

KOMUNIKASI SINGKAT

Keberhasilan ICSI Tergantung pada Stabilitas DNA dan Status Disulfida Inti Spermatozoa

SYAHRUDDIN SAID¹ dan KOJI NIWA²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911. Email: faiqoh02@yahoo.com

²Department of Animal Science and Technology, Okayama University, Tsushima-Naka, Okayama 700-8530
Email: kniwa@cc.okayama-u.ac.jp

(Diterima dewan redaksi 3 Februari 2004)

ABSTRACT

SAID, S. and K. NIWA. 2004. Successful ICSI depends on DNA stability and disulfide status of sperm nuclei. *JITV* 9(3): 210-215.

Relation of successful ICSI (intracytoplasmic sperm injection) with DNA stability and thiol-disulfide status of rat spermatozoa nuclei was investigated. Testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa have been used for this research. The nuclei of these spermatozoa were stained with acridine orange for DNA stability test and labeled with mBBR for thiol-disulfide status before injecting into oocytes. Cauda epididymal spermatozoa were very stable and contained high disulfide than caput epididymal and testicular spermatozoa. Results from spermatozoa injection into oocytes show that they were capable to fertilize oocytes. However, testicular spermatozoa can not develop up to blastocyst stage. These results indicated that successful ICSI at least in the rat depends on DNA stability and disulfide status of sperm nuclei.

Key words: ICSI, DNA stability, disulfide status, acridine orange, mBBR

ABSTRAK

SAID, S. dan K. NIWA. 2004. Keberhasilan ICSI tergantung pada stabilitas DNA dan status disulfida inti spermatozoa. *JITV* 9(3): 210-215.

Telah dilakukan penelitian untuk melihat hubungan keberhasilan ICSI dengan stabilitas DNA dan status disulfida spermatozoa tikus yang digunakan. Ada 3 macam spermatozoa yang digunakan yaitu testicular, kaput dan kauda epididimal spermatozoa. Spermatozoa tersebut diuji stabilitas DNA dengan pewarnaan *acridine orange* dan kandungan thiol dengan melabel dengan *mBBR* sebelum disuntikkan kedalam sel telur dengan bantuan ICSI. Inti kauda epididimal spermatozoa sangat stabil dan kandungan disulfida lebih banyak dibandingkan kaput epididimal dan testicular spermatozoa. Ketika spermatozoa tersebut disuntikkan kedalam sel telur menunjukkan bahwa ketiganya mampu membuahi sel telur namun testicular spermatozoa tidak mampu tumbuh lebih lanjut dibandingkan dengan kaput dan kauda epididimal spermatozoa. Hasil ini menunjukkan bahwa keberhasilan ICSI paling tidak pada tikus tergantung pada stabilitas DNA dan status disulfida spermatozoa yang digunakan.

Kata kunci: ICSI, stabilitas DNA, status disulfida, *acridine orange*, mBBR

PENDAHULUAN

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) telah sukses dilakukan pada manusia untuk mengatasi ketidaksuburan pria (PALERMO *et al.*, 1992; 1996; TESARIK dan SOUSA, 1995). ICSI juga telah membuka wawasan pengetahuan tentang *spermatogenesis*, kapasitas sperma dan interaksi sperma dan sel telur. Memasukkan sperma secara langsung atau mekanik ke dalam sel telur untuk menghasilkan pembuahan normal, menjadikan ICSI merupakan penelitian untuk menjawab pertanyaan yang sangat fundamental bagaimana gamet jantan dan betina berinteraksi selama proses pembuahan.

Kelahiran normal hasil ICSI telah dilaporkan pada beberapa spesies diantaranya pada mencit (KIMURA dan

YANAGIMACHI, 1995), kelinci (HOSOI *et al.*, 1988), babi (MARTIN, 2000), domba (CATT *et al.*, 1996), sapi (GOTO *et al.*, 1990), tikus (HIRABAYASHI *et al.*, 2002) dan manusia (PALERMO *et al.*, 1992). Selanjutnya telah dilaporkan kelahiran tikus hasil ICSI menggunakan *cauda*, *caput epididymal* dan *testicular* spermatozoa (SAID *et al.*, 2003).

