

Nitric Oxide 화합물 첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과

박기은 · 박춘근 · 김정익 · 정희태 · 박동현 · 양부근[†]

강원대학교 동물자원과학대학

Effect of Nitric Oxide Compounds on the Development of Porcine IVM/IVF Embryos

Park, K. E., C. K. Park, C. I. Kim, H. T. Cheong, D. H. Park and B. K. Yang[†]

College of Animal Resource Science, Kangwon National University

ABSTRACT

This study was carried out to examine the effects of nitric oxide compounds (hemoglobin and L-NAME) on the development of porcine *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) oocytes.

Cumulus cell free embryos derived from porcine IVM/IVF oocytes were cultured in NCSU23 medium containing 1~5 μ g/ml hemoglobin added to 44 and 96hrs in culture times, and in NCSU23 medium containing 0, 10, 50 or 100mM L-NAME.

The developmental rates beyond morulae stage in 0, 1 and 5 μ g/ml hemoglobin groups add to 44hrs *in vitro* culture times were 52.4%, 57.6% and 57.4%, respectively. The addition of hemoglobin groups made it slightly higher than the control group.

The proportion of embryos developed to morulae and blastocysts in 1 μ g/ml hemoglobin add to 96hrs after *in vitro* culture (70.8%) was a little higher than those of 0 and 5 μ g/ml hemoglobin (66.2% and 62.8%). There was no significant difference in all groups ($P>0.05$).

The developmental rates beyond morulae stage in 0, 10, 50 and 100mM of L-NAME groups add to 96hrs after *in vitro* culture were 65.2%, 73.5%, 70.1% and 58.8%, respectively. 10mM and 50mM L-NAME groups were significantly higher than in 0 and 100mM of L-NAME groups ($P<0.05$).

In conclusions, these results indicate that L-NAME (10mM, 50mM) can increase the proportion of embryos that develop into morulae and blastocysts but hemoglobin did not affect.

(Key words ; Nitric oxide, Serum, Porcine, IVM/IVF embryo, Cleavage rates)

I. 서론

수정란의 대량 확보를 위해서 최근에는 도축되는 가축의 난소에서 회수한 미성숙란을 이용하고

있으며, 체외에서 성숙, 수정시킨 후 생산된 체외 수정란을 이용하여 각 분야의 연구가 활발히 진행되고 있다. 돼지의 체외수정에 관한 연구는 Edwards (1965)가 난포란의 체외성숙을 처음으로 보고한 이후, Iritani 등 (1978)이 체외수정을 처음으로

[†] Corresponding author : College of Animal Resources Science, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea, 033-250-8623, E-mail; bkyang@kangwon.ac.kr

성공하였고, Mattioli 등 (1989)은 체외수정란을 이식하여 산자를 생산하기에 이르렀다.

대부분 포유동물의 체외수정란의 체외배양은 일정한 발달단계까지 발달한 후 발육이 지연되거나 정지가 되는 체외발육억제현상이 나타나기 때문에 정상적인 수정란의 확보에 많은 어려움이 있고, 산자 생산이 극히 제한되고 있는 실정이다. 돼지에서는 체외발육 억제현상이 4세포기에서 나타난다 (Jarrell 등, 1991 ; Schoenbeck 등, 1992). 이러한 발육억제 원인으로는 초기배 수정란의 genome 활성화 유·무와 체외배양액 내의 높은 산소 농도에 의해 발생하는 free radical 등이 한가지 원인으로 지적되고 있으며, 또한 체외수정란의 체외배양시 생성되는 수정란에 대하여 유해한 역할을 하는 독성물질을 제거하지 못하여 체외발육율이 저조한 것으로 보고되고 있다 (Bize 등, 1991 ; Pabon 등, 1989). 이와 같은 체외배양 체계를 개선하여 체외수정란의 체외발육율을 증진시키기 위한 방법으로서 체외배양시 산소농도의 조절, 배양액에 첨가되는 단백질원의 검토, free radical을 제거하기 위한 항산화제의 첨가, 수정란의 발육을 촉진시키기 위한 성장인자와 macromolecule 첨가 및 체세포 공동 배양체계가 이용되고 있으며 좋은 체외발육율을 얻고 있다 (Allen과 Wright, 1984 ; Coskun 등, 1991 ; Grupen 등, 1995 ; Li 등, 1993 ; Thompson 등, 1990).

