

돼지난포란의 동결과 체외수정에 관한 연구

이장희 · 김창근* · 정영채*

축산기술연구소 종축개발부

Freezing and *In Vitro* Fertilization of Porcine Oocytes

Lee, J. H., C. K. Kim* and Y. C. Chung*

Department of Livestock Improvement, National Livestock Research Institute

SUMMARY

This study was undertaken in an effort to product embryos through *in vitro* maturation(IVM), *in vitro* fertilization(IVF) and *in vitro* culture(IVC) after cryopreservation of immature and mature porcine oocytes. The experiments were conducted to investigate IVM rate of oocytes frozen with 3 different cryoprotectants and to examine IVF and IVC of frozen-thawed oocytes.

The CEI(cumulus cells expansion index) after IVM of frozen-thawed immature oocytes was higher in oocytes frozen with PG+PEG(propylene glycol plus polyethylene glycol) than those frozen with single cryoprotectant and this index was almost 90% of unfrozen oocyte's index(2.39 vs. 2.66). The IVF rate of all frozen oocytes was very low(68% of unfrozen oocytes) and the IVF rate of frozen immature oocytes was slightly higher than that of frozen mature oocytes(39.0% vs. 34.4%), but polyspermic penetration was higher in frozen immature oocytes(21.9% vs. 19.1%). The cleavage rate after IVF of frozen-thawed oocytes was 9.3% for frozen mature oocytes and 11.3% for frozen immature oocytes and this rate was significantly lower($P < 0.05$) than that of control(60.7%). The development to 8-cell stage was greatly lower in frozen mature oocytes than in frozen immature oocytes.

The results indicate that the use of PG plus PEG as cryoprotectant may be very effective for vitrification of porcine oocytes and the frozen-thawed immature porcine oocytes can be used for *in vitro* embryo production based on IVM, IVF and IVC system.

(key words : Embryo production, Freezing, IVF, *In vitro* maturation, Porcine oocyte)

I. 서 론

난자의 동결은 암컷배우자의 유전자원 장기보존의 수단 뿐만 아니라 체외수정을 통한 수정란 대량확보의 수단으로 최근 여러 동물에서 관심이 고조되고 있다. 일반적으로 난자의 동결은 다른 세포와는 달리 난자가

매우 큰 세포이기 때문에 동결에 따른 손상이 크며, 특히 세포체질(cytoskelton), 방추사, 난황막, 투명대 및 표층과립의 파괴 등의 일반구조와 분자구조의 변화가 따르게 된다(Parks와 Ruffing, 1992; Dobrinski 등, 1997). 난포란의 동결시기도 성숙(Schmidt 등, 1993; Lim 등, 1991; Leibo, 1977) 또는 미성숙단계(Suzuki와 Nishikata, 1992; Van Blerkom, 1989)

*중앙대학교 축산학과(Department of Animal Science, Chung-Ang University)

에서 행하여지고 있으나 이들 난자의 동결성에 대한 연구결과가 보고자간에 차이가 많다. 성숙난포란의 동결시 Rall(1992), Hamlett 등(1989)은 동결보호제에 노출되고 냉각되는 동안 metaphase 단계에서 방추사와 피층과립의 파괴가 일어남에 따른 손상을 보고하였고, 미성숙 난포란의 동결시 Van Blerkom(1989)은 비정상적인 성상체(aster)의 형성으로 방추사의 수적인 감소가 일어나는 것으로 보고하였다.