Spermatozoa saat melalui epididimis, protamin pada inti spermatozoa membentuk ikatan disulfida. Hal ini membuat inti spermatozoa tahan terhadap pengaruh fisik dan kimia. KOSOWER *et al.* (1992) memperlihatkan adanya hubungan antara status thiol-disulfida dan *acridine orange* fluoresen pada inti spermatozoa mamalia yang didasarkan kestabilan DNA atas pengaruh asam. Selama proses pematangan spermatozoa mulai dari spermatid sampai ejakulasi

ternyata status thiol-disulfida inti spermatozoa berubah secara drastis. Selanjutnya kami menduga bahwa perubahan kestabilan DNA dan status thiol-disulfida inti spermatozoa akan berpengaruh pada hasil ICSI.

Penelitian ini akan melihat tingkat keberhasilan ICSI dengan menggunakan spermatozoa dengan berbagai tingkat kematangan.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dikerjakan di Laboratorium Reproduksi Ternak, *Okayama University, Japan*, dari tahun 1999 sampai tahun 2001.

Media

Medium dasar yang digunakan untuk manipulasi sel telur dan spermatozoa adalah *modified Krebs-Ringer bicarbonate* (mKRB), medium ini sama dengan yang digunakan TOYODA dan CHANG (1974) untuk *in vitro* fertilisasi pada sel telur tikus, kecuali penurunan konsentrasi NaHCO_3 dari 25,07 mM menjadi 5,0 mM dan penambahan 20 mM Hepes. Sementara itu, medium yang digunakan untuk kultur embrio adalah mRIECM (MIYOSHI *et al.*, 1995a, b). Komposisi kedua medium tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Persiapan spermatozoa

Testikular dan epididimal spermatozoa diperoleh dengan mengambil testis tikus jenis Wistar umur 4-8

bulan dan ditempatkan pada 10 ml Hepes-mKRB. Setelah *tunica albugenia* dilepaskan, *seminiferous tubules* dipotong menjadi halus. Suspensi sel disaring menggunakan 40 μm nylon mesh (Falcon) dan disentrifus 700 g selama 10 menit. Pellet sedikit diencerkan dan separasi dengan perkol gradien (40, 30, 20%). Konsentrasi spermatozoa berada pada lapisan 30%. Spermatozoa diambil dan dimasukkan kedalam tabung 1,5 ml, disentrifus pada 1800 g selama 3 menit untuk menghilangkan medium perkol. Pellet diencerkan dengan 1 ml Hepes-mKRB. Kaput dan kauda epididimal spermatozoa diambil dengan merobek bagian kaput dan kauda epididimis selanjutnya disimpan pada tabung 1,5 ml berisi 1 ml Hepes-mKRB.

Pewarnaan dengan *Acridine Orange*

Contoh spermatozoa dioleskan di atas kaca obyek, dikeringkan, difiksasi selama 2 jam dalam asam alkohol (asam asetat : methanol = 1 : 3) dan dikeringkan lagi. Selanjutnya diwarnai dengan *acridine orange* (pengenceran 1000X dengan PBS) selama semalam. Setelah diwarnai, dibilas dan diamati dengan pembesaran 1200X dengan *laser-scanning confocal microscope* (BioRad MRC-1024). Intensitas fluoresen kepala sperma merah dan hijau dihitung secara terpisah menggunakan *image analysis software* (Laser Sharp, BioRad).

Tabel 1. Komposisi medium m-KRB dan m-RIECM

Komponen	m-KRB		m-RIECM	
	mM	g/l	mM	g/l
NaCl	94,60	5,5284	76,70	4,4823
KCl	4,78	0,3564	3,20	0,2386
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,71	0,2514	2,00	0,2940
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0,50	0,1017
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,19	0,2933	-	-
KH_2PO_4	1,19	0,1619	-	-
NaHCO_3	25,07	2,1061	25,00	2,1003
Glucose	5,56	1,0019	7,50	1,3515
Na-pyruvate	0,50	0,0550	0,50	0,0550
Na-lactate	21,58	0,37 ml	10,00	0,19 ml ³
Penicillin G	-	75 $\mu\text{g/ml}$	-	-
Streptomycin	-	50 $\mu\text{g/ml}$	-	-
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	-	4,0	-	-
Polyvinylalcohol (PVA)	-	-	-	1,0
MEM essential amino acids solution	-	-	-	2%
MEM non-essential amino acids solution	-	-	-	1%

Pelabelan dengan mBBR

Stok *mBBR* (monobromobimane, Sigma) 50 mM dalam *acetonitril* (Aldrich, Milwaukee, WI) disiapkan. Stok *mBBR* diencerkan ke 2 mM dalam PBS, sperma dimasukkan untuk mencapai konsentrasi akhir 1 mM. Selanjutnya diinkubasi selama 15 menit pada ruangan gelap temperatur ruang. Sperma dicuci dengan sentrifugasi dan dioleskan di atas glass obyek, ditutup dan ditekan dengan gelas penutup. Contoh diamati dengan pembesaran 1000X di bawah *epifluorescence microfluorometer* (Olympus OSD-SRF20).