본 연구는 돼지 체외 수정란의 체외배양체계에 대한 기초 자료를 확립하기 위하여 체외배양시 nitric oxide (NO) 화합물이 돼지 체외수정란의 체외발육율에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취

도축장에서 도축된 성숙모돈의 난소를 추출하여 25°C의 멸균생리식염수에 100IU/ml의 penicillin G (Sigma, USA)과 100 µg/ml의 streptomycin sulfate (Sigma, USA)가 함유된 난소운반액에 넣어 1~2시간내에 실험실로 운반한 후, 직경이 3~5 mm의 난포로부터 미성숙 난자를 채취하였다. 채

취된 난포란은 실험현미경하에서 난자주위의 난구세포가 균일하게 둘러싸여 있는 것만을 선별하여, Dubelcco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS ; Gibco, USA)에 0.1% polyvinyl alcohol이 첨가된 난자 회수액 (PBS-PVA)과 난자성숙용 배양액 (NCSU23)으로 각각 2회 세척후 성숙배양에 이용하였다.

2. 난포란의 체외성숙

난포란의 성숙배양을 위하여 NCSU23 (North Carolina state university 23) 배양액에 10IU/ml eCG와 10IU/ml hCG의 호르몬이 함유된 1차 성숙배양액으로 22시간 동안 1차 성숙배양을 실시하였다. 1차 성숙배양후 호르몬이 첨가되지 않은 NCSU23 배양액내에서 22시간 동안 2차 체외성숙을 실시하였다.

성숙배양시 배양조건은 5% CO₂ 고습도 가스조건과 38.5°C의 온도조건에서 성숙배양을 실시하였다. 체외성숙 배양액에 첨가된 난포액은 직경이 3~5mm인 액상난포에서 채취한 난포액을 1500×g, 4°C 조건에서 30분간 원심분리 (Beckman, England)한 후, 0.2 µm Syringe filter (녹십자, 한국)로 여과하여 -20°C에서 사용 전까지 냉동보관 하였다.

3. 난포란의 체외수정

동결정액을 37°C의 항온수조에서 30초~1분간 용해한 후 D-PBS에 1mg/ml의 bovine serum albumin (BSA, Sigma)과 10 µl/ml의 Antibiotic antimiotic용액 (ABAM ; Gibco)이 함유된 배양액과 혼합하여 원심분리 (900×g, 5분)로 2회 세척 후, 2 mM의 Caffeine (Sigma, U.S.A)이 첨가된 modified Tris Buffer Medium (mTBM)으로 희석시켜 정자농도가 2.0×10⁶ 정자/ml가 되도록 정자부유액을 준비하였다. 체외수정은 mTBM에 2mg/ml의 BSA가 함유된 배양액을 이용하였으며, 50 µl의 소적을 만들어 2~3시간 평형시킨 후 체외수정에 이용하였다.

체외에서 44~46시간 동안 성숙배양된 성숙난포란을 선별하여 0.1%의 hyaluronidase (Sigma, U.S.A)가 함유된 성숙배양액내에서 반복 pipetting 방법으로 난구세포를 제거시킨 후 체외수정 배양

액으로 2회 세척하여 상기방법으로 준비한 정자부 유액 50 μ l를 수정배양액내에 첨가하여 체외수정을 실시하였다. 수정후 6~8시간에 4mg/ml의 BSA가 함유된 NCSU23 배양액으로 2~3회 세척 후 40~44시간 동안 체외배양을 실시하여 생산된 2~8세포기의 체외수정란을 실험에 사용하였다.