돼지난포란의 체외수정에 관해서 Mattioli 등(1989)은 채란된 난포란의 크기에 따라 체외수정 후 배발생에 차이가 있음을 보고하였고, Galeati 등(1991), Hawk 등(1992) 및 Wang 등(1997)은 수정시 난구세포의 유무에 따라 발생율이 다르다고 하였으며, Kikuchi 등(1993)은 난자의 형태가 수정율에 영향을 미친다고 하였다. 한편 Hyttel과 Niemann(1990)은 체외성숙난포란의 체외수정 후 배발생은 발생과정 중 여러가지 미세구조의 변화와 세포질 내의 공포형성 때문에 산자까지의 도달율이 저하된다고 한 바 있다. 그러나 아직까지 돼지 동결-난자로부터 산자생산이 성공된 예가 없으며 발생율도 극히 저조한 실정이다(Otoi 등, 1993; Rubinsky 등, 1991).

따라서 본 연구에서는 돼지 난포란의 동결시 동결보호제에 따른 생존성을 비교하고 성숙 또는 미성숙 동결난포란의 체외수정율을 조사하였으며 이들에 대한 체외발생율을 조사하여 동결난포란으로부터 체외수정란의 생산 가능성을 알기 위하여 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시난자

본 실험에 공시된 난포란은 도축장에서 도살직후 난포기의 난소로부터 적출하여 inverted microscope(Olympus SZ-PT, Japan) 하에서 난구세포층이 충분한 난자-난구세포 complex만을 선별하여 공시하였다.

2. 난포란의 동결보존 및 용해

1) 동결보존액의 제조

기본 동결보존액은 Yang 등(1992)의 방법에 따라 제조하였다. 평형용 보존액으로는 Kobayashi 등(19

90)과 Yang 등(1992)의 방법에 따라 기본 배양액에 각각 10% glycerol(G)+20% propylene glycol(PG; Sigma, USA)를 첨가하였고, 동결용 보존액으로는 25% glycerol(G) 용액에 각각 25%의 PG, PEG(polyethylene glycol) 또는 PG+PEG를 첨가하여 제조하였다. 또한 용해 후 동결보호제 제거용 희석액은 기본배양액에 0.25 및 1.0M의 sucrose용액을 사용하였다.

2) Straw내 장전과 봉인

포장방법은 Schiewe 등(1991)과 Kobayashi 등(1990)의 방법에 따라 동결보존액과 sucrose 용액의 혼합방지를 위해 double air층을 두고 0.25ml straw(I.M.V., France) 내에 미리 충전하였고 제작의 균일성과 난포란의 장전을 쉽게 하기 위하여 보존액이 들어있는 straw를 냉동고(-20℃)에 보관하였다가 사용 직전에 냉장고로 옮긴 후 처리가 끝난 난포란을 상온에서 장전시켰다.

3) 동결방법

Yang 등(1992)의 동결방법에 준하되 성숙 및 미성숙 난포란을 상온에서 다음과 같이 실시하였다. 즉 동결시킬 난자를 10% G + 20% PG에 10분간 또는 30분간 평형시킨 후 끝이 긴 micropipette을 이용하여 평형된 난포란을 미리 용해하여 준비해둔 straw 내의 동결보존용 25% G + 25% PG용액, 25% G + 25% PEG용액 또는 25% G + 12.5% PG + 12.5% PEG 용액 내에 장전하였다. 난포란의 장전이 끝난 straw는 polyvinyl alcohol(sealing powder)로 봉인하고 4℃ 냉장고에 10~30분 정도 정지한 후 Smorag와 Gajda(1991)의 방법과 같이 액체질소표면 약 5cm 위에서 5분간 수직으로 정지하여 예비동결시킨 다음 액체질소 내로 침지시켜 동결하였다.

4) 용해 및 동해보호제의 제거

동결된 straw를 20℃ waterbath에서 10초간 용해시켰다. 용해된 straw의 내용물 전부를 petri dish(35mm×5mm, Falcon, USA)에 쏟아 부어 10분간 정지한 다음 0.25M sucrose용액으로 옮겨 5분간 정지하고 기본 배양액으로 2~3회 세척하는 2단계 희석법으로 동결보호제를 제거하였다.

