

호르몬의 첨가가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향

임정훈 · 박병권 · 이성호* · 박창식

충남대학교 농과대학

Effect of Hormone on *In vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes

Lim, J. H., B. K. Park, S. H. Lee* and C. S. Park

College of Agriculture, Chungnam National University

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effect of hormones on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. The results obtained were as follows :

1. The maturation rates of oocytes cultured in medium containing FSH 1, 10, 50 and 100 μ g/ml were 44.6, 58.5, 42.6 and 37.9%, respectively. And those were no difference to maturation rates among the medium containing FSH. However, the maturation rate(13.7%) of oocytes cultured without FSH was significantly($P<0.05$) lower than those of oocytes cultured with FSH.
2. The maturation rates of oocytes cultured in medium containing hCG 0, 1, 10, 50 and 100IU/ml were 12.2, 11.9, 17.9, 21.9 and 45.6%, respectively. The maturation rate of oocytes cultured with 100IU/ml hCG was significantly($P<0.05$) higher than those of oocytes cultured with 0~50IU/ml hCG concentrations.
3. The maturation rates of oocytes cultured in medium containing E_2 0, 1, 10, 50 and 100 μ g/ml were 13.7, 10.5, 14.9, 11.4 and 5.9%, respectively. There were no differences to maturation rates among the E_2 concentrations.
4. The FSH+hCG treatment was the highest maturation rate in medium containing different combination of FSH, hCG and E_2 .

(Key words : FSH, HCG, Estradiol-17 β , *In vitro* Maturation, Porcine follicular oocyte)

I. 서론

토끼 난소의 난포에서 채취한 미성숙 난포란을 체외 배양하였을 때 체내에서와 같은 결과 즉, 제2성숙분열 중기(metaphase-II)의 상태로 핵성숙이 유기된다는 것이 확인(Pincus와 Enzman, 1935)된 이래, 도축되

는 가축의 난소에서 회수한 다량의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙시킨 후, 이를 각종 실험에 이용하려는 연구가 활발히 수행되고 있다(Bousquet 등, 1994 ; Nagai, 1994).

돼지 난포란의 체외성숙에 관하여 Edward(1965)는 체외성숙배양 38~46시간에 난포란의 핵성숙을 의미하는 제2성숙분열 중기에 도달되었음을 보고하였

* 국립공주전문대학(Kongju National Junior College)

고, 체외성숙된 돼지난포란의 체내수정에 관하여는 Motlik과 Fulka(1976)의 보고가 최초로, 전반적으로 다른 포유동물의 경우보다 다소 늦게 연구가 수행되었다. 최근까지 돼지 난포란의 정상적인 체외성숙을 유도하기 위하여 배양액(Eng 등, 1986), 성선자극호르몬과 혈청(Leibfried 등, 1987 ; Naito 등, 1989) 및 성숙촉진인자(Racowsky, 1985) 등을 이용하여 적정 배양조건을 밝혀내려는 연구가 지속적으로 수행되고 있다. 한편, 돼지 난포란의 성숙배양시 배양액내 호르몬의 첨가는 필수적인 것으로 알려져 있는데(Rath 등, 1995), 호르몬의 첨가는 PMSG · hCG · estradiol(Yoshida 등, 1992 ; Wang 등, 1991), FSH · LH · estradiol(Zheng과 Sirard, 1992), FSH · LH(Mattioli 등, 1990), LH · estradiol(Nagai 등, 1993) 등과 같이 2~3가지 성호르몬의 병용처리 방법이 이용되어 왔다. 그러나, 아직까지도 돼지는 다른 축종과는 달리 불완전한 체외성숙률이 높을 뿐만 아니라, 배양체제도 명확하게 확립되어 있지 않아서 체외수정란의 생산에 많은 차질을 가져오고 있는 실정이다.

이에 본 연구는 돼지난포란의 체외성숙률을 향상시키기 위하여 호르몬제를 체외성숙 배양액에 첨가할 때 호르몬의 종류, 농도 및 병용처리 방법의 효과를 구명하고자 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 난포란의 준비

실험에 공시한 난포란은 도축직후의 암돼지(체중 100 kg 내외)로부터 적출한 난소에서 채취하였다. 도살직후 적출한 난소를 100IU/ml의 penicillin G와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 30~36 $^{\circ}$ C의 멸균 생리식염수로 1~2회 세척한 다음, 동일 생리식염수에 침지하여 30분 이내에 실험실로 운반한 후, 20~25 $^{\circ}$ C의 실온에서 난소의 표면을 생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 39 $^{\circ}$ C의 온수조에 보관하면서 실험에 공시하였다.