Koleksi sel telur

Tikus Wistar betina (umur 8-12 minggu) disupervulasi dengan menyuntikan secara *intra-peritoneal* 25-30 IU *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG), diikuti dengan penyuntikan 25-30 IU *human chorionic gonadotropin* (hCG) 48 jam kemudian, sel telur dikoleksi 15-16 jam setelah penyuntikan hCG. Sel kumulus dihilangkan dengan menggunakan 0,1% *bovine testicular hyaluronidase* (Sigma) dalam Hepes-mKRB. Sel telur yang terkoleksi dicuci dan disimpan dalam mKRB pada suhu 37°C, 5% CO₂ sambil menunggu persiapan *mikro manipulator*.

Injeksi spermatozoa ke dalam oosit

Spermatozoa yang digunakan untuk ICSI terlebih dahulu dipisahkan kepala dan ekor dengan sonikasi pada suhu 0°C selama 10 detik dengan menggunakan Ultrasonic sonicator Model Bronson Sonifier 250 pada 30 *duty cycle* dan 4 *out-control*. Larutan spermatozoa yang telah disonikasi diencerkan dengan Hepes-mKRB dan dicuci dengan cara sentrifugasi 1,000 g selama 3 menit. Endapan spermatozoa selanjutnya dipindahkan ke medium manipulasi spermatozoa Hepes-mKRB mengandung 5 µg/ml cytochalasin B.

Kepala sperma dimasukkan ke dalam sitoplasma sel telur dengan menggunakan mikropipet yang dihubungkan dengan *piezo-injection manipulator* (PMM-150FU, Prime Tech LTD, Japan). Kepala spermatozoa diaspirasi ke dalam pipet injeksi, selanjutnya ujung pipet disentuhkan ke *zona pellucida* sel telur dengan posisi *polar body* pada jam 6 atau 12. Sambil menekan, dengan sedikit elektrik piezo, zona akan terlubangi. Ujung injeksi pipet secara mekanik ditekan lebih ke dalam sel telur, dan pipet akan masuk ke dalam oolemma sel telur dengan memberikan sedikit elektrik piezo. Spermatozoa dikeluarkan dan masuk ke dalam ooplasma bersama sedikit medium manipulasi.

Pengamatan hasil ICSI

Untuk melihat aktivasi sel telur dan proses pembuahan dengan ICSI menggunakan spermatozoa dengan berbagai tahap pematangan, sel telur hasil ICSI dikultur selama 10 jam. Setelah kultur 10 jam sel telur hasil ICSI ditempatkan di atas gelas obyek, ditekan dengan gelas penutup dan difiksasi dengan glutaraldehyde 2,5% dalam PBS pH 7,4. Selanjutnya dicelupkan ke dalam 10% formalin netral selama 4-6 jam pada temperatur ruang. Setelah difiksasi, sampel di-dehidrasi menggunakan ethanol 95%, selanjutnya diwarnai dengan 0,25% lacmoid dalam 45% acetic acid. Sitologi sel telur hasil ICSI secara rinci diamati di bawah mikroskop fase kontras pembesaran 400X (Nikon, Optiphot, HFX-IIA, Japan). Untuk melihat kemampuan tumbuh sel telur hasil ICSI secara *in vitro*. Embrio yang memiliki 2 pronukleus 9-12 jam setelah disuntik dicuci 3 kali dengan mR1ECM dan dikultur selama 120 jam pada media yang sama dalam inkubator CO₂ (5% CO₂, 37°C).

Analisa statistik

Perbedaan status ikatan disulfida spermatozoa pada berbagai tahap kematangan diuji dengan ANOVA dan uji Fisher menggunakan STATVIEW. Jika ANOVA memperlihatkan perbedaan perlakuan, maka antara perlakuan dibandingkan dengan uji Fisher. Sementara itu, untuk melihat perbedaan kejadian sel telur teraktifkan, pembentukan pronukleus jantan, dan perbedaan tingkat pertumbuhan embrio dianalisa menggunakan uji χ^2 .