4. 체외수정란의 체외배양

체외수정후 44시간과 96시간에 0, 1 및 5 μ g/ml의 Nitric oxide scavenger인 hemoglobin (Sigma)을 첨가배양, 체외수정후 44시간에 0, 10, 50 및 100 mM의 Nitric oxide inhibitor인 L-nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME, Sigma)을 첨가하여 5% CO₂와 5% O₂ 및 38.5°C의 온도조건에서 일정기간 체외 배양을 실시한 후 체외발육 성적을 조사하였으며, 체외에서 생산된 일부의 배반포기 수정란을 형광염색법으로 세포수를 조사하였다.

5. 체외 수정란의 세포수 조사

체외수정란의 세포수 검사는 Long 등 (1999)의 염색방법을 수정 보완하여 조사하였다. 간단하게 요약하면 체외수정란을 10%의 Triton X-100과 2%의 paraformaldehyde가 첨가된 D-PBS 배양액 내에서 37°C의 배양조건으로 한 시간 동안 고정된 후 D-PBS로 2~3회 세척을 실시하였다.

D-PBS에 20%의 glycerol, 2 μ g/ml의 hoechst 33342 (Sigma) 및 100 μ g/ml의 DABCO가 첨가된 염색액을 slide glass 위에 20 μ l의 소적을 만든 후 수정란 2~3개를 넣어 4~5분간 염색을 실시한 후

cover glass로 덮고 매니큐어로 봉입하여 형광현미경 (Zeiss, Germany; \times 200) 하에서 각각의 배반포기 수정란의 세포수를 조사하였다.

6. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 최소 유의차 검정 (least significant different test ; LSD test)을 실시하여 처리간 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. Hemoglobin 첨가에 따른 돼지 체외수정란의 체외발육

돼지 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 44시간 후에 생산된 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 NCSU23 배양액에 10% 자우혈청 (FBS)과 nitric oxide scavenger인 hemoglobin을 각각 0, 1 및 5 μ g/ml을 첨가하여 5~6일간 체외배양한 후 얻은 체외발육 성적과 배반포기 수정란의 세포수를 Table 1과 2에 요약하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이, NCSU23 배양액에 hemoglobin을 각각 0, 1 및 5 μ g/ml을 첨가한 구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육성적은 각각 52.4%, 57.6% 및 57.4%로써 hemoglobin 첨가가 대조구에 비해 다소 높은 발육성적을 나타냈으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다 ($P>0.05$). 그러나 배반포기까지 발육된 체외발육율은 1 μ g/ml의 hemoglobin 이 첨가된 처리구가 여타구에 비해 높은 성적을 나타냈다 ($P<0.05$).

Table 1. Effect of nitric oxide scavenger on the development of porcine IVM/IVF embryos cultured in NCSU23 supplemented with hemoglobin at 44hrs for *in vitro* culture

Hemoglobin (μ g/ml)	No. of cleaved embryos	No. of embryos developed to (%):			No. of morulae plus blastocysts (%)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	63	30 (47.6)	27 (42.9)	6 (9.5) ^a	33 (52.4)
1	66	28 (42.4)	26 (39.4)	12 (18.2) ^b	38 (57.6)
5	61	28 (45.9)	28 (45.9)	5 (8.2) ^a	35 (57.4)

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

Table 2. Number of total cell of porcine IVM/IVF blastocysts in NCSU23 supplemented with hemoglobin at 44hrs for *in vitro* culture

Hemoglobin (μ g/ml)	No. of blastocysts	Total cell no. of blastocysts (n)
0	5	30.0 \pm 2.55
1	5	34.0 \pm 2.55
5	5	30.4 \pm 3.21

체외배양후 생산된 배반포기 수정란의 세포수는 hemoglobin을 0, 1 및 5 μ g/ml을 첨가한 구에서 각각 30.0 \pm 2.55, 34.0 \pm 2.55 및 30.4 \pm 3.21개로서 hemoglobin 첨가구가 대조구에 비해 다소 많은 세포수를 나타냈으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다 ($P>0.05$).