난포란을 채취하기 위하여 18-gauge의 주사침이 장착된 20ml 주사기로 2~5mm 직경의 포상난포를 연속적으로 찢어 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 15ml 원심분리관으로 옮겨, 온수조(39 $^{\circ}$ C)에서 5~10

분간 정치시켜 난포란의 침전을 유도한 다음, 침전물만을 취하여 1.5cm 간격으로 방안을 표시한 87 \times 15mm 페트리접시(petri dish)에 넣고, 4mg/ml (w/v) BSA(bovine serum albumin, Fraction V, Sigma, USA)가 첨가된 PBS로 희석하여 실체현미경(20~40 \times)하에서 난구세포의 부착상태가 양호하고 난세포질이 균일한 난포란을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

2. 체외성숙 배양액

본 실험에 사용된 체외성숙 배양액은 TCM-HEPES 배양액을 pH 7.4, 삼투압 290~300mOsm로 조정하여 사용하였으며, 사용전에 0.22 μ m millipore filter로 여과·멸균하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도의 CO₂배양기에서 10~12시간 동안 평형시킨 후 사용하였다.

3. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 10%(v/v) FBS, 100IU/ml의 penicillin G와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-HEPES 기본배양액에 단일호르몬 처리구는 각각 1 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100 μ g/ml의 FSH, 1 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100IU/ml의 hCG, 1 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100 μ g/ml의 estradiol-17 β 를, 병용처리구는 10 μ g/ml의 FSH, 100IU/ml의 hCG, 10 μ g/ml의 estradiol-17 β 를 첨가하여 4-well plastic dish에 0.5ml씩 분주하고, mineral oil로 피복한 후, 2~3시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 습도로 조절된 CO₂배양기내에서 평형시킨 후, well당 30~35개의 미성숙 난포란을 적하하여 42시간 동안 배양하여 성숙을 유도하였다.

4. 체외성숙 난포란의 염색

각각의 배양조건에서 42시간 동안 성숙배양시킨 난포란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로 염색하여 난포란의 핵성숙단계를 비교 판정하였다. 염색방법은 먼저, 150~300IU/ml의 hyaluronidase(IV-S, Sigma USA) 용액에 성숙배양이 완료된 난포란을 옮겨 1~2분간 처리한 후, 직경이 난포란의 크기와 비슷한 미세피펫으로 pipetting하여 난구세포를 완전히 제거한 다음, 5%(v/v)의 FBS가

함유된 PBS로 2~3회 세척하였다. 멸균 slide glass 위에 난포란 10~20개를 적하한 다음, cover slip으로 덮고, 난포란의 부피로 생긴 cover slip과 slide glass의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol=1 : 3)을 흘리는 방법으로 5~10분간 고정하였다. 고정이 끝난 난포란의 염색은 염색액을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(glacial acetic acid : distilled water : glycerol=1 : 3 : 1)를 흘려 난세포질 이외의 염색액을 제거시킨 다음, 위상차현미경(400~1,000×)으로 난포란의 핵성숙 단계를 판정하였다.

5. 통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 실험자료의 통계 처리는 χ^2 검정을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. FSH, hCG 및 estradiol-17 β 의 첨가농도에 따른 체외성숙률

FSH, hCG 및 estradiol-17 β (E₂)의 단독첨가가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 효과를 구명하기 위하여 각 호르몬이 첨가된 TCM-HEPES 배양액에서 난포란을 42시간 배양한 결과는 Table 1, 2 및 3과 같다.

