

돼지 未成熟 卵胞卵의 琉璃化 凍結融解後 FDA 처리가
體外受精과 胚 發育에 미치는 影響

Ⅱ. 卵丘細胞의 附着程度가 돼지난포란의 體外成熟에 미치는 影響

金瑩勳·金重柱

濟州大學校 農科大學 畜產學科

**Effects of FDA Treatment after Vitrified Freezing on *In Vitro*
Fertilization and Development of Porcine Follicular Oocytes**
**Ⅱ. Effect of Degree of Cumulus Cell Attachment on
In Vitro Maturation of Porcine Follicular Oocytes**

Y. H. Kim and J. K. Kim

Department of Animal Science, College of Agriculture, Cheju National University

SUMMARY

This study was carried out to determine the effect of cumulus cell attachment and various factors on *in vitro* maturation of pig follicular oocytes. Oocytes with various configuration of cumulus cell mass were collected from ovaries of mature gilts by aspirating with syringe equipped with needles of different gauges, follicle size and with or without cumulus cells. They were cultured in TCM-199 medium containing FCS (fetal calf serum) for 30~48 hours in incubator with air containing 5% CO₂ at 38.5°C. After orcein staining at *in vitro* maturation condition, GV, GVBD, anaphase, telophase and M II were observed. Results are summarized as follows:

1. Recovery rates were 55.8, 55.5 and 34.4% when the cumulus-compacted oocytes were collected with 18, 21, 26 gauge needles of syringes, respectively.
2. 79% of oocytes with compacted cumulus cells were at GV stage and most of the oocytes with partially denuded and denuded cumulus cells were from GVBD to M-II stages.
3. Percentage of mature oocytes among those which are follicular diameter of 1~2, 3~6 and over 6 mm was 42.6, 53.2 and 60.8%, respectively.
4. Percentage of mature oocytes among those which are compacted, partially denuded and denuded was 60.5, 46.2 and 35.4% respectively.
5. Percentage of mature oocytes in co-cultured with monolayers of cumulus cells was higher (57.1%) than that found with oocytes cultured alone (53.4%).

(Key words: *In vitro* fertilization, maturation, porcine, oocytes, cumulus cell, GV stage, GVBD, compacted)

緒 論

일반적으로 대부분의 雌性 哺乳動物의 난자는 체 내에서 雌雄前核이 융합하여 출산후 第一減數分裂 前期에서 발육이 중지된다. 性成熟이 가까워지면서 난포세포는 난핵포를 형성하게 되고, 여러 요인에 의해서 第一減數分裂(成熟分裂)후 第一極體의 방출과 더불어 排卵을 일으킨다. 배란된 성숙난자는 정자와 수정, 분할을 계속하면서 자궁으로 하강하고 착상을 하게 된다.

그러나 이러한 體內繁殖作用의 진행과정을 體外(in vitro)에서 인위적으로 정확히 실현시켜 산자를 생산하는 기술의 적용은 발생공학적 측면에서 대단히 중요하며 많은 숙달과 기술 및 많은 시설이 요구된다. 그뿐 아니라 原始卵母細胞의 체외성숙, 수정 그리고 발생 등으로 크게 분류되어 정상적 발생능력을 가진 양호한 수정란의 생산을 위해서는 諸要因이 존재하고, 기초적인 기술을 습득하여 응용하는 것은 필수적인 것이다.