HASIL DAN PEMBAHASAN

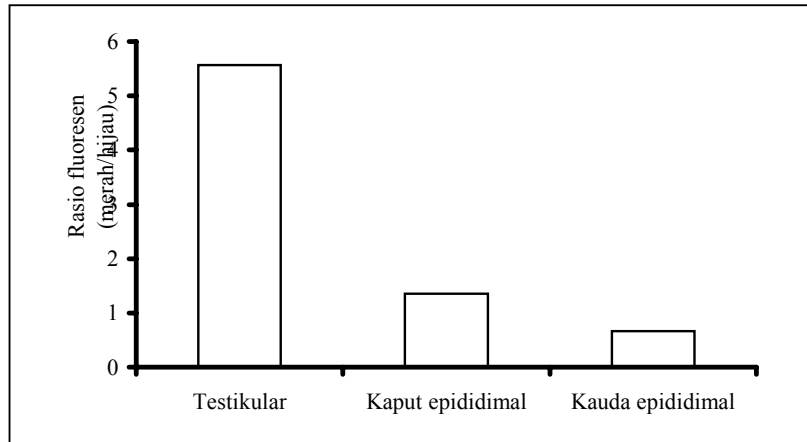
Pada penelitian ini menunjukkan bahwa *ratio* fluoresen *acridine orange* berubah secara drastis dari testicular spermatozoa ke kaput epididimal spermatozoa. Perubahan fluoresen *acridine orange* pada inti sperma selama proses pematangan dapat dilihat pada Gambar 1. Rasio fluoresen *acridine orange* merah/hijau pada inti testicular spermatozoa ($5,571 \pm 0,247$) menurun ($P < 0,05$) secara drastis pada kaput epididimal spermatozoa ($1,354 \pm 0,034$) dan semakin menurun ($P < 0,05$) pada kauda epididimal spermatozoa ($0,669 \pm 0,013$). KOSOWER *et al.* (1992) dengan menggunakan mikroskop fluoresen menunjukkan bahwa spermatozoa berubah dari merah ke hijau ketika spermatozoa melalui testis ke kaput epididimis pada mencit dan kelinci. *Acridine orange* akan mengikat *double-stranded* DNA menghasilkan fluoresen hijau dan bergabung dengan *single-stranded* DNA

menghasilkan fluoresen merah (ICHIMURA *et al.*, 1971; PEACOCKE, 1973). Fluoresen hijau menandakan bahwa sperma tidak terdenaturasi dengan perlakuan asam, sedangkan fluoresen merah menandakan bahwa sperma terdenaturasi dengan perlakuan asam. Dari penelitian ini menunjukkan bahwa testicular spermatozoa mengeluarkan fluoresen merah menandakan bahwa DNA terdenaturasi atau tidak stabil dibandingkan kauda epididimal spermatozoa yang mengeluarkan fluoresen hijau yang lebih stabil.

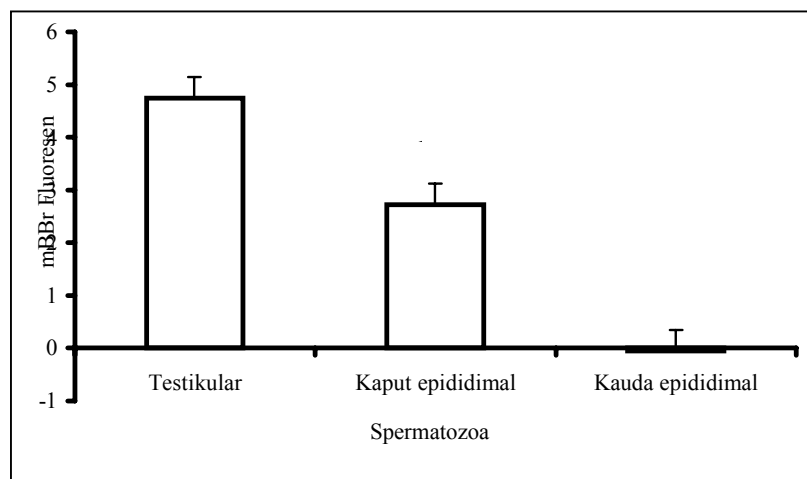
Perubahan mBBR fluoresen pada inti spermatozoa selama proses pematangan dapat dilihat pada Gambar 2. Ketika spermatozoa dilabel dengan mBBR, intensitas fluoresen secara beraturan menurun secara nyata ($P < 0,05$) dari testicular ($4,74 \pm 0,16$) ke kaput epididimal ($2,72 \pm 0,08$) dan kauda epididimal ($-0,05 \pm 0,05$) spermatozoa. Spermatozoa dilabel dengan mBBR untuk melihat status *thiol-disulfida* sperma, kauda epididimal spermatozoa sangat sulit dideteksi

