

Gel Filtration에 의해 분획한 소 태아혈청과 돼지난포액이 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 효과

가학현 · 정구민 · 한정호* · 임경순**

한국생명과학연구소

Effects of Fetal Calf Serum and Porcine Follicular Fluid Fractionated by Gel Filtration on *in vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes

Ka, H. H., K. M. Chung, J. H. Han* and K. S. Im**

Hankook Institute of Life Science

SUMMARY

These studies were carried out to investigate the effect of gonadotropins (GTH), fetal calf serum (FCS), porcine follicular fluid (pFF) and FCS and pFF fractions obtained by the gel filtration on *in vitro* maturation of porcine follicular fluid. When the oocytes were cultured in TCM-199, the maturation rate was higher in pFF than in FCS in both with or without GTH and in pFF the maturation rate was higher in with GTH than in without GTH. In case of without GTH, pFF increased maturation rates in TCM-199, but not in Whitten's medium (WM). When the oocytes were cultured in WM supplemented with FCS fractions, the maturation rate (51.6%) of oocytes was significantly ($P < 0.05$) higher in fraction B (about 30 ~ 70 kDa) than in control, FCS and other fractions. When oocytes were cultured in WM supplemented with pFF fractions, fractions B (about 30 ~ 70 kDa) and D (about 1 ~ 10 kDa) were significantly ($P < 0.05$) higher than in control, pFF and other fractions.

In conclusion, the addition of gonadotropins into the maturation media was effective for oocyte maturation. The addition of pFF was more effective than addition of FCS for maturation of porcine oocytes *in vitro*. And fraction B from FCS and fractions B and D from pFF was effective for oocyte maturation.

I. 서 론

가축의 생산성 향상을 위한 수단으로 체외수정기술이 1980년대초부터 큰 발전을 기두어 왔다. 특히 체외

수정기술은 형질전환동물 생산을 위한 핵치환 및 미세 조작기술의 발전에 큰 영향을 미쳤다.

체외성숙된 돼지 난자의 체내수정은 Motlik과 Fulka (1974)에 의해 처음 보고되었다. 최초의 성공적인 체외수정은 Iritani 등(1978)에 의해 보고되었다. 그

* 서울대학교 의과대학(College of Medicine, Seoul National University)

** 서울대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과(College of Agriculture and Life Sciences, Department of Animal Science & Technology, Seoul National University)

렇지만 소에서와는 달리 돼지에서는 불완전한 체외성숙으로 인해 체외수정란의 생산이 제한되고 있다. 불완전한 체외성숙은 수정 후 빈번한 다장사침입과 낮은 응성전핵 형성의 문제점을 유발한다(Niwa, 1993; Nagai, 1994). 다장사침입과 응성전핵형성은 수정시의 조건에 의해서도 영향을 받기도 하지만 난자의 체외성숙시의 조건에 의해 크게 영향을 받기 때문에 현재 많은 연구자들은 체외성숙시의 조건을 개선하려는 노력을 하고 있다(Naito 등, 1988; Mattioli 등, 1991; Funahashi와 Day, 1993; Yoshida 등, 1992). 그러나 아직도 만족할 만한 수준에 이르지 못했다.

지금까지는 돼지 난자의 체외성숙을 증진시키기 위하여 소태아혈청(fetal calf serum)이 주로 체외성숙 배양액에 첨가되어져 왔으나(Singh 등, 1993; Laurincik 등, 1994; Wang 등, 1994) 최근의 연구에서 소태아혈청이 체외성숙을 억제하는 것으로 보고되고 있다(Naito 등, 1988; Funahashi와 Day, 1993). 따라서 소태아혈청을 돼지난포액으로 대체하려는 시도가 이루어지고 있다(Naito 등 1988; Yoshida 등, 1992).