이러한 哺乳動物 난포란의 體外成熟培養은 Pincus와 Enzmann(1935)이 처음 家兔卵胞卵을 채취, 단순배양액(simple media)에서 배양하여 체내에서와 같은 결과를 보고하여 이의 가능성을 제시하였다. 그 후 연구초기에는 난포란의 발생생리를 구명하기 위한 수단으로 실험이 수행되어져 왔지만, 체외성숙시킨 난포란을 수정후 상실배나 배반포까지 발육시켜 受胎畜(recipients)에 이식하여 산자를 분만시킴으로써(Goto 등, 1988) 이에 대한 관심이 고조되어 왔다. 앞으로 卵胞卵을 이용하여 정상적인 發情能力(development ability)을 가진 수정란을 생산할 수 있는 기술개발이 이루어진다면, 저렴한 가격으로 受精卵을 다량생산하여 가축의 개량 및 효율성 향상을 할 수 있어 발생공학적 첨단기술의 연구와 응용에 큰 도움이 될 것이다. 현재에 이르러 소(Shioya 등, 1988; Leibfried와 First, 1979), 면양(Moor와 Trounson, 1977), mouse(Cross, 1973), rat(Bar-Ami와 Trafriri, 1981) 등에서 많은 연구가 수행되어져 왔지만 體外受精卵의 발육이나 이식 후 産子의 분만성적은 저조한 실정이다.

그러므로 본 연구는 體外受精 향상에 있어서 많

은 要因 중 기초가 되는 주사기 바늘의 종류, 난포의 직경, 난구세포의 밀집상태 등이 돼지난포란의 體外成熟에 미치는 영향에서 성적을 기초로 體外受精 향상 등을 응용하는데 그 목적을 두고 있다.

材料 및 方法

1. 供試卵巢의 準備

供試卵巢는 제주축협 축산물 처리장(한림읍 옹포리 소재)에서 도살된 未經産 자돈(체중 : 70~100kg)에서 도살후 20분 이내 채취하여 멸균생리식염수(0.9% NaCl, penicillin GK : 0.075g/l, streptomycin sulfate:0.05g/l)가 들어있는 보온병(30~37℃)에 옮겨 1.0~1.5시간내에 실험실로 운반하여 시험에 供試하였다.

2. 培養液

1) 卵胞卵 成熟 培養液

본 시험에 사용된 培養液은 TCM-199(GIBCO, Chem. Co., USA, Cat No.400-1100)에 25mM HEPES를 첨가한 것을 기초 培養液(Table 1)으로 하고 난자회수 및 선용 배양액에는 3mg/ml의 BSA(Sigma Chem. Co, No:A-7906)를 첨가하고, 성숙 배양액에는 상품화된 牛胎兒血清(FCS)을 10~25% 첨가하였다. 배양액에 첨가된 發情牛血清은 제주대학교 동물사육장에서 사육중인 經産 Holstein에서 발정발현일에 혈액을 채취, 정지하여 -원심분리(1,000rpm : 10min, 2,500rpm : 10min, 3,000rpm : 10min) - 비동화(56℃, 30~60min)시킨 후 millipore filter(pore size:0.2 μ m, Gelman Sci.)로 여과하여 -20℃에 동결보존하면서 제조시 필요량을 용해하여 사용하였다. 그리고 공시발정우혈청은 제조일로부터 2개월 이내 사용하였다. 배양액의 pH는 7.2~7.4, osmolality는 270~290m Osmol/kg로 조정하였다.

3. 試驗方法

1) 卵胞卵 採取

난포란 채취는 摘出된 난소를 멸균 생리 식염수

Table 1. Basic compositions of culture media

Components	Oocyte maturation(mg /l)
KCl	300
NaHCO ₃	2,200
MgCl ₂ · 6H ₂ O	-
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	-
Glucose	-
Na-pyruvate	55
Ca-lactate	254.8
Penicillin GK	75
Streptomycin	50
Phenol red	-
HEPES	5,958
TCM-199 (powder)	9,900

로 3회 선별 후 멸균된 濾過紙로 난소의 혈액과 수분을 제거한 다음 18~26 gauge 주사바늘이 부착된 10ml 주사기를 사용하였다. 난포는 직경에 따라 난포액과 난포란을 흡입하여 glass test tube에 옮겨 실체현미경(서울광학, 15~30×)하에서 난포란을 회수하였다. 이때 난구세포의 부착상태에 따라 난자를 분류하고, 일부 난자는 0.1% hyaluronidase로 난구세포를 제거하고 固定과 염색을 하여 난자를 관찰하였고, 採取된 난자중 진화된 난자는 실험에서 제외시켰다.

