

돼지 난포란 유래 체외수정란 생산에 대한 제요인의 영향
I. 체외성숙, 체외수정, 체외발달에 대한 체외성숙 배양액의 영향

연성흙[†] · 최선호 · 김종대 · 손동수 · 한만희 · 이규승¹
농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장

**Effects of Some Factors on *In Vitro* Production of Embryos
from Antral Follicle-Derived Porcine Oocytes**

**I. Effects of Maturation Media on *In Vitro* Maturation,
Fertilization and Development**

S. H. Yeon[†], S. H. Choi, C. D. Kim, D. S. Son, M. H. Han and K. S. Lee¹

Animal Genetic Resources Station, National Livestock Research Institute, R.D.A.

SUMMARY

This study was carried out to examine the effects of maturation media on *in vitro* maturation (IVM) of porcine immature oocytes, and on subsequent *in vitro* fertilization (IVF) and development (IVD). Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected from antral follicles of porcine ovaries collected from abattoir, and were matured *in vitro* in modified NCSU-37 (mNCSU-37), modified NCSU-23 (mNCSU-23), or TCM-199 supplemented with 10% porcine follicular fluid (pFF). Oocytes matured *in vitro*, were fertilized *in vitro* in modified Tris-buffered medium (mTBM) with the final motile sperm concentration of 1×10^5 sperm/mL, and subsequently putative embryos were developed *in vitro* in NCSU-23. The results are as follows.

1. In the result of IVM, the rate of germinal vesicle breakdown (GVBD) and of nuclear maturation were not significantly different among the media, though numeric value of them were slightly lower in TCM-199 than in mNCSU-37 or in mNCSU-23.
2. In the result of IVF, though the rate of sperm penetration was not significantly different among the maturation media, the percentage of oocytes with male pronucleus (MPN) of ones matured in mNCSU-37 (88.0%) was significantly higher than in TCM-199 (71.1%) ($p < 0.05$).
3. In the result of IVD, the percentage of cleaved oocytes of ones matured in mNCSU-37 (52.3%) or in mNCSU-23 (53.7%) was significantly higher than in TCM-199 (43.1%) ($p < 0.05$), but the rate of blastocysts at day 6 was not significantly different among the maturation media, though putative embryos from oocytes matured in mNCSU-37 or in mNCSU-23 were developed more than in TCM-199.

These results suggested that mNCSU-37 or mNCSU-23 was more appropriate than TCM-199 as IVM medium for porcine immature oocytes

(Key words : porcine oocyte, maturation media, IVM, IVF, IVD)

* 본 연구는 농촌진흥청 대형공동연구과제(2000-2002) 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

¹ 충남대학교 동물자원학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University)

[†] Correspondence : E-mail : yeonsu@rda.go.kr

서 론

돼지의 미성숙 난포란으로부터 동결 가능한 체외수정란을 효율적으로 생산하기 위해서는 체외성숙에 있어서 핵성숙이나 세포질성숙의 불충분, 체외수정에 있어서 높은 다정자 침입율, 체외발달에 있어서 지나치게 적은 배반포의 세포수 등 해결되어야 할 문제점이 아직 많이 있다. 또한 불완전한 체외성숙은 체외수정이나 체외발달을 저해하는 요인이 되고, 체외수정과 관련된 요인이 체외발달에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 각 배양단계별로 여러 가지 요인들이 체외수정란 생산에 미치는 영향을 명확히 구명해야 할 필요가 있다.

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙에 대해서 Edwards(1965)가 43~46시간 동안 배양하여 제2성숙분열중기(metaphase II; M-II)에 도달했음을 보고한 이래 Motlic과 Fulka(1974)는 체외성숙란의 체내수정능력을 확인했고, Iritani 등(1978)은 체외성숙란의 체외수정을 성공시켰으며, Mattioli 등(1989)은 체외성숙란의 체외수정후 추정수정란을 수란돈에 이식하여 처음으로 산자를 생산함으로써 체외성숙/체외수정란의 발달능력을 확인했다. 한편, Yoshida 등(1993)은 체외성숙/체외수정 유래의 2~4세포기 수정란, Day 등(1998)은 8세포기~상실기의 수정란, 그리고 Marchal 등(2001)과 Kikuchi 등(2002)은 배반포기의 체외수정란을 각각 이식하여 산자를 생산하는데 성공함으로써 체외성숙/체외수정/체외발달 유래 체외수정란도 출생까지의 발달능력을 갖고 있다는 것이 확인되었다.

