ; for example

FBS.....fetal bovine serum

FF.....follicular fluid

fmol.....femtomole

FSH.....follicle stimulating hormone

g.....gram

GF.....growth factor

G-protein.....guanine-protein

GV.....germinal vesicle

GVBD.....germinal vesicle breakdown

hCG.....human chorionic gonadotropin

HCl.....hydrochloric acid

hMG.....human menopausal gonadotropin

HX.....hypoxanthine

i.p.....intraperitoneal

IBMX.....3-isobutyl-1-methylxanthine

ICSI.....intracytoplasmic sperm injection

IP3.....inositol 1,4,5-triphosphate

IU.....international unit

IVF.....*in vitro* fertilization

IVM.....*in vitro* maturation

KCl.....potassium chloride

KGF.....keratinocyte growth factor

KH_2PO_4.....potassium dihydrogen phosphate

KRB.....Kreb Ringer bicarbonate

l.....litre

LH.....luteinizing hormone

mg.....milligram

$MgCl_2$.....magnesium chloride

$MgSO_4$.....magnesium sulphate

ml.....millilitre

mm.....millimetre

mM.....millimole

mOsm.....milliosmole

MI.....metaphase I

MII.....metaphase II

N.....normal ; concentration unit

Na.....sodium

NaCl.....sodium chloride

$NaHCO_3$.....sodium bicarbonate

NaH_2PO_4.....sodium dihydrogen phosphate

NaOH.....sodium hydroxide

nm.....nanometre

OMI.....oocyte maturation inhibitor

OMS.....oocyte maturation stimulator

P.....probability

PGC.....percoll gradient centrifugation

pH.....power of hydrogen

PI.....prophase I

PIP2.....phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKA.....protein kinase A

PKC.....protein kinase C

PMSG.....pregnant mare serum gonadotropin

RT.....room temperature

T6.....modified Tyrode solution

rpm.....revolutions per minute

w/v.....weight per volume

ZP.....zona pellucida

ZP2f.....zona pellucida 2 fragment

°C.....degree Celsius

°F.....degree Fahrenheit

µl.....microlitre