2) 卵胞卵 培養

난포란은 滅菌된 배양액에서 選別(기초배양액:2회, 성숙배양액:1회)하여 60mm petridish(Corning, Laboratory Sci, Co. No:25011-60)에 paraffine oil(Sigma Chem Co:Cat No:M-3516)로 피복하여 12시간 CO₂ 배양기내(99% humidity, 5% CO₂, 38.5℃)에서 평형시킨 0.2ml 배양액 소적에 난포의 크기, 난구부착상태 등에 따라 30~48시간 배양하였다. 난구세포 共同培養은 48시간 배양한 배양소적에서 pipetting하여 평형시킨 신선 배양액과 함께 난자를 10~15개씩 넣어 배양하였다.

3) 卵胞卵 發育段階의 判定

난포란 배양액 난구세포의 expansion을 조사하고 fine narrow pasture pipette 로 난자의 난구세포를 제거한 다음 slide glass로 옮겨 cover glass 를 덮고

가볍게 눌러 slide의 가운데 보정시키고 acetic-alcohol(ethyl alcohol 3 : acetic acid 1)을 흘려보내 透明帶를 제거한 다음 acetic alcohol용액에 3~7일간 고정시켰다. Ethyl alcohol(99.5%)로 탈수시켜 2.5% aceto-orcein으로 염색을 실시하고 manicure로 봉인하여 두었다가 위상차 현미경하(400×)에서 난자의 핵상을 관찰하였다.

卵胞卵의 判定은 Hunter와 Polge (1966)의 方法에 따라서 실시하였으며 metaphase II인 것을 성숙된 난포란으로 판정하였다.

4) 體外受精

體外受精은 精巢上體의 정자를 회수하여 사용하였는데 caffeine 5mM이 첨가된 BO액으로 2회 원심분리를 실시하여 swimming up 시킨 후, 20mg/ml BSA, 10μg/ml heparine이 첨가된 BO액에서 수정능 획득 및 체외수정을 실시하였다. 體外受精후 8~24째에 cumulus cell monolayer가 형성된 10% FCS첨가 TCM-199배양액에서 4~5일간 배양하여 난할상태를 판정하였다.

結果 및 考察

1. 卵胞卵의 採取와 成熟段階

난포란의 採取는 적출된 난소로부터 1~7mm인 난포들을 18, 21, 26 gauge의 주사바늘이 부착된 주사기를 이용하여 흡입 피집하였으며, 피집된 난포란은 난자에 부착된 난구세포의 부착상태에 따라 密集(compact), 分散(partial) 및 裸化(denuded)난포란으로 분류하여 조사한 결과는 Table 2에 제시된 바와 같다.

회수된 총 난포수는 646개였으며 18, 21, 26 gauge 주사바늘로부터 각각 222, 209, 215개의 난포란을 채취하였다. 회수된 난포란중 密集(compact) 난구세포를 갖는 난자수는 18, 21, 26 gauge별로 각각 採取된 총 난자수에 대하여 124/222(55.8%), 116/209(55.5%), 74/215(34.4%)로 나타났으며, 分散(partial)난포란은 18, 21, 26 gauge의 주사바늘에서 각각 31.5, 28.8, 53.0%로 26 gauge로부터 회수된 것에서 가장 높았고 裸化(denuded) 난포란은 각각 12.6, 15.4, 12.6%로 3개 처리구간 유사

Table 2. Configuration of cumulus cell mass of pig follicular oocytes collected with different gauge needle at recovery

Gauges of needle	No. of oocytes examined	Configuration of cumulus cell mass(%)		
		Compacted	Partial	Denuded
18	222	124(55.8)	70(31.5)	28(12.6)
21	209	116(55.5)	61(28.8)	32(15.4)
26	215	74(34.4)	114(53.0)	27(12.6)
Total	646	314(48.6)	245(37.9)	87(13.5)

한 경향치를 보였다.