3. 동결난포란의 체외성숙

동결난포란의 체외성숙은 Yoshida 등(1990, 1992)의 방법에 따라 제조된 TCM 199 Earl's salt에 hCG(10 IU/ml, Chorulon, Intervet Co., Holland)와 PMSG(10 IU/ml, Folligon, Intervet Co., Holland)을 첨가하고 micromilipore filter(0.2 μ m)로 여과시킨 성숙배양액을 4-well dish(Cat. No. 176740, Nunclon, Denmark)에 0.5ml씩 분주한 후 39 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 95% air, 5% CO₂ incubator (Model No. 2300, Sheldon, USA)에서 42시간 배양시켰다.

체외성숙판정은 Fagbohun과 Downs(1990) 및 Fenton 등(1993)의 방법에서 등급기준을 다소 수정한 이 등(1994)의 방법에 따라 성숙정도를 난구세포 팽화지수(CEI : cumulus cells expansion index)로 표시하였다. 이때 난구세포팽화지수는 난구세포팽화 정도(Di ; i=1, 2 및 3)와 팽화정도에 대한 빈도(Fi)에 대해서 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

$$\text{난구세포팽화지수, CEI} = \frac{\sum D_i F_i}{\sum F_i} \text{으로 구하였다.}$$

4. 체외수정

Yoshida 등(1990)의 방법에 따라 제조된 TCM 199 Earl's salt 용액에 0.1mg/ml heparin(Sigma, USA)을 첨가한 수정 배양액이 들어있는 4-well dish의 well 당 신선 또는 동결 난포란을 10~30개씩 옮긴 후 이 등(1994)의 방법에 따라 수정능획득 전처리기간 끝난 정소상체 미부정자를 5 \times 10⁵/ml 되게 주입하고 멸균 파라핀오일로 피복한 다음 39 $^{\circ}$ C, CO₂ incubator에서 20시간 동안 수정시켰다. 수정 후 일부의 난자는 1% aceto orcein으로 염색하여 정자 두부의 팽화와 정자 미부의 유무 및 응성 또는 자성전핵의 형성 여부로서 수정을 판정하였다.

5. 수정란의 체외배양

이 등(1994)의 방법에 따라 제조된 발생배양액에 옮겨 매 24시간마다 신선배양액으로 1/2씩 교환하였으며 수정 후 120시간까지 배양하여 분할된 수정란을 조사하였다.

6. 통계분석

실험결과와 통계분석은 Minitab statistical software(Minitab, New York, 1985)의 일반선행모델을 사용하여 Student's t-test로 유의성 검정을 실시하였으며 수정란의 난할율은 χ^2 -test로 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 동결 미성숙난포란의 체외성숙

Propylene glycol(PG), polyethylene glycol(PEG) 및 PG + PEG의 동해보호제로 10분간 평형하여 동결시킨 미성숙난포란을 용해후 42시간 동안 배양시키고 난포란의 성숙도를 난구세포의 팽화 정도에 따라 1(난구세포가 완전히 벗겨진 상태), 2(난구세포층이 2~3층인 상태) 및 3(난구세포층이 완전하게 층만한 상태)으로 구분하고 이들 처리에 대한 생존성과 성숙도를 난구세포 팽화지수(CEI : cumulus cells expansion index)로 나타내었을 때 동결용해 후 성숙 정도에 따른 난구세포 팽화지수는 Table 1에 나타난 바와 같다. PG+PEG로 동결하였을 때가 다소 높은 난구세포 팽화지수를 나타내었다. 또한 팽화 정도가 3을 나타내어 완전하게 성숙된 난자도 역시 PG+PEG에서 많았다.