돼지 난포란을 체외성숙/체외수정을 실시한 후 체외배양 96시간에 hemoglobin을 0, 1 및 5 μ g/ml을 첨가하여 3~4일간 체외배양한 후 얻은 체외수정란의 발육성적과 배반포기 수정란의 세포수를 Table 3과 4에 요약하였다.

NCSU23 배양액 (10% 자우혈청)에 hemoglobin을 0, 1 및 5 μ g/ml 첨가한 처리구에서 상실배이상 발육된 체외발육성적은 각각 66.2%, 70.8% 및 62.8%로서 1 μ g/ml hemoglobin을 첨가한 처리구가 다른 처리구보다 다소 높은 체외발육율을 나타냈지만 통계적 유의차는 인정되지 않았다 ($P>0.05$). 배반포기 수정란의 세포수는 각각 32.4 \pm 3.85, 37.8 \pm 3.70 및 41.4 \pm 5.55개로서 5 μ g/ml hemoglobin을 첨가한 처리구가 여타구 보다 다소 높

Table 4. Number of total cell of porcine IVM/IVF blastocysts in NCSU23 supplemented with hemoglobin at 96hrs for *in vitro* culture

Hemoglobin (μ g/ml)	No. of blastocysts	Total cell no. of blastocysts (n)
0	5	32.4 \pm 3.85
1	5	37.8 \pm 3.70
5	5	41.4 \pm 5.55

게 나타났으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다 ($P>0.05$).

2. L-NAME 첨가에 따른 돼지 체외수정란의 체외발육

돼지 난포란을 체외성숙, 체외수정을 실시한 후 체외배양 44시간에 Nitric oxide inhibitor인 L-NAME를 0, 10, 50 및 100mM 첨가한 배양액내에서 3~4일간 체외배양한 후 얻은 체외수정란의 발육성적과 배반포기수정란의 세포수를 Table 5와 6에 요약하였다.

10% 자우혈청이 첨가된 NCSU23 배양액에 L-NAME를 각각 0, 10, 50 및 100mM을 첨가한 처리구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 각각 65.2%, 73.5%, 70.1% 및 58.8%로 10mM 첨가구와 50mM 첨가구가 대조구와 100mM 첨가구보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 얻었다 ($P<0.05$). 배반포기까지 발육된 체외발육율은 10mM 첨가구가 50mM과 100mM 첨가구보다 통계적으로 유의하게 높은 체외발육율을 나타냈다 ($P<0.05$).

Table 3. Effect of nitric oxide scavenger on the development of porcine IVM/IVF embryos cultured in NCSU23 supplemented with hemoglobin at 96hrs for *in vitro* culture

Hemoglobin (μ g/ml)	No. of cleaved embryos	No. of embryos developed to (%):			No. of morulae plus blastocysts (%)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	133	45 (33.8)	63 (47.4)	25 (18.8)	88 (66.2)
1	131	37 (28.2)	70 (53.4)	24 (18.3)	94 (70.8)
5	129	48 (30.2)	62 (48.1)	19 (14.7)	81 (62.8)

Table 5. Effect of nitric oxide inhibitor on the development of porcine IVM/IVF embryos cultured in NCSU23 supplemented with L-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) at 44hrs for *in vitro* culture

L-NAME (mM)	No. of cleaved embryos	No. of embryos developed to (%)			No. of morulae plus blastocysts (%)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	69	24 (34.8) ^{ab}	37 (53.6) ^{ab}	8 (11.6) ^{ab}	45 (65.2) ^{ab}
10	68	18 (26.5) ^a	41 (60.3) ^{ab}	9 (13.2) ^b	50 (73.5) ^b
50	67	20 (29.9) ^a	42 (62.7) ^b	5 (7.5) ^a	47 (70.1) ^b
100	68	28 (41.2) ^b	36 (52.9) ^a	5 (7.4) ^a	40 (58.8) ^a