이러한 結果는 Leibfried와 First(1979)가 20 gauge 주사바늘을 사용해서 직경 3mm인 소난포란을 채취하였을 때 회수된 난포란 대부분이 顆粒細胞를 가지고 있었다는 보고와 거의 일치하였고, Bae와 Channing(1985)이 18 gauge로 3~5 난포에서 돼지의 난포란을 채취하였을 때 밀집난구세포가 있는 난포란의 비율이 30~50%였다는 보고와도 유사한 경향이 있지만, Sato 등(1990)이 소에서 18 gauge로 채취하였을 때 난포란의 대부분이 밀집 卵丘細胞 卵子였다는 결과보다는 낮았다.

난포란 채취시 卵丘細胞 부착상태에 따른 핵상은 Table 3에 나타나 있는 바와 같이 난구세포가 밀집된 난포란에서는 대부분이 卵核胞(GV)단계이고 분산과 나화 난포란에서는 대부분이 난핵포 붕괴(GVBD) 단계 이상 발육되었으며, M-II(mataphase-II)까지 발육된 난자의 비율도 분산난포란이 14.3%, 나화난포란이 16.2%로 관찰되었다.

이것은 Sato 등(1990)이 채취된 소의 密集 卵丘細胞 및 裸化卵丘細胞 난포란에서 난핵포(GV)단계가 각각 90와 94%라는 보고와는 다르게 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 난구세포가 밀집하게 부착되어 있는 난포란을 채취하기 위해서는

18 or 21 gauge 주사바늘을 사용하는 것이 적절하고 밀집된 난포란에서는 대부분이 난핵포 붕괴전 단계였다.

난포 直徑에 따른 난포란의 發育能力을 조사하기 위해 난포란의 크기를 1~2, 3~5, 6mm으로 구분하고 ECS첨가 배양하여 metaphase-II 단계까지 조사한 성숙율은 Table 6과 같다. 난포란 성숙율은 1~2, 3~5, 6mm 이상에서 각각 42.6%(29/68), 53.2%(36/37) 및 60.8%(31/52)로 6mm 이상에서 成熟率이 가장 양호하였으며 다음은 3~5, 1~2mm 순으로 난포란 크기가 적을수록 成熟率이 낮게 나타났다(Table 4).

이것은 Bae와 Foot(1975)가 家兎의 小卵胞 또는 中卵胞에서 채취한 난자보다 大卵胞에서 채취된 난자 성숙율이 유의하게 높다는 보고와 일치하며, mluse(Erickson과 Sorensen, 1981)와 사람(Tsuji 등, 1985) 그리고 소(Leibfried와 First, 1979)의 난포란 배양성적과도 같은 경향이였다.

또한 Motlik 등(1984)이 1.7~2.2 및 3~7mm 돼지의 난포란에서 각각 49±4.2와 76±2.5%였다고 보고한 것보다는 낮은 결과이나, 김 등(1990)의 보고에서 1~2와 3~5mm 난포에서 각각 59.4, 61.3%의 성숙율을 보인 것과는 유사한 성적을 보였다. 이

Table 3. Developmental stages of pig follicular oocytes with different configuration of cumulus cell mass at recovery

Configuration of cumulus cell mass	No. of oocytes examined	Nuclear stages(%)				
		GV	GVBD	M-I	N-C	M-II
Compacted	124	98(79.0)	16(12.9)	8(6.5)	2(1.6)	-
Partial	112	2(1.8)	7(6.3)	9(8.0)	78(69.6)	16(14.3)
Denuded	117	10(8.5)	12(10.3)	17(14.5)	59(50.4)	19(16.2)

GV : Germinal vesicle, GVBD : Germinal vesicle breakdown, M-I : Metaphase I, N-C : Nuclear condensation, M-II : Metaphase II.