본 연구에서는 소 태아혈청과 돼지난포액을 gel filtration으로 분획했을 때 각 분획이 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 효과를 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수

난포란은 서울시 가락동 축협공판장에서 도살된 직후의 돼지 난소에서 얻었다. 도살 직후의 난소를 항생제(Penicillin G 100 IU/ml, Streptomycin sulfate 0.1 mg/ml ; Sigma)가 첨가된 0.9% 식염수로 2~3회 세척한 후 37~39℃의 보온병에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소를 다시 식염수로 2~3회 세척한 후 18 gauge 바늘이 부착된 10 ml 주사기로 3~6 mm 크기의 난포에서 난소실질을 연속적으로 찢러 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 채관하였다. 채취한 난포액은 15 ml 원심분리관에 옮기 37℃ 항온수조에서 약 5분간 정지시킨 후 하층액을 스포이드로 흡입하여 배양접시(Cat. No. 3002, Falcon)에 옮겨 TCM 199 배양액에서 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란 중 난구세포가 치밀하게 부착되

고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하여 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

미성숙 난포란의 체외성숙을 유도하기 위한 기본 배양액은 Eagle's salt가 함유된 TCM-199 (Cat. No. 12340-022, Gibco BRL)에 0.11 mg/ml Sodium pyruvate(Cat. No. P-5280, Sigma), 75 µg/ml Penicillin G(Cat. No. P-3032, Sigma) 및 50 µg/ml Streptomycin sulfate(Cat. No. S-9139, Sigma)를 첨가한 복합배양액과 실험실에서 직접 제조한 단순배양액인 Whitten's medium(Whitten, 1971)을 이용하였다. 10% 소태아혈청(Cat. No. A-1111-L, Hyclone Laboratories), 2 IU/ml LH(Cat. No. L-9773, Sigma) 및 1 µg/ml FSH(Cat. No. F-8001, Sigma)을 첨가하였고, 준비된 배양액은 0.22 µm membrane filter (Cat. No. SLGV025LS, Millipore)로 여과하여 멸균한 후 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 미리 15시간 이상 배양하였다. 돼지난포란의 체외성숙은 42~44시간 동안 실시하였으며, 난포란은 60 mm 배양접시(Cat. No. 3002, Falcon)에 50 µl의 미세소작을 형성한 다음 그 위에 mineral oil(Squibb & Sons)로 덮고 미세소작당 10개씩 배양하였다.

실험 1은 난포란의 체외성숙에 영향을 미치는 소태아혈청과 돼지난포액의 첨가효과를 알아보기 위해 실시하였다. 호르몬(LH+FSH)이 첨가되지 않은 TCM-199에 10% 소태아혈청 또는 10% 돼지난포액을 첨가한 것과, 호르몬이 첨가된 TCM-199 배양액에 10% 소태아혈청 또는 10% 돼지난포액을 첨가한 것을 배양액으로 하여 체외성숙을 실시하였다. 실험 2에서는 Whitten's medium에 소태아혈청과 돼지난포액의 첨가 또는 무첨가가 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 알아보기 위해 TCM-199에 소태아혈청과 돼지난포액의 첨가 또는 무첨가와 비교하였다. 실험 3에서는 소태아혈청의 분획이 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 실험 4에서는 돼지난포액의 분획이 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

3. 돼지난포액의 준비

돼지난포액은 Yoshida 등(1992)의 방법에 따라 난

포란 채란시 회수한 난포액을 모아 1,500g에서 30분간 원심분리하여 과립세포와 혈구세포를 분리하였다. 세포가 없는 난포액을 0.8, 0.45, 0.22 μm membrane filter (Millipore)로 각각 여과하여 1 ml씩 분주한 후 사용시까지 -20°C 에서 냉동보관하였다.

4. Gel filtration에 의한 소태아혈청과 돼지난포액의 분획

소태아혈청 성분과 돼지난포액은 Waters사의 Advanced Protein Purification System(Model 650M)을 이용하여 high resolution gel filtration 방법으로 분획하였다. 충분한 양의 Whitten's medium으로 미리 평형시킨 Protein-Pak 200SW column(0.8×30 cm)에 배양액으로 6배 희석한 소태아혈청과 돼지난포액을 각각 200 μl 씩 주입한 후 Whitten's medium으로 0.8 ml/min의 속도로 용출하였다. 용출된 각 분획(0.8 ml)은 대략 > 70 kDa(A), $70 \sim 30$ kDa(B), $30 \sim 10$ kDa(C), $10 \sim 1$ kDa(D), 및 < 1 kDa(E)의 5 군으로 pooling하여 나눈 후 각각의 단백질 농도를 측정하고 돼지 난포란의 체외성숙에 이용하였다. Gel filtration column은 실험조건 하에서 단백질 molecular weight marker (Pharmacia)로 calibration하였다(albumin : 67 kDa, ovalbumin : 43 kDa, chymotrypsinogen A : 25 kDa 및 RNase A : 13.7 kDa). 단백질 농도는 Bradford(1976)의 방법에 따라 측정하였다.