FSH를 배양액 ml당 1, 10, 50 및 100 μ g 첨가했을 때 난포란의 성숙률은 각각 44.6, 58.5, 42.6 및 37.9%로서 FSH 첨가농도별로 유의적(P<0.05)인 차이를 나타내지 않는 비슷한 성적이었다. 그러나, FSH를 첨가하지 않은 대조구의 성숙률은 13.7%로서 FSH를 첨가한 모든 처리구에 비하여 유의성(P<0.05)이 인정되는 낮은 성적을 나타냈다. 이와 같은 결과는 돼지

Table 1. Effect of different concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH) on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes in TCM-HEPES

Concentration of FSH (μ g/ml)	No. of oocytes examined	No. (%) of nuclear stage ¹					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
0	51	25(49.0)	4(7.8)	14(27.5)	1(2.0)	—	7(13.7) ^a
1	56	5(8.9)	6(10.7)	19(33.9)	2(3.6)	—	25(44.6) ^b
10	53	3(5.7)	5(9.4)	13(24.5)	1(1.9)	—	31(58.5) ^b
50	54	6(11.1)	3(5.6)	17(31.5)	—	4(7.4)	23(42.6) ^b
100	58	4(6.9)	1(2.3)	29(50.0)	1(2.3)	1(2.3)	22(37.9) ^b

¹ GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase

Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

^{ab} Mans in the same column with different superscripts differ significantly(P<0.05).

Table 2. Effect of different concentrations of human chorionic gonadotropin (hCG) on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes in TCM-HEPES

Concentration of hCG (IU/ml)	No. of oocytes examined	No. (%) of nuclear stage ¹					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
0	57	27(47.4)	2(3.5)	18(31.6)	2(3.5)	1(1.8)	7(12.2) ^a
1	59	26(44.1)	1(1.7)	25(42.4)	—	—	7(11.9) ^a
10	56	13(23.2)	5(8.9)	26(46.4)	2(3.6)	—	10(17.9) ^a
50	64	14(21.9)	1(1.6)	34(53.1)	1(1.6)	—	14(21.9) ^a
100	57	5(8.8)	—	26(45.6)	—	—	26(45.6) ^b

¹ GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase

Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

^{ab} Mans in the same column with different superscripts differ significantly(P<0.05).

Table 3. Effect of different concentrations of estradiol-17 β (E₂) on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes in TCM-HEPES

Concentration of E ₂ (μ g/ml)	No. of oocytes examined	No.(%) of nuclear stage ¹					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
0	52	26(50.0)	2(3.8)	15(28.8)	2(3.8)	—	7(13.7) ^a
1	57	36(63.2)	2(3.5)	13(22.8)	—	—	6(10.5) ^a
10	47	20(42.6)	—	19(40.4)	—	—	7(14.9) ^a
50	44	25(56.8)	1(2.3)	12(27.3)	—	1(2.3)	5(11.4) ^a
100	51	29(56.9)	2(3.9)	7(13.7)	—	—	3(5.9) ^a

¹ GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase

Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

^{ab}Mans in the same column with different superscripts differ significantly(P<0.05).

Table 4. Effect of FSH, hCG and E₂ on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes in TCM-HEPES

Treatments ² FSH hCG E ₂	No. of oocytes examined	No.(%) of nuclear stage ¹					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
— — —	57	27(47.4)	2(3.5)	18(31.6)	2(3.5)	1(1.8)	7(12.3) ^a
— — +	57	36(63.2)	2(3.5)	13(22.8)	—	—	6(10.5) ^a
— + —	59	26(44.1)	2(3.4)	25(42.4)	—	—	6(10.2) ^a
— + +	58	29(50.0)	1(1.7)	19(32.8)	—	1(1.7)	8(13.8) ^a
+ — —	80	19(23.8)	1(1.3)	23(28.8)	1(1.3)	—	36(45.0) ^b
+ — +	58	13(22.4)	—	15(25.9)	—	1(1.7)	29(50.0) ^b
+ + —	74	13(17.6)	—	20(27.0)	1(1.4)	1(1.4)	39(52.7) ^b
+ + +	79	18(22.8)	1(1.3)	—	—	—	40(50.6) ^b

¹ GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase

Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

² 10 μ g/ml FSH, 100IU/ml hCG, 10 μ g/ml estradiol-17 β (E₂)

^{ab}Mans in the same column with different superscripts differ significantly(P<0.05).