PG+PEG로 동결한 미성숙난포란의 체외성숙 정도는 Rubinsky 등(1991)이 기본 AVS용액에 glyco-proteins를 첨가시킨 동결보존액에서 동결용해 후 44시간 성숙배양하였을 때의 성숙율과 유사한 결과였다. 그러나 본 실험에서 동결용해후 체외성숙에서 생존성을 간접적으로 나타낸 난구세포의 팽화 정도가 3인 난자의 비율이 PEG(12.1%)보다 PG(14.2%)가 높았던 것에 반하여 성숙율을 간접적으로 나타낸 난구세포 팽화지수는 PG보다 PEG가 높았던 것은 PEG가 비침투성 동결보호제라는 점과 난포란의 동결용해후 성숙배양시간에 따른 세포주위의 환경 변화에 기인한 것으로 사료되었다.

2. 동결난포란의 체외수정

PG + PEG로 동결한 미성숙난포란을 용해후 체외 성숙시키고, 체외성숙 후 동결용해한 성숙난포란을

Table 1. Effect of cryoprotectants on maturation of frozen-thawed immature oocytes

Cryoprotectant	No. of oocytes examined	Degree ¹⁾ of cumulus cells expansion			CEI ²⁾
		1	2	3(%)	
Control	76	5	16	55(72.4)	2.66
Propylene glycol(PG)	58	17	33	8(14.2)	1.84
Polyethylene glycol(PEG)	33	8	21	4(12.1)	1.88
PG + PEG	51	9	40	11(21.6)	2.39

1) Degree of cumulus cells expansion was assessed according to subjective scale from "1"(no expansion) to "3"(complete expansion) by a modified Fagbohun and Downs's method(1990).

Degree 3 : Cumulus-enclosed oocyte, completely.

2 : Corona-enclosed oocyte.

1 : Denuded oocyte, nearly.

2) CEI (cumulus cells expansion index) was defined as:

$$CEI = \frac{\sum D_i F_i}{\sum F_i}$$

Where,

D_i : ith value for degree of cumulus cells expansion, i = 1, 2 and 3.

F_i : frequency corresponding to D_i.

^{a,b} Values in same column with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

Table 2. Fertilization rate of frozen-thawed mature and immature oocytes at 20h after insemination

Condition of oocytes ¹⁾	No. of oocytes matured	No. of oocytes penetrated				Fertilization rate(%) ²⁾
		1 PN + swollen head	2 PN	> 2 PN (%)	Total (%)	
Control	25	7	10	3(12.0)	20(80.0)	17(68.0)
Frozen-mature oocytes	32	6	5	7(21.9)	18(56.3)	11(34.4)
Frozen-immature oocytes	41	9	7	8(19.5)	24(58.5)	16(39.0)

* All frozen oocytes was equilibrated for 30min and immature oocytes of them were matured for 42h after thawing.

**Normal fertilization rate : No. (%) of oocytes with 1 PN plus sperm-head or 2 PN at 20h after insemination.

heparin으로 처리된 정소상체미부정자와 20시간 체외 수정한 결과는 Table 2와 같다.

성숙난포란과 미성숙난포란의 체외수정율은 각각 34.4 및 39.0%로서 동결 미성숙난포란의 수정율이 다소 높았다. 그러나 동결 난포란의 수정율은 동결시키지 않은 난포란의 수정율보다 현저하게 낮았다. 한편 동결성숙 및 미성숙난포란의 정자침입율은 동결미성숙난포란에서 다소 높았으나 다정자침입율은 동결성숙난포란이 동결미성숙난포란의 보다 다소 높았으며 비동결난포란은 이들 동결난포란의 다정자침입율보다 매우 낮았다.