5. 체외성숙의 판정

돼지난포란의 체외성숙 판정은 변 등(1991)의 방법에 따라 급속염색법을 실시하여 감수분열 제 II 중기상이 관찰되는지의 여부로써 난자의 핵성숙을 판정하였다.

6. 통계분석

실험결과의 통계분석은 χ^2 test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 돼지난포액과 소태아혈청의 분획

Gel Filtration으로 돼지난포액과 소태아혈청을 분

획화하였을 때 분획의 양상과 pooling한 각 분획 내의 단백질 농도는 각각 Fig. 1과 2에서 보여주는 바와 같다. 돼지난포액의 단백질농도는 소태아혈청에 비해 약 2배 정도 높았으며 특히 B(약 $30 \sim 70$ kDa)분획의 단백질농도는 소태아혈청에서 $283 \mu\text{g}/\text{ml}$, 돼지난포액에서 $488 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 다른 분획군($20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하)에 비교해 월등히 높았다.

2. 체외성숙에 미치는 소태아혈청, 돼지난포액 및 성선자극호르몬첨가에 따른 효과

체외성숙 배양액에 소태아혈청, 돼지난포액 및 성선

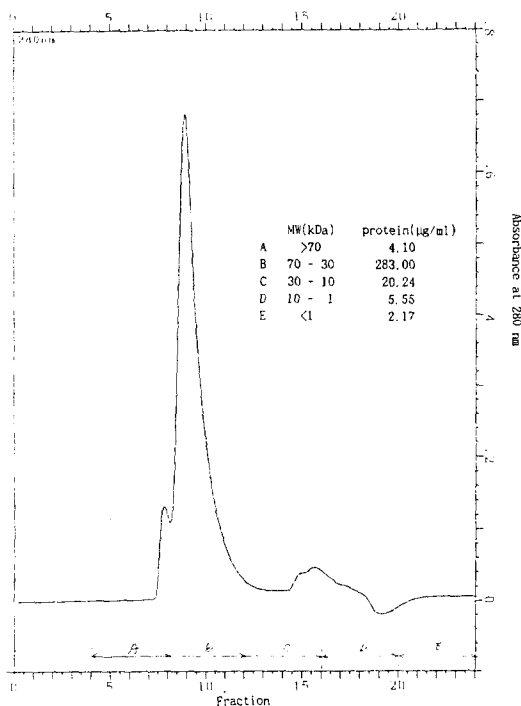


Fig. 1. Fractionation of FCS (fetal calf serum) on Protein-Pak 200SW gel filtration. 200 μl of 1/6-diluted FCS were applied to a column(0.8×30 cm) pre-equilibrated with Whitten's medium and eluted at a flow rate of 0.8 ml/min. Collected fractions(0.8 ml) were pooled and subjected to culture of porcine follicular oocytes *in vitro*. The molecular weight ranges and protein concentrations for pooled fractions are shown.