미성숙난포란의 체외배양시 FSH의 첨가가 난포란의 핵성숙을 촉진시켰으며(Eppig, 1982), PMSG를 단독으로 첨가하여 배양했을 때 배양시간별로 GVBD 도달률과 성숙률을 높이는데 매우 효과적인 것으로 나타났다고 보고한 Funahashi 등(1994)의 보고 및 성숙배양액에 PMSG를 첨가하므로써 성숙률이 현저히 높아졌다고 한 Wu 등(1992)의 보고와 일치하는 결과였다.

HCG를 배양액 ml당 0, 1, 10, 50 및 100IU 첨가했을 때 난포란의 성숙률은 각각 12.2, 11.9, 17.9, 21.9 및 45.6%를 나타냈는데, 100IU/ μ l의 hCG를 첨가했을 때의 성숙률이 0~50IU/ml를 첨가했을 때의 성숙

률보다 유의적(P<0.05)으로 높은 성적을 나타냈다. 이와 같은 결과는 Kim 등(1990)의 hCG의 첨가수준에 따라 난포란의 체외성숙률에 차이가 있음을 보고한 결과와 어느 정도 일치하는 성적이었지만, Minato와 Toyoda(1982)의 mKRB 배양액에 hCG를 단독첨가했을 때 GVBD와 난구세포의 팽화를 촉진시키지 못하였다고 한 보고와는 일치되지 않는 결과로서, 추후 100IU/ml 이상의 고단위 hCG 첨가효과에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

E₂를 배양액 ml당 0, 1, 10, 50 및 100 μ g 첨가하였을 때 돼지난포란의 성숙률은 각각 13.7, 10.5, 14.9, 11.4 및 5.9%로 나타나서 체외성숙배양액내 E₂ 첨가

는 돼지난포란의 체외성숙에 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다. 이와 같은 결과는 androgen이나 E₂는 돼지난포란의 체외성숙을 촉진시키지 못하였고 오히려 억제시켰다고 한 보고(Racowsky, 1985)와 대체로 일치하는 결과였으며, Racowsky와 McGaughey(1982)의 BSA나 혈청이 함유되어 있는 배양액 조건에서 E₂의 첨가는 난포란의 성숙에 유의적인 영향을 미치지 못하였다는 보고와 E₂가 난포란의 성숙에 절대적인 요소가 아니라고 한 Fukui 등(1983)의 보고와 일치하는 결과였다.

2. FSH, hCG 및 estradiol-17β의 병용첨가에 따른 체외성숙률

FSH, hCG 및 estradiol-17β(E₂)의 병용첨가가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여, TCM-HEPES 배양액에 10μg/ml FSH, 100IU/ml hCG, 10μg/ml estradiol-17β를 첨가 또는 무첨가처리를 조합하여 42시간 배양한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같이, 전 처리구 중에서 FSH+hCG 병용첨가구가 가장 높은 체외성숙률(52.7%)을 나타냈다. 또한, FSH가 첨가된 처리구의 체외성숙률이 45.0~52.7%로서 FSH 무첨가구의 체외성숙률 10.5~13.8%보다 유의적(P<0.05)으로 높은 성숙률을 나타냈으며, hCG 및 E₂의 첨가 여부에 따른 유의성은 인정되지 않아서 결국 돼지난포란의 체외성숙에 있어서 FSH의 중요성이 인정되는 반면에 hCG 및 E₂의 효과는 크지 않은 것으로 사료되었다. 이와 같은 결과는 축종은 다르지만 소에서 TCM-199 배양액에 FSH+hCG+E₂ 병용첨가한 처리구(99%)가 호르몬을 첨가하지 않은 대조구(84%)보다 높은 Met-II 도달률을 나타냈다고 한 Sirard 등(1988)보고 및 FSH+hCG+E₂ 병용첨가한 처리구에서 GVBD가 98% 이상 일어났다고 한 Funahashi와 Day(1993)의 보고에 비하여 저조한 성적이었으나 비교적 일치하는 결과였다.