이러한 결과는 소에서 Arav 등(1991)은 미성숙난포란을 PG로 동결 용해하였을 때의 수정율이 비동결난포란의 수정율과 거의 같은 수준인 것으로 보고한 것과는 차이가 있었다. 또한 생쥐에서 Friedler 등(1987), Carroll 등(1989), Kono 등(1991), Shaw 등(1991, 1992)이 배란된 난자 또는 체외성숙난포란을 동결용해하여 얻은 수정율보다 낮았으며, 토끼와 사람에서 Al-Hasani 등(1986, 1987, 1989)이 과배란 난자의 동결용해에서 얻은 수정율보다도 낮았다. 그러나 Quinn 등(1982)은 햄스터의 과배란된 난자를 동결용해하여 사람 정자와 체외수정하였을 때 비동결 난자

Table 3. Developmental potential of frozen-thawed oocytes after *in vitro* fertilization

Condition of oocytes ¹⁾	No. of oocytes		No. of oocytes cleaved					Cleavage rate(%) ²⁾	
	examined		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	Morula		Total
Control	56		4	6	18	4	2	34	60.7
Frozen-mature oocytes	54		4	1	—	—	—	5	9.3
Frozen-immature oocytes	62		5	1	1	—	—	7	11.3

1) All frozen oocytes was equilibrated for 30min and immature oocytes of them were matured for 42hrs after thawing.

2) Cleavage rate was investigated at 120hrs after *in vitro* fertilization.

의 체외수정율보다 훨씬 낮다고 하였던 것은 본 실험에서 동결난포란의 다정자침입율이 비동결난포란보다 현저히 높았던 결과와 수정율에서도 차이가 매우 심한 것은 같은 경향을 보여 주었다. 생쥐에서 Glenister 등(1987)은 동결융해된 성숙난포란과 비동결난포란의 체외수정에서 polyploid의 발생율이 동결난포란에서 2배 정도 높다고 하였으며 역시 Carroll 등(1989)도 동결난포란과의 체외수정율에서 polyploid의 발생율이 높아짐을 보고한 점으로 보아 동결난포란에서 다정자 침입의 빈도가 높은 가능성을 찾을 수 있었다.

3. 동결난포란의 체외발생

동결융해한 성숙 또는 미성숙난포란의 체외수정 후 매일 1/2씩 신선배양액으로 교환하면서 120시간까지 체외배양하였을 때 난할율은 Table 3에서 보는 바와 같다.

동결 성숙난포란과 동결 미성숙난포란의 체외수정란 난할율은 각각 9.25% 및 11.29%로서 동결 미성숙난포란에서 다소 높았으며 체외성숙 후 동결된 성숙난포란에서는 8세포기 이상으로 발생된 수정란이 없었다.

이상의 결과는 생쥐에서 Schroeder 등(1990)이 동결성숙 또는 동결미성숙난포란의 체외수정 후 초기분할율이 각각 17% 및 9%로 동결성숙난포란이 높았으며 배반포까지 발생된 수정란도 동결성숙난포란에서 높았던 결과와는 상반된 결과였다. 또한 Carroll 등(1989)이 생쥐의 동결난포란과 비동결난포란에서 2세포기의 형성율이 동결난포란에서 현저히 높았으나 배반포기까지의 발생율에는 차이가 없었다고 한 결과와도 달랐다. 소에서 Lim 등(1991)이 체외성숙난포란의 동결후 체외수정에서 8세포기 이상으로의 발생이

극히 저조하였다고 보고한 것과는 유사한 경향이였다. 그러나 본 실험에서 동결미성숙난포란에서 2세포기까지 발생된 수정란의 비율은 소에서 19~27%라고 보고한 Schellander 등(1988)의 결과보다는 현저히 낮았다.

돼지에서 동결난포란의 발생성적이 대조구에 비해서 현저히 낮은 것은 4-cell block 현상과 다정자침입이 동결난포란에서 매우 높았던 것에 기인된 것으로 여겨지며, 또한 Pellicer 등(1988), Schmidt 등(1993)이 밝힌 바와 같이 동결융해에 따른 투명대의 파열, 난황막의 균열 및 난구세포와 난자간의 연결구조적 변화와도 관련이 있는 것으로 보아 난자의 미세구조의 손상을 최소화 할 수 있는 동결방법의 개발이 필요한 것으로 사료되었다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지의 성숙 및 미성숙난포란의 동결보존 후 체외성숙, 체외수정 및 체외배양을 통해서 수정란을 생산하고자 실시하였다. 이를 위해 3가지 다른 동결방지제로 동결된 난포란을 융해하여 체외성숙시 난구세포의 팽화지수에 따라 성숙 및 생존 정도를 조사하였으며, 이들 동결난포란의 체외수정 및 체외발생 가능성을 조사하였다.