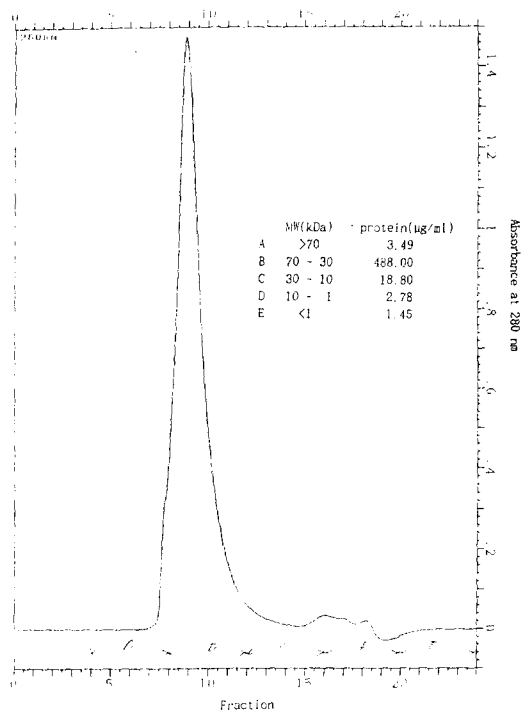


Fig. 2. Fractionation of pFF (porcine follicular fluid) on Protein-Pak 200SW gel filtration. 200 μ l of 1/6-diluted pFF were applied to a column(0.8 \times 30 cm) pre-equilibrated with Whitten's medium and eluted at a flow rate of 0.8 ml/min. Collected fractions(0.8 ml) were pooled and subjected to culture of porcine follicular oocytes *in vitro*. The molecular weight ranges and protein concentrations for pooled fractions are shown.

자극호르몬의 첨가가 체외성숙에 미치는 영향은 Table 1과 같다. 성선자극호르몬을 첨가하지 않은 경우 돼지난포액이 소태아혈청보다 유의적으로 높은 체외성숙률을 나타내었다($P < 0.01$). 성선자극호르몬을 첨가하였을 때에도 돼지난포액이 소태아혈청보다 유의적으로 높은 체외성숙률을 나타내었다($P < 0.01$). 성선자극호르몬을 첨가하거나 하지 않거나 돼지난포액이 소태아혈청보다 돼지난포란의 체외성숙을 증가시켰다. 한편 소태아혈청과 돼지난포액의 첨가 모두 호르몬 첨가에 의하여 체외성숙률이 증가하는 효과를 보여주었다. 혈청은 성분이 명확히 밝혀져 있지 않으나 각종 에너지원, 아미노산, 비타민 및 성숙촉진인자 등이 함유되어 있는 한편 매우 유해한 효과도 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Maurer, 1992). 난포액은 혈청유래로 조성이 혈청의 경우와 유사하다고 보고되어 있는데(Edwards, 1974), 본 실험의 결과로 볼 때 돼지난포란의 성숙환경에는 소태아혈청의 첨가보다 돼지난포액의 첨가가 보다 효과적임을 알 수 있다. Mattioli 등(1991)은 성선자극호르몬의 첨가가 핵성숙과 난구세포의 팽화를 증가시키며, 수정 후 응성전 핵정성률을 높여준다고 보고하였다. 특히 FSH는 난구세포의 팽화에 영향을 미치고, LH는 핵성숙과 세포질성숙에 관여한다고 하였다. 본 실험에서도 성선자극호르몬의 첨가로 성숙률이 증가하는 것을 확인하였는데 소태아혈청이나 돼지난포액내에 함유되어 있는 양으로는 충분한 돼지난포란의 성숙이 이루어지지 않기 때문으로 보인다.

3. 체외성숙에 미치는 소태아혈청과 돼지난포액의 배양액에 따른 첨가효과

Table 1. Effect of FCS and pFF on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes in TCM-199 with or without GTH¹

Additives		No. of oocytes examined	No. of oocytes at Meta. II (%)
GTH ¹	Protein		
-	10% FCS	123	42(34.2) ^a
-	10% pFF	122	69(56.6) ^b
+	10% FCS	120	79(65.8) ^b
+	10% pFF	124	108(87.1) ^c

¹ GTH : LH(2IU/ml) + FSH(1 μ g/ml)

^{a,b,c} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$)

복합배양액인 TCM-199과 단순배양액인 Whitten's medium에 각각 소태아혈청과 돼지난포액을 첨가했을 때 체외성숙률은 Table 2와 같다. 복합배양액인 TCM-199에 소태아혈청과 돼지난포액을 첨가하여 난포란을 체외성숙시켰을 때, 돼지난포액을 첨가한 경우가 대조군과 소태아혈청보다 유의적으로 높은 성숙률을 나타내었다($P < 0.05$). 단순배양액인 Whitten's medium에서는 돼지난포액의 유의차는 인정되지 않았지만 대조군과 소태아혈청보다 약간 높은 성숙률을 나타내었다. TCM-199은 대부분의 체외성숙, 수정 및 발달에 관한 연구에서 사용되고 있으나(Wang 등, 1992; Nagai 등; 1993, Singh과 Armstrong, 1994), 삼투압이 낮고(약 255 mOsm), NaCl의 농도가 낮은(65.5 mM) 특징을 가진 단순배양액인 Whitten's medium은 많이 이용되지는 않고 있다. 그러나 Whitten's medium을 이용하였을 때 Beckmann 등(1990)은 돼지 1~2 세포기 수정란의 4 cell block 현상