^{ab} Values with different superscripts are significantly different (P<0.05)

Table 6. Number of total cell of porcine IVM/IVF embryos in NCSU23 supplemented with L-NAME at 44hrs for *in vitro* culture

L-NAME (mM)	No. of blastocysts	Total cell no. of blastocysts (n)
0	5	29.8±5.76 ^{ab}
10	5	37.2±5.63 ^b
50	5	36.0±2.92 ^b
100	5	24.4±6.07 ^a

^{ab} Values with different superscripts are significantly different, P<0.05.

배반포기 수정란의 세포수는 처리구간에 커다란 차이는 인정되지 않았으나, 10과 50mM 첨가구가 여타구보다 높은 경향을 나타냈다.

IV. 고 찰

본 실험의 결과, NCSU23 배양액을 기본 배양액으로 하여 배양액내 hemoglobin의 농도별 첨가에 따른 상실배기 이상 발육된 체외발육율을 살펴보면 NCSU23 배양액에 hemoglobin을 체외배양 44시간과 96시간에 각각 0, 1 및 5 µg/ml 첨가한 처리구에서 각각 52.4%, 57.6% 및 57.4%와 66.2%, 70.8% 및 62.8%로서 1 µg/ml의 hemoglobin 첨가구가 hemoglobin 무 첨가구 보다 다소 높은 체외발육율을 나타냈다. Lim 등 (1999)은 소 체외수정

란의 체외배양에 있어서 체외배양액내에 1 µg/ml의 hemoglobin을 첨가했을 때, 체외수정란의 체외발육성적이 무처리구 보다 높은 결과를 보고해 본 실험의 결과와 일치하는 경향을 보였다. 체외 배양 시간에 따른 hemoglobin의 첨가 효과에 있어서, 체외수정 44시간 및 96시간 후 배양액내에 hemoglobin을 1 µg/ml 첨가하여 체외배양을 실시한 결과, 체외수정란의 상실배기이상 발육된 체외발육성적이 57.6% 및 70.8%로서 96시간에 hemoglobin 첨가배양 효과가 높았다. Lim 등 (1999)은 체외수정 후 18, 60 및 144시간 후에 hemoglobin을 첨가 배양했을 때 60시간 및 144시간에 hemoglobin의 첨가가 소 체외수정란의 체외발육에 효과가 있다고 보고해 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보였다.

NCSU23 배양액에 L-NAME를 각각 0, 10, 50 및 100mM을 첨가한 배양액내에서 체외배양된 돼지 체외수정란의 상실배이상 발육된 체외발육성적은 각각 65.2%, 73.5%, 70.1% 및 58.8%로 L-NAME를 10mM 및 50mM을 첨가한 처리구가 여타구 보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈으며, 배반포기의 발육을 또한 10mM첨가한 처리구 (13.2%)가 여타구 (0, 11.6% ; 50mM, 7.5% 및 100mM, 7.4%)보다 다소 높은 성적을 나타냈다. 이러한 결과는 Lim 등 (1999)이 보고한 소 체외수정란에 있어서 L-NAME 첨가배양이 체외수정란의 체외발육율에 영향을 미치지 않았다는 결과와는 다르게 무첨가구 (65.2%) 보다 L-NAME 첨가구 (10mM, 73.5% 및 50mM, 70.1%)가 높은 성적을

나타냈다. 그러나 100mM을 첨가한 처리구의 경우 무처리구보다 낮은 성적을 나타낸 것을 보면 고농도의 L-NAME 첨가는 오히려 체외수정란의 체외발육을 저해하는 요인으로 작용할 수 있다고 여겨진다.