동결 미성숙난포란의 체외성숙후 난구세포 팽화지수(CEI)는 PG + PEG에서 가장 높았으며 이 수준은 비동결난포란의 90% 정도였다(2.39, vs 2.66). 동결난포란의 체외수정율은 비동결난포란의 68% 정도의 수준이었다. 동결미성숙난포란의 수정율은 동결성숙난포란보다 다소 높았으나(39.0% vs 34.4%) 다정자침입율은 동결성숙난포란이 다소 높았다(21.9% vs

19.1%). 동결융해된 난포란의 수정후 난할율은 동결 성숙난포란이 9.3%였으며 동결미성숙난포란은 11.3%였다. 이 수준은 대조구보다 현저히 낮았다($P < 0.05$). 8세포기까지의 발생은 동결미성숙난포란이 동결 성숙난포란보다 높았다. 이 결과는 동결보호제로서 PG + PEG 이용이 돼지난포란의 동결에 효과적인 수 있으며 동결융해된 미성숙난포란은 체외성숙, 체외수정 및 체외발생체계에서 체외수정란 생산이 가능함을 제시해 주었다.

V. 인용문헌

- Al-Hasani, S., A. Tolksdorf, K. Diedrich, H. Van der Ven and D. Krebs. 1989. Successful *in vitro* fertilization of frozen thawed rabbit oocytes. Hum. Reprod., 1: 309-312.
- Al-Hasani, S., J. Kirsch, K. Diedrich, S. Blanke, H. van der Ven and D. Krebs. 1986. Successful embryo transfer of cryopreserved and *in vitro* fertilized rabbit oocytes. Hum. Reprod., 4(1): 77-79.
- Carroll, J., G.M. Warnes and C.D. Matthews. 1989. Increase in digyny explains polyploidy after *in-vitro* fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. J. Reprod. Fert., 85: 489-494.
- Dobrinisky, J.R., V.G. Pursel, C.R. Long and L.A. Johnson. 1997. Cryopreservation of swine embryos: *In vitro* and *in vivo* developmental competence. J. Anim. Sci., 75(Suppl. 1): 219.
- Fagbohun, C.F. and S.M. Downs. 1990. Maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex: stimulation by lectins. Biol. Reprod., 42: 413-423.
- Fenton, S.E., M.R. Dentine and R.L. Ax. 1993. Modulation of bovine oocyte-cumulus cell complex maturation and fertilization *in vitro* by glycosaminoglycans. J. Dairy Sci., 76: 701-712.
- Friedler, S., L.C. Giudice and E.J. Lamb. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil. Steril., 49: 743-764.
- Galeati, G., S. Modina, A. Lauria and M. Mattioli. 1991. Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. Mol. Reprod. Dev., 29: 40-46.
- Glenister, P.H., M.J. Wood, C. Kirby and D. G. Whittingham. 1987. Incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. Gamete Res., 16: 205-216.
- Hamlett, D.K., D.R. Franken, H.S. Cronje and H. Luus. 1989. Murine oocyte cryopreservation: comparison between fertilization success rates of fresh and frozen metaphase I and II oocytes. Arch. Androl., 23-27.
- Hawk, H.W., N.D. Nel, A.R. Waterman and R.J. Wall. 1992. Investigation of means to improve rates of fertilization *in vitro* maturation/*in vitro* fertilized bovine oocytes. Theriogenology, 38: 989-998.
- Hyttel, P. and H. Niemann. 1990. Ultrastructure of porcine embryos following development *in vitro* versus *in vivo*. Mol. Reprod. Dev., 27: 136-144.
- Kikuchi, K., T. Nagai, J. Motlik, Y. Shioya and Y. Izaike. 1993. Effect of follicle cell on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. Theriogenology, 39: 593-599.
- Kobayashi, K., H. Nagashima, H. Yamakawa, K. Kato and S. Ogawa. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. Theriogenology, 33: 777-788.
- Kono, T., O.Y. Kwon and T. Nakahara. 1991. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. Cryobiology, 28: 50-54.
- Leibo, S.P. 1977. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In the freezing