Table 4. Maturation rate in the pig follicular oocytes with different diameter of follicles cultured in the TCM-199 medium with ECS

Follicular diameter(mm)	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturation rate(%)
		GV	GVBD	M-I	A-I	T-I	M-II	DG	
1~2	68	1	8	23	3	4	29	1	42.6
3~5	67	1	6	16	3	3	36	2	53.2
> 6	52	1	5	10	4	1	31	2	60.8

GV : Germinal vesicle, GVBD : Germinal vesicle breakdown, M-I : Metaphase I, A-I : Anaphase-I, T-I : Telophase-I, M-II : Metaphase II, DG : Degenerated.

러한 보고들을 종합하여 볼 때 난포란의 크기에 따라 教育潜在力(developmental potential)이 다르다는 것은 Motlik 등(1984)의 보고와도 일치하였다.

난구란의 난구세포 상태를 卵丘密集, 分散 및 裸化로 구분하여 배양 후 난포란 성숙율을 조사한 바 Table 5에 제시되어 있듯이 각각 60.4%(29/40), 40.0%(29/63), 35.4%(28/74)로 난구세포가 밀집한 난포란의 成熟率이 가장 양호하였고, 난구밀집에 비하여 분산 및 나화 난포란구에서 退化난자수가 증가하였다.

Leibfried와 First(1979)는 소에 있어서 난구세포가 부착된 난포란(compact, partial, expanded)

간에는 큰 차이가 없는 반면, 裸化된 난자는 이들 난자에 비하여 성숙율이 현저히 떨어지는 경향이 있다고 보고한 바 있으며, Fleming 등(1985)은 rat 난포란에서 난구부착 정도가 난포란의 성숙에 영향을 주지 않는다고 발표한 바도 있다.

반면, 牛卵胞卵에서 Shioya 등(1988)은 FCS와 hormone을 添加培養하여 난구세포 밀집, 분산, 나화에서 각각 97.4, 89.8와 52.9%의 성숙율을 보고하였고, Zhiming 등(1990)은 山羊卵胞卵을 TALP배양액에서 compacted, thin cumulus, nude로 구분하였을 때 56.7%(17/30), 44.4%(24/54) 및 33.3%(17/51)의 성숙율을 보고하였다. 이들의 결과

Table 5. Maturation of pig follicular oocytes with different configuration of cumulus cell mass in culture with ECS added to TCM-199

Configuration cumulus cell mass	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturation rate(%)
		GV	GVBD	M-I	A-I	T-I	M-II	DG	
Compacted	68	—	3	12	2	1	29	2	60.4
Partial	63	1	6	16	3	4	29	4	46.0
Denuded	74	5	10	15	5	3	28	10	35.4

GV : Germinal vesicle, GVBD : Germinal vesicle breakdown, M-I : Metaphase I, A-I : Anaphase-I, T-I : Telophase-I, M-II : Metaphase II, DG : Degenerated.

Table 6. Effects of cumulus cell on the maturation of pig follicular oocytes cultured in TCM-199 with ECS

Culture system	No. of oocytes examined	Nuclear stages							Maturation rate(%)
		GV	GVBD	M-I	A-I	T-I	M-II	DG	
With cumulus cell	63	4	8	10	3	1	36	1	57.1
Without cumulus cell	58	4	10	11	2	—	31	—	53.4

GV : Germinal vesicle, GVBD : Germinal vesicle breakdown, M-I : Metaphase I, A-I : Anaphase-I, T-I : Telophase-I, M-II : Metaphase II, DG : Degenerated.

와 본 연구결과를 종합하여 볼 때 난구세포의 부착 정도와 부착유무 여부는 난포란 성숙에 영향을 미치며 난구세포가 밀집된 난자의 성숙율이 양호한 것으로 사료되었다.