이 극복되었다고 하였고, Beckmann과 Day(1991)는 삼투압은 돼지 수정란의 발달에 해롭지 않으나 고농도의 NaCl은 수정란에 해롭다고 하였으며, Funahashi 등(1994)은 돼지난포란의 세포질성숙이 TCM-199에서보다 Whitten's medium에서 증가되었다고 보고하였다. 본 실험에서 TCM-199과 Whitten's medium의 배양액간의 차이가 나타나지 않았는데 이는 단백질원이 돼지난포란의 성숙에 크게 영향을 미치지 않았거나, 성선자극호르몬의 무첨가로 호르몬에 의한 난구세포의 팽화가 이루어지지 않았기 때문일 것으로 보인다.

4. 소태아혈청의 분획이 체외성숙에 미치는 효과

소태아혈청을 분획하여 각 분획으로 돼지난포란을 체외성숙시켰을 때의 체외성숙률은 Table 3과 같다. B 분획(B; 30~70 kDa)이 대조군이나 10% FCS 첨가군에 비해 유의적으로 높은 체외성숙률을 나타내었다($P < 0.05$). 이 분획은 단백질농도가 다른 분획들보

Table 2. Effect of media, FCS and pFF on the *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes without GTH

Media	Additives	No. of oocytes examined	No. of oocytes at Meta. II (%)
TCM	Control	90	19(21.1) ^a
	10% FCS	90	25(27.8) ^a
	10% pFF	90	32(35.5) ^b
WM	Control	84	18(21.4) ^a
	10% FCS	87	15(17.2) ^a
	10% pFF	90	28(31.1) ^a

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3. Effects of FCS fractions obtained by gel filtration on *in vitro* maturation in Whitten's medium(WM)

Fractions ¹	No. of oocytes examined	No. of oocytes at Meta II (%)
Ctrl(0%)	64	22(34.4) ^a
WM + 10% FCS	64	22(34.4) ^a
A	62	24(38.7) ^a
B	64	33(51.6) ^b
C	65	22(33.8) ^a
D	62	18(35.5) ^a
E	66	28(42.2) ^a

¹ A~E : FCS fractions obtained by gel filtration.

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Effects of pFF fractions obtained by gel filtration on *in vitro* maturation in Whitten's medium

Fractions ¹	No. of oocytes examined	No. of oocytes at Meta II (%)
Ctrl(0%)	62	13(21.0) ^a
WM + 10% pFF	62	20(32.3) ^{ap}
A	66	20(30.3) ^a
B	67	34(50.8) ^{bq}
C	63	21(33.3) ^a
D	68	27(39.7) ^{bp}
E	67	21(31.3) ^a

¹ A ~ E : pFF fractions obtained by gel filtration.

^{a,b,p,q} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

다 훨씬 높으므로 이 분획내 단백질이 성숙물에 영향을 준 것으로 본다. 다른 연구자들(Naito 등, 1988; Funahashi와 Day, 1993)에 의해 보고되었던 소태아 혈청의 억제효과는 나타나지 않았다. 포유동물난자의 체외배양시 혈청의 사용은 매우 일반적인데 혈청내 난포란 또는 수정란의 발달과 억제에 관여하는 인자가 존재함은 여러 연구자들에 의해 밝혀졌다(Hsu, 1980; Saito 등, 1984; 정 등, 1990; 한과 정, 1994). 한과 정(1994)은 소태아혈청을 gel filtration을 통해 분리한 분획에 생쥐 1 세포수정란을 발달시켰을 때 혈청내에 배반포까지의 발달을 촉진하는 인자(약 30 kDa 내외)와 억제하는 인자(<3kDa)가 공존함을 보고하였다. 본 실험에서 B(30~70 kDa) 분획이 체외성숙률이 높게 나타났는데 이 분획이 생쥐 수정란의 발달을 촉진시키는 분획과 정확히 일치하지는 않았다.