- of mammalian embryos. Ciba Foundation Symposium 52, K.Elliott and J.Whelan, eds. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 69-92.
17. Lim, J.M., Y. Fukui and H. Ono. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 35: 1225-1235.
 18. Mattioli, M., M.L. Bacci, G. Geleati and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31: 1201-1207.
 19. Otoi, T., T. Ogura, S. Tachikawa, S. Kitamura and T. Suzuki. 1993. Deep freezing of bovine oocytes using different cryoprotectants. *Theriogenology*, 39: 275.
 20. Parks, J.E. and N.A. Ruffing. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37: 59-73.
 21. Pellicer, A., H.R. Behrman, A. Lightman, A.H. De Cherney and T.G. Parmer. 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertil. Steril*, 50: 805-810.
 22. Qin, P., C. Barros and D.G. Whittingham. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilization capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66: 161-168.
 23. Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 28: 237-245.
 24. Rubinsky, B., A. Arav and A.L. Devries. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. *Cryo-letters*, 12: 93-106.
 25. Schellander, K., B.G. Brackett, F. Fuhrer and W. Schleger. 1988. *In vitro* fertilization of frozen-thawed cattle oocytes. Proc. 11th. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem. June 26-30. Dublin, Ireland. Vol. I. p.349 (abst.).
 26. Schmidt, M., P. Hyttle, T. Greve, and B. Avery. 1993. Ultrastructure of frozen/thawed bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology*, 39: 304.
 27. Schroeder, A.C., A.K. Champlin, L.E. Mobraaten and J.J. Eppig. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 89: 43-50.
 28. Shaw, P.W., A.G. Brnarde., B.J. Fuller., J. H. Hunter. and R.W. Shaw. 1992. Vitrification of oocytes using short cryoprotectant exposure: Effects of varying exposure times on survival. *Mol. Reprod. Dev.*, 33: 210-214.
 29. Smorag, Z. and B. Gajda. 1991. Vitrification of non-cultured rabbit embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 26: 151-158.
 30. Suzuki, T. and Y. Nishikata. 1992. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. *Theriogenology*, 37: 306.
 31. Van Blerkom, J. 1989. Maturation at high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocytes in mice. *Theriogenology*, 33: 365.
 32. Wang, W.H., Q.Y. Sun, M. Hosoe, Y. Shioya and B.N. Day. 1997. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol. Reprod.*, 56: 1376-1382.
 33. Yang, N.S., K.H. Lu, I. Gordon and C. Polge. 1992. Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 37: 326.
 34. Yoshida, M., Y. Ishizaki and H. Kawagishi. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 88: 1-8.
 35. Yoshida, M., Y. Ishizaki and V.G. Pursel. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 31: 68-71.
 36. 이장희, 김창근, 정영채, 박충생. 1994. 정자처리

- 와 공배양이 체외성숙된 돼지난포란의 분할에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지, 9(2): 269-277.
37. 이장희, 김창근, 정영채. 1994. 돼지난포란의 체외성숙시 성선자극호르몬의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 배발생에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지, 9(1): 85-94.
38. 이장희, 김창근, 정영채. 1994. 돼지난포란의 형태와 배양시간이 체외성숙 및 수정란의 배발생능에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지, 9(1): 73-84.
- (접수일자 : 1997. 11. 10 / 채택일자 : 1997. 11. 29)