체외배양액에 hemoglobin의 첨가 배양은 소와는 다르게 커다란 효과를 나타내지 않았지만, L-NAME의 첨가배양은 체외수정란의 체외발육을 향상시켰다.

V. 요약

본 연구는 돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후, 체외배양액내에 NO Scavenger인 hemoglobin과 억제제인 L-NAME의 첨가 배양이 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과를 검토하였다.

체외배양 44시간에 NCSU 배양액에 hemoglobin을 각각 0, 1 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 가 첨가된 처리구에서 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외 발육율은 각각 52.4%, 57.6% 및 57.4%로써 hemoglobin 첨가군이 대조군에 비해 다소 높은 발육성적을 나타냈으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다 ($P>0.05$).

체외배양 96시간에 NCSU23 배양액에 hemoglobin을 0, 1 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 처리구에서 상실배 이상 발육된 체외 발육성적은 각각 66.2%, 70.8% 및 62.8%로 1 $\mu\text{g/ml}$ hemoglobin을 첨가한 처리구가 다른 처리구보다 다소 높게 나타났지만 통계적으로 유의차는 인정되지 않았다 ($P>0.05$).

체외배양 44시간에 NCSU23 배양액에 L-NAME를 각각 0, 10, 50 및 100mM을 첨가한 처리구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 각각 65.2%, 73.5%, 70.1% 및 58.8%로 L-NAME를 10mM첨가한 처리구와 50mM 첨가한 구가 무 첨가구와 100mM 첨가구보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 얻었다 ($P<0.05$).

각 처리구에서 생산된 배반포기수정란의 세포수에는 커다란 차이가 인정되지 않았다.

VI. 인용문헌

1. Allen, R. L. and Wright, Jr. R. W. 1984. *In vitro* development of porcine embryos in co-culture with endometrial cell monolayers or culture supernatants, *J. Anim. Sci.*, 59:1657-1661.
2. Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D. and Sharpec, C. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 44:398-403.
3. Coskun, S., Sanbuissho, A., Lin, Y. C. and Rikihisa, Y. 1991. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Thriogenology*, 36:485-493.
4. Edwards, R. G. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-352.
5. Grupen, C. G., Nagashima, H. and Nottle, M. B. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 53:173-178.
6. Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:384-394.
7. Jarrell, V. L., Day, B. N. and Prather, R. S. 1991. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Bilo. Rprod.*, 44:62-68.
8. Legge, M. and Sellens, M. H. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum. Reprod.*, 6:867-871.
9. Li, J., Foote, R. H. and Simkin, M. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein free medium with catalase, taurine

- superoxide dismutase. *Biol. Reprod.*, 49:33-37.
10. Lim, J. M., Mei, Y., Chen. B., Gododke, R. A. and Hansel, W. 1999. Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-coculture system. *Theriogenology*, 51:941-949.
 11. Long, C. R., Dobrinsky, J. R. and Johnson, L. A. 1999. *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. *Theriogenology*, 51:1375-1390.
 12. Mattioli, M., Bacci. M. L., Galeati, G. and Seren, E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1209.
 13. Pabon, W. E., Findley, W. E. and Gibbons, W. E. 1989. The toxic effect of short exposure to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil. Steril.*, 51:896-900.
 14. Robl, J. M. and Davis, D. L. 1981. Effects of serum on swine morulae and blastocysts *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 52:1450-1456.
 15. Schoenbeck, R. A., Peters, M. S., Rickords. L. F., Stumpf, T. T. and Prather, R. S. 1992. Characterization of deoxyribonucleic acid synthesis and the transition from maternal to embryonic control in the 4-cell porcine embryo. *Biol. Reprod.*, 47:1118-1125.
 16. Thompson, J. G. E., Simpson, A. C., Pugh, P. A., Donnelly, P. E. and Tervit, H. R. 1990. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Repr. Fertil.*, 89:573-578.
- (접수일자 : 2001. 2. 12. / 채택일자 : 2001. 3. 9.)