menunjukkan bahwa tidak terdapat ikatan thiol (-SH) atau terdapat lebih banyak ikatan disulfide (SS). Sebaliknya pada testicular spermatozoa intensitas fluoresen sangat kuat menunjukkan bahwa banyak sekali ikatan thiol. Hasil penelitian ini sama dengan penelitian sebelumnya (SHALGI *et al.*, 1989). Pada tikus, sekitar 20% protamin sperma adalah *cysteine* (CALVIN, 1976; BETZELEL *et al.*, 1986) dan kebanyakan *cysteine* ini dioksidasi menjadi disulfide di kauda epididimis (SHALGI *et al.*, 1989).

Selanjutnya untuk melihat kemampuan spermatozoa tersebut membuahi sel telur dengan bantuan ICSI tertera pada Tabel 2. Proporsi sel telur teraktivasi setelah disuntik dengan testikular spermatozoa (45%) nyata lebih kecil ($P < 0,01$) dibandingkan dengan kaput epididimal (67%) dan kauda epididimal spermatozoa (69%). Kaput dan kauda epididimal spermatozoa tidak berbeda nyata. Namun pembentukan pronukleus jantan dari ketiga spermatozoa tersebut tidak berbeda nyata.



Gambar 1. Perubahan fluoresen *acridine orange* pada inti sperma selama proses pematangan, a,b,c berbeda nyata ($P < 0,05$)



Gambar 2. Perubahan mBBR fluoresen pada inti spermatozoa selama proses pematangan, a,b,c berbeda nyata ($P < 0,05$)

Tabel 2. Aktivasi dan pembuahan normal sel telur 10 jam setelah ICSI

Spermatozoa	Jumlah sel telur	Sel telur teraktivasi dengan pronukleus betina			
		Total n (%)	Kepala sperma terkondensasi n (%)	Kepala sperma terdegradasi n (%)	Pronukleus jantan n (%)
Testikular	130	58 (45) ^a	8 (14)	11 (19)	39 (67)
Kaput epididimal	100	67 (67) ^b	12 (18)	6 (9)	49 (73)
Kauda epididimal	133	92 (69) ^b	8 (9)	7 (8)	77 (84)

^{a,b} pada kolom yang sama berbeda nyata (P<0,01)**Tabel 3.** Pertumbuhan *in vitro* sel telur hasil ICSI

Spermatozoa	Kultur embrio (n)	Jumlah (%) embrio berkembang ke tahap			
		2-sel (24) ¹	≥ 4-sel (72) ¹	≥ Morula (96) ¹	Blastocyst (120) ¹
Testikular	88	49 (56) ^a	20 (23) ^a	2 (2) ^a	0 ^a
Kaput epididimal	96	51 (53) ^a	44 (46) ^b	11 (11) ^{ab}	11 (11) ^{ab}
Kauda epididimal	66	55 (83) ^b	34 (52) ^b	17 (26) ^b	12 (18) ^b

¹ Angka di dalam kurung menunjukkan lama kultur, a,b berbeda pada setiap kolom berbeda nyata (P<0,01)

Selanjutnya pertumbuhan sel telur setelah ICSI dan kultur *in vitro* selama 120 jam dapat dilihat pada Tabel 3. Sel telur mencapai tahap blastosis setelah kultur selama 120 jam hasil ICSI dengan kaput epididimal spermatozoa sebanyak 11 (11%) dan kauda epididimal sebanyak 12 (18%). Tidak ada sel telur yang tumbuh sampai blastosis hasil ICSI dengan testikular spermatozoa.