5. 돼지난포액의 분획이 체외성숙에 미치는 효과

돼지난포액을 분획하여 체외성숙을 실시하였을 때 각 분획에서의 체외성숙률은 Table 4에서 보는 바와 같다. 분획한 돼지난포액의 각 분획에 체외성숙을 시켰을 때 돼지난포액이 무첨가된 대조군에 비해 B 분획(B: 30~70 kDa)과 D 분획(D: 1~10 kDa)에서 유의적으로 높은 체외성숙률을 나타내었다($P < 0.05$). 10%의 돼지난포액 첨가군에 비해서는 B 분획에서만 체외성숙에 대한 유의성이 나타났다($P < 0.05$). 이와 같은 결과로 볼 때 B와 D 분획에 돼지난포란의 체외성숙을 증진시켜 주는 인자들이 함유되어 있음을 알 수 있지만 체외성숙을 증진시켜주는 인자가 구체적으로

로 무엇인지에 관해서는 좀더 연구가 필요하다. B 분획은 단백질 농도(488 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 높기 때문에 단백질의 농도와 체외성숙과 상관관계가 있을 가능성도 있으나 D 분획의 단백질 농도(2.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$)는 B 분획에 비하면 아주 미미한 수준임에도 체외성숙 증진효과가 있는 것으로 보아 단순히 단백질 농도가 난포란의 체외성숙에 영향을 미친 것으로는 보이지 않는다. 돼지난포액에는 성숙억제물질(OMI, purine, MIS 등)이 존재한다고 알려져 왔다(Tsafirri와 Channing, 1975; Gwatkin과 Anderson, 1976). 그러나 최근에는 난포액이 체외성숙률과 수정률을 증가시킨다는 보고가 있는데(Naito 등, 1988; Sato 등, 1990; Yoshida 등, 1992) 아직 난포액내 어떤 특징을 가진 성분이 난포란의 체외성숙과 수정 및 발달을 증진시키는 데 관여하는지에 대한 연구는 미흡한 실정이다. Yoshida 등(1992)은 돼지난포액의 분획을 통해 분자량 약 10~200 kDa 사이의 어떤 물질이 돼지난포란의 체외성숙을 촉진시킨다고 보고하였다. 본 실험의 결과도 이와 거의 일치하며 돼지난포액 중에 이 인자들의 존재를 시사한다. 이러한 난포란의 체외성숙을 증가시키는 인자가 무엇인지와 체외성숙에 관여하는 작용방식에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다.

IV. 적 요

본 연구는 성선자극호르몬(GTH), 소태아혈청(FCS) 및 돼지난포액(pFF)의 첨가와 gel filtration을 통해 분획한 FCS와 pFF 첨가가 돼지난포란의 체

외성숙에 미치는 효과를 조사하기 위하여 실시하였다. 돼지난포란을 TCM-199에서 체외성숙하였을 때 성숙률은 성선자극호르몬이 첨가되지 않은 경우와 첨가된 경우 모두 돼지난포액이 소태아혈청보다 유의하게 ($P < 0.05$) 높았으며 돼지난포액 첨가의 경우 성선자극호르몬 첨가가 비첨가보다 유의하게 ($P < 0.05$) 높았다. 성선자극호르몬이 첨가되지 않은 경우 Whitten's medium (WM)에서 pFF는 성숙률을 유의적으로 증가시키지는 않았지만, TCM-199에서는 유의적으로 ($P < 0.05$) 증가시켰다. WM에서 gel filtration에 의해 분획된 소태아혈청으로 돼지난포란을 체외성숙시켰을 때 체외핵성숙률은 B 분획(약 30~70 kDa)이 51.6%로 대조군이나 다른 처리군들보다 유의적으로 높았다($P < 0.05$). WM에서 gel filtration에 의해 분획된 돼지난포액으로 돼지난포란을 체외성숙시켰을 때 체외핵성숙률은 B 분획(약 30~70 kDa)과 D 분획(약 1~10 kDa)이 각각 50.8과 39.7%로 대조군이나 다른 처리군들보다 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

결론적으로 돼지난포란의 체외성숙 배양액에 성선자극호르몬의 첨가는 효과적이었으며, 돼지난포액은 소태아혈청보다 돼지난포란의 체외성숙을 증진시키는 데 효과적이었다. Gel filtration을 통한 분획중 소태아혈청의 30~70 kDa 분획, 돼지난포액의 30~70 kDa 분획 및 1~10 kDa 분획에서 난포란의 체외성숙률을 증진시키는 효과가 있었다.