IV. 적 요

본 연구는 호르몬의 첨가가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실시되었는 바, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. FSH를 배양액 ml당 1, 10, 50 및 100μg 첨가하였을 때 난포란 성숙률은 각각 44.6, 58.5, 42.6 및 37.9%로서 FSH 첨가농도간에 유의적(P<0.05)인 차이를 나타내지 않는 비슷한 성적이었다. 그러나, FSH를 첨가하지 않은 대조구의 성숙률은 13.7%로서 FSH를 첨가한 모든 처리구와 유의성(P<0.05)이 인정되는 낮은 성적을 나타냈다.
2. hCG를 배양액 ml당 0, 1, 10, 50 및 100IU 첨가하였을 때 난포란의 성숙률이 각각 12.2, 11.9, 17.9, 21.9 및 45.6%로 나타나서 hCG를 100 IU/μl 첨가하였을 때의 성숙률이 0~50IU/ml 첨가하였을 때의 성숙률보다 유의적(P<0.05)으로 높은 성적을 나타냈다.
3. E₂를 배양액 ml당 0, 1, 10, 50 및 100μg 첨가하였을 때 난포란의 성숙률은 각각 13.7, 10.5, 14.9, 11.4 및 5.9%로 나타나서 E₂의 첨가농도간에 유의차가 인정되지 않았다.
4. FSH, hCG 및 estradiol-17β(E₂)의 병용첨가 전 처리구중에서 FSH+hCG 병용첨가구가 가장 높은 체외성숙률(52.7%)을 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Bousquet, D., C. Milovanov, J. C. Bell, J. Drocher and L. C. Smith. 1994. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. Therio., 172. Abstr.
2. Byun, T. H., S. H. Lee and H. B. Song. 1991. Development of a rapid staining method for of the oocytes from domestic animals. Kor. J. Anim. Sci., 33:25-31
3. Edward, R. G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature, 208:349-351.
4. Eng, L. A., E. T. Konegay, J. Huntington and T. Wellman. 1986. Effects incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert., 76:657-662.

5. Eppig, J. J. 1982. The relationship between parthenogenetic embryonic development and cumulus cell oocyte intercellular coupling during oocyte meiotic maturation. *Gamete Res.*, 5:229-237.
6. Funahashi, H. T. and B. N. Day. 1993. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 98:177-185.
7. Funahashi, H., T. Cantley and B. N. Day. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 101:159-165.
8. Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono. 1983. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedure. *Therio.*, 20(6):651-660.
9. Kim, C. K., Y. C. Chung, M. S. Lee, J. T. Yoon, M. G. Pang and K. S. Chung. 1990. Studies on *in vitro* maturation of pig follicular oocytes. *Korean J. Anim. Reprod.*, 14:84-91.
10. Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Crister, W. H. Eyetone, D. L. Northey and N. L. First. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* 36:376-383
11. Mattioli, M. G., M. L. Galeati and B. Baboni. 1990. Changes in maturation promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:119-125.
12. Minato, Y. and Y. Toyoda. 1982. Induction of cumulus expansion and maturation division of porcine oocyte cumulus complexes *in vitro*. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 53:480-487.
13. Motilik., J., and J. Fulka. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 198:155-162.
14. Nagai, T. 1994. Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Therio.*, 41:73-78.
15. Nagai, T., J. Ding and R. M. Moor. 1993. Effects 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 I. Ishibashi. 1989. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid in *in vitro* and fertilized *in vitro*. *Therio.*, 31:1049-1057.
17. Pincus, G. and E. V. Enzmann. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 62: 655-657.
18. Racowsky, C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J. Reprod. Fert.*, 74:9-24.
19. Racowsky, C. and R. W. McGaughey. 1982. Further studies of the effects of follicular fluid and membrane granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 66:505-512.
20. Rath, D., H. Niemann and T. Tao. 1995. *In vitro* maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effect on fertilization and embryo yield *in vitro*. *Therio.*, 44: 529-538.
21. 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.
22. Sirard, M. A., J. J. Parrish, C. B. Ware, M. L. Leibfried-Rutledge and N. L. First. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.*, 39:546-552.
23. Wu, G. M., P. C. Qin, J. H. Tan and L. A. Wang. 1992. *In vitro* maturation of *in vitro*

- matured pig oocytes. *Therio.*, 37:323.
24. Yoshida, M., K. Ishigaki and V. G. Pursel. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. & Develop.*, 31: 68-71.
25. Zheng, Y. S. and M. A. Sirard. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular fluid on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Therio.*, 37:779-790.
(접수일자 : 1997. 1. 13 / 채택일자 : 1997. 2. 29)