Pada penelitian ini, sel telur yang terbuahi normal setelah disuntik dengan sperma baik testicular maupun epididimal spermatozoa memperlihatkan hasil yang cukup tinggi (67-84%) dan tidak ada perbedaan diantara ketiganya. Namun untuk pertumbuhan lebih lanjut terlihat setelah kultur *in vitro* selama 120 jam, tidak ada sel telur hasil ICSI dengan testicular spermatozoa yang tumbuh mencapai blastosis dibandingkan ICSI dengan kaput dan kauda epididimal spermatozoa tumbuh mencapai blastosis masing-masing 11 (11%) dan 12 (18%). Hasil ini memperlihatkan bahwa spermatozoa dengan kandungan ikatan disulfida yang masih kurang mampu melakukan pembuahan normal dengan bantuan ICSI, namun kemampuan untuk tumbuh lebih lanjut akan berkurang.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa keberhasilan ICSI paling tidak pada tikus sangat tergantung dengan stabilitas DNA dan status thiol-disulfida spermatozoa yang digunakan. Disarankan agar

dalam pelaksanaan ICSI utamanya dalam aplikasi pada manusia sebaiknya menggunakan spermatozoa matang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan sebagian dari disertasi penulis di Okayama University, Japan. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Kiyoshi Okuda dan Dr. Hiroaki Funahashi dari *Department of Animal Science of Okayama University, Japan* atas saran dan bimbingannya selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- BETZALEL, M., R. SHALGI and B. MOAY. 1986. Protamine in the rat, its fate *in vivo*, and its degradation *in vitro* by egg homogenate. *Gamete Res.* 14: 293-306.
- CALVIN, H.I. 1976. Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 434: 377-89.
- CATT, S.L., J.W. CATT, M.C. GOMEZ, W.M.C. MAXWELL and G. EVANS. 1996. The birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet Rec.* 139: 494-495.
- GOTO, K., A. KINOSHITA, Y. TAKUMA and K. OGAWA. 1990. Fertilization of bovine oocytes by injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet Rec.* 127: 517-520.

- HIRABAYASHI, M., M. KATO, T. AOTO, A. SEKIMOTO, M. UEDA, I. MIYOSHI, N. KASAI and S. HOCHI. 2002. Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic Res.* 11: 221-228.
- HOSOI, Y., M. MIYAKE, K. UTSUMI and A. IRITANI. 1988. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon. *Proc. 11th Int Congr Anim Reprod Artif Insem.* 3:331.
- ICHIMURA, S., M. ZAMA and H. FUJITA. 1971. Quantitative determination of single-stranded section in DNA using the fluorescent probe acridine orange. *Biochim Biophys Acta.* 240: 485-95.
- KIMURA, Y. and R. YANAGIMACHI. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod.* 52: 709-720.
- KOSOWER, N.S., H. KATAYOSE and R. YANAGIMACHI. 1992. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J. Androl.* 13: 342-48.
- MARTIN, M.J. 2000. Development in vitro-matured pocine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 63: 109-112.
- MIYOSHI, K., L.R. ABEYDERA, K. OKUDA and K. NIWA. 1995a. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. *J. Reprod Fertil.* 103: 27-32.
- MIYOSHI, K., N. TANAKA and K. NIWA. 1995b. Penetration in vitro of naturally ovulated rat eggs and the development pg eggs in a chemically defined medium. *J. Mamm. Ova Res.* 12: 35-39.
- PALERMO, G., H. JORIS, P. DEVROEY and A.C. VAN STEIRTEGHEM. 1992. Pregnancy after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 340: 17-18.
- PALERMO, G.D., P.N. SCHLEGEL, L.T. COLOMBERO, N. ZANINOVIC, F. MOY and Z. ROSENWAKS. 1996. Aggressive sperm immobilization prior to ICSI with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum. Reprod.* 11: 1023-1029.
- PEACOCKE, A.R. 1973. The interaction of acridine with nucleic acids. *In: Acridines* R.M. ACHESON (Ed.). New York. Inter science Publishers. pp. 723-754.
- SAID, S., M.S. HAN and K. NIWA. 2003. Development of rat oocytes following intracytoplasmic injection of sperm heads isolated from testicular and epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 60: 239-369.
- SHALGI, R., J. SELIGMAN and N.S. KOSOWER. 1989. Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol. Reprod.* 40: 1037-1045.
- TESARIK, J. and M. SOUSA. 1995. Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca²⁺ fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil. Steril.* 64: 770-776.
- TOYODA, Y. and M.C. CHANG. 1974. Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fertil.* 36: 9-22.