V. 인용문헌

1. Beckmann, L.S., T.C. Cantley, A.R. Reike and B.N. Day. 1990. Development and viability of one- and two-cell porcine embryos cultured through the "four-cell block". *Theriogenology*, 33:193.
2. Beckmann, L.S. and B.N. Day. 1991. Culture of one- and two-cell porcine embryo : Effects of varied osmolarity in Whitten's and Krebs Ringer Bicarbonate media. *Theriogenology*, 35:184.
3. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
4. Edwards, R.G. 1974. Follicular fluid. *J. Reprod. Fert.*, 37:189-219.
5. Funahashi, H., T.C. Cantley, T.T. Stumpf, S.L. Terlouw and B.N. Day. 1994. *In vitro* development of *in vitro*-matured porcine oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.*, 50:1072-1077.
6. Funahashi, H. and B.N. Day. 1993. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 39:965-973.
7. Gwatkin, R.B.L. and O.F. Anderson. 1976. Hamster oocyte maturation *in vitro* : inhibition by follicular components. *Life Sci.*, 19:527-536.
8. Hsu, Y. 1980. Embryo growth and differentiation factor in embryonic sera in mammals. *Dev. Biol.*, 76:465-474.
9. Iritani, A., K. Niwa and H. Imai. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 54:379-383.
10. Laurincik, J., D. Rath and H. Niemann. 1994. Differences in pronuclear formation and first cleavage following *in vitro* fertilization between pig oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 02:277-284.
11. Mattioli, M., M.L. Bacci, G. Galeati and E. Seren. 1991. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 36:95-105.
12. Maurer, H.R. 1992. Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. In Freshney, R.I.(ed), *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford., pp.15-46.
13. Motlik, J. and J. Fulka. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J.*

- Reprod. Fert., 36:235-237.
14. Nagai, T. 1994. Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. Theriogenology, 41:73-78.
 15. Nagai, T., J. Ding and R.M. Moor. 1993. Effect of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. J. Exp. Zool., 266:146-151.
 16. Naito, K., Y. Fukuda and Y. Toyoda. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. Gamete Res., 21:289-295.
 17. Niwa, K. 1993. Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. J. Reprod. Fert. Suppl., 48:49-59.
 18. Saito, H., T. Berger, D.R. Mishell and R.P. Marrs. 1984. Effect of variable concentration of serum on mouse embryo development. Fertil. Steril., 41:460-464.
 19. Sato, E., H. Miyamoto and S.S. Koide. 1990. Glycosaminoglycans in porcine follicular fluid promoting viability of oocytes in culture. Mol. Reprod. Dev., 26:391-397.
 20. Singh, B., G.J. Barbe and D.T. Armstrong. 1993. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocytes-cumulus cell complexes *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 36:113-119.
 21. Singh, B. and D.T. Armstrong. 1994. Localization of epidermal growth factor and its receptor in the porcine ovarian follicle, and its effects on *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of porcine oocytes. Theriogenology, 41:295.
 22. Tsafiriri, A. and C.P. Channing. 1975. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert., 43:149-152.
 23. Wang, W.H., L.R. Abeydeera, K. Okuda and K. Niwa. 1994. Penetration of porcine oocytes during maturation *in vitro* by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. Biol. Reprod., 50:510-515.
 24. Wang, Z.K., P.H. Wei, J.Z. Wang, C. Lei and M.Q. Kou. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 37:733-739.
 25. Yoshida, M., Y. Ishizaki and H. Kawagishi, K. Bamba and Y. Kojima. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. J. Reprod. Fert., 95:481-488.
 26. 변태호, 이상호, 송해범. 1991. 가축난자핵의 급속 염색법 개발. 한국축산학회지 33:25-31.
 27. 정구민, 문신용, 오선경, 임경순, 장윤석. 1990. 배양액과 첨가제의 효율적인 품질검사에 관한 연구. 한국수정란이식연구회지 5:28-41.
 28. 한정호, 정구민. 1994. 분자량에 따라 분획화된 혈청성분이 생쥐 체외수정란의 발생에 미치는 효과. 한국수정란이식학회지 9:127-137.