卵丘細胞가 밀집한 난포란을 48시간까지 배양접시 바닥에 형성된 單層(monolayer)에서 배양한 성적과 배양액만 첨가된 소적에서의 난포란 성숙율을 비교한 결과는 Table 6에 제시되었다.

卵丘細胞 單層에서 총 63개의 난포란중 57.1% (36개)의 성숙율을 보인 반면, 난구세포층이 없는 배양액에서는 53.4%(3/58)의 성숙율을 보여 두 처리구간 有意差는 없지만 난구세포 單層培養이 다소 양호한 것으로 나타났다.

摘 要

본 연구는 난포란의 난구세포 附着狀態에 따른 여러 가지 要因들이 돼지 체외성숙에 미치는 영향을 규명하기 위해서 실시하였다. 채취된 난포란은 여러 가지 주사바늘과 난포란의 크기 그리고 난구세포, 제기 여부 등에 따라 실험을 하였으며, 培養은 FCS가 첨가된 TCM-199 배양액에서 30~48시간, 5% CO₂와 38.5°C 조건의 배양기내에서 실시하였다. 그리고 orceine으로 염색한 후 體外成熟 상태 즉, GV, GVBD, M I, anaphase, telophase, M II 등으로 조사분석한 결과를 要約하면 다음과 같다.

1. 주사기에 부착된 바늘의 크기에 따라 난구세포 밀집 난포란 回收率은 18, 21 및 26 guage에서 각각 55.8, 55.5 그리고 34.4%였다.
2. 回收된 난포란중 난구세포가 밀집된 난포란의 대부분은 난핵포기(GV stage)의 발육단계를 보였고, 卵丘細胞가 부분적(partial)으로 밀집된 것과 裸化(denuded)된 난포란은 GVBD에서 M II 까지 발육단계를 보였다.
3. 卵胞直徑에 따른 난포란 성숙율은 1~2, 3~6 및 6mm 이상 구에서 각각 42.6, 53.2 및 60.8%였다.
4. 난구세포 密集, 分散 및 裸化된 난포란의 성숙율은 각각 60.5, 46.2 및 35.4%로 난구세포 밀집 난포란이 가장 양호하였다.
5. 난구세포 單層에서 배양한 난포란(57.1%)이

배양액에서 배양한 난포란(53.4%)보다 높은 성숙율을 보였다.

參考文獻

- Bae IH and Foote RH. 1975. Effects of hormone on the maturation of rabbit oocytes recovered from follicles of various size. J. Reprod. Fert., 12:357-360.
- Bar-ami Z and Tsafiriri A. 1981. Acquisition of meiotic competence in the rat: role of gonadotropin and estrogen. Gamete Res, 4: 463-472.
- Bae IH and Channing OP. 1985. Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enveloped pig follicular oocytes isolated from medium-sized Graffian follicles. Biol. Reprod., 33:79-87.
- Cheng WTK, Moor RM and Polge O. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology, 25:146(abstr).
- Cross PO and Brinster RL. 1970. *In vitro* development of mouse oocytes. Biol. Reprod., 3:298-307.
- Cross PG. 1973. The role of cumulus cells and serum in mouse matured *in vitro*. J. Reprod. Fert., 34:241-245.
- Edward RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature. London., 203: 349-351.
- Erickson GF and Sorensen RA. 1974. *In vitro* maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and preantral Graffian follicles. J. Exp. Zool., 190:123-127.
- Fleming AD, Evans G, Walton EA and Armstrong DT. 1985. Developmental capability of rat oocytes matured *in vitro* in defined medium. Gamete Res., 12:255-263.
- Fulka J and Motlik J. 1980. *In vitro* maturation.

- Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. & AI Vol. II, pp.55-62.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effects of sera, hormone and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert., 86:501-506.
- Goto K, Kajihara Y, Koba S, Nakanish Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83:753-758.
- Funahashi H, Cantley T and Day BN. 1994. Different hormonal requirements of pig oocytes-cumulus complexes during maturation *in vitro*. J. Reprod. Fert., 101, 159-165.
- Hoope PO. 1976. Glucose requirement for mouse sperm capacitation *in vitro*. Biol. Reprod., 15:39-45.
- Kaneko H, Terada T, Goto K, Nakashima T, Ogata K, Komdoh M, Taya K and Sasamoto S. 1989. Suppression of the perovulatory surge of FSH in superovulating cattle pretreated with porcine FSH. Jan. J. Anim. Reprod., 35:7-13.
- Cox Hormazabal JF and Santa Maria A. 1993. Effect of the cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. Theriogenology, 40:1259-1269.
- Leibfried L and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocyte and their ability mature *in vitro*. J. Anim. Sci., 48:76-86.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology, 31:1201-1207.
- Moor RM and Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert., 49:101-109.
- Moor RM and Orosby IM. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes isolated from early antral follicles. J. Reprod. Fert., 72:323-328.
- Motlik J and Fulka J. 1981. Fertilization rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. J. Reprod. Fert., 63:425-429.
- Motlik J, Crozet N and Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. J. Reprod. Fert., 72:323-328.
- Nagashima H, Nagai T and Yamakawa H. 1993. *In vitro* development of *in vivo* and *in vitro* fertilized porcine zygotes. Mol. Reprod. Dev., 36:163-168.
- Naito K, Fukuda Y and Ishibashi I. 1989. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular *in vitro* and fertilization *in vitro*. Theriogenology, 31:1049-1056.
- Pinous G and Enzmann EV. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*, I. The activation of ovarian eggs. J. Exp. Med., 62:665-675.
- Salustri A, Siraousa G. 1983. Metabolic coupling, cumulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured *in vitro* in the presence of FSH or dCAMP, or stimulated *in vivo* by hCG. J. Reprod. Fert., 68:335-341.
- Sato E, Matsuo M and Miyamoto H. 1990. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. J. Anim. Sci., 68:1182-1187.
- Shalgi R, Dekel N and Kraicer PF. 1979. The effect of lh on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert., 55:429-435.
- Shea BF, Laour JPA, Bedrin KN and Baker RD. 1976. Maturation *in vitro* and subsequent

- penetrability of bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. Theriogenology, 30: 489-496.
- Sirard MA and Bilodeau S. 1990. Effects of granulosa cell co-culture on *in vitro* meiotic resumption of bovine oocytes. J. Reprod. Fert., 89:459-465.
- Suss I, Wuthrick K and Stranzinger G. 1988. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. Biol. Reprod., 38:871-880.
- Staigmiller RB and Moor RB. 1984. Effect of follicles cells on the maturation and developmental competence of bovine oocytes.
- Shamsuddin M, Larsson B and Rodriguez-Martinez H. 1993. Maturation-related change in bovine oocytes under different culture conditions. Anim. Reprod. Sci., 31:49-60.
- Trafriri A and Channing CP. 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. Endocrinology, 96:922-927.
- Tsuji K, Sowa M and Nakano R. 1985. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. Biol. Reprod., 32: 413-417.
- Wang ZK, Wei PH, Wang JZ, Lei C and Kou MQ. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 37: 733-739.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Pursel VG. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 31:68-71.
- Zaeng YS and Sirard MA. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. Theriogenology, 37:779-790.
- Zhiming H, Jianchen W and Jufen Q. 1990. *In vitro* maturation of follicular oocytes from the mouse and dairy goat. Theriogenology, 33:364(abstr).
- 김창근, 정영채, 이명식, 윤종택, 방명걸, 정길생. 1990. 돼지 난포란의 체외성숙에 관한 연구. 한국가축번식학회보, 14:84-91.
- 박수봉, 박항균. 1990. 체외배양시 과립막세포와 공배양된 돼지난포란의 성숙과 수정. 한축지. 32:15-19.