그러나 돼지 미성숙 난포란의 체외배양은 다른 가축에 비해 난자 핵과 세포질의 성숙이 불완전하여 많은 다정자침입, 낮은 응성전핵형성을 등에 기인한 수정율 또는 난분할을 저하뿐만 아니라 수정후의 저조한 발달을 초래하는 것으로 알려져 있다. 따라서 돼지 체외수정란의 생산을 위해 가장 먼저 해결해야 할 과제는 난자의 핵 및 세포질 성숙을 개선시키는 것으로서, 많은 연구자들이 이를 위해 다양한 연구를 시도해 왔다.

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙배양에는 오랫동안 TCM-199나 Waymouth medium(Waymouth MB 752/1)과 같은 복합배양액 많이 사용되어 왔

으나 최근에는 돼지수정란 배양을 위해 개발된 NCSU-37 또는 NCSU-23(Petters와 Wells, 1993)에서 BSA를 뺀 mNCSU-37(Kikuchi 등, 1999; Long 등, 1999; Funahashi 등, 1997), mNCSU-23 (Bolling, 2001; Boquest 등, 1999; Abeydeera와 Day, 1997a,b) 등과 같은 단순배양액도 자주 사용되고 있다.

현재 사용되고 있는 체외성숙배양액에는, 그것이 단순배양액이든 복합배양액이든, 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외발달을 개선시키는 여러 가지 물질이 첨가되어 사용되고 있고 연구자에 따라 첨가하는 물질의 종류나 양도 조금씩 다르기 때문에 배양액의 영향을 직접 비교하기는 곤란하다.

본 연구는 보다 안정된 돼지 체외수정란 생산시스템의 확립에 활용하기 위하여, 돼지 미성숙 난포란을 같은 물질이 첨가된 몇 가지 배양액에서 체외성숙시킴으로써 이들 배양액이 체외성숙, 체외수정, 체외발달에 미치는 영향을 밝히고자 실시했다.

재료 및 방법

1. COCs 채취와 pFF 준비

도축장에서 체중 110 kg 전후의 미경산돈 난소를 도축 직후 회수하여 35~38℃의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 2회 세척한 다음, 같은 액으로 채운 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였고, 실험실에서 신선한 생리식염수로 다시 2~3회 난소를 세척한 다음 COCs를 채취했다. COCs는 직경이 3~6 mm의 포상난포로부터 19계이지 주사침이 장착된 10 mL 주사기로 난포액과 함께 흡인한 다음, 37℃의 가온 블록에 미리 준비해둔 15 mL 원심분리관(Corning, USA)으로 옮겼다. 이 원심분리관을 10분간 정치시켜 침전된 pellet을 회수하고 35×10 mm petri-dish(FALCON, USA)에서 mTL-Hepes-PVA(Long 등, 1999)로 희석하였다. 실제현미경(Olympus SZH-10, Japan)하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 난자의 세포질이 균일한 COCs만을 선별하여 실험에 공시했다.

돼지난포액(pFF)은 COCs 채취시와 같은 방법으로 회수하여 실험실로 운반한 돼지 난소의 3~6 mm 포상난포에서 채취하여 4℃의 냉수에 미리 준비해둔 15 mL 원심분리관에 옮겼다. 이어서 4℃, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 다음 상정액을 분리하여 2.9 μ m와 0.45 μ m의 이중필터(Sigma, USA)로 여과하여 -20℃ 냉동고에 보관해 두고 성숙배양액 제조시 용해하여 사용했다.

2. 미성숙 난포란의 성숙배양

체외성숙 배양액은 BSA를 넣지 않은 NCSU-37 및 NCSU-23(Petters와 Wells, 1993) 즉, mNCSU-37 및 mNCSU-23 또는 TCM-199에 10% pFF, 0.6 mM cysteine, 50 μ M β -mercaptoethanol, 그리고 1mM dbcAMP를 첨가하여 사용했고, 호르몬은 10IU/mL PMSG와 10IU/mL hCG를 첨가했다.

4-well dish(Nunc, Denmark)에 각 well당 500 μ L 체외성숙 배양액을 넣고 mineral oil로 덮은 다음 2시간 이상 전배양을 실시했다. TL-Hepes-PVA와 체외성숙 배양액으로 각각 3회 세정한 COCs를 각 well당 40~50개씩 미리 준비된 성숙배양액으로 옮겼다. 39℃, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기에서 호르몬과 dbcAMP를 첨가하여 20~22시간 배양한 다음, 호르몬과 dbcAMP를 첨가하지 않고 22~24시간 배양하여 총 44~46시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도했다.

3. 수정배양액 및 난자의 준비

체외수정용 배양액은 2.0 mM caffeine sodium benzoate와 0.1% BSA(Sigma, Fraction V)를 첨가한 mTBM(Abeydeera와 Day, 1997a)을 사용했으며, 체외수정에 사용하기 전 48시간 이상 전배양을 실시하여 안정화시킨 다음 이용했다.

체외성숙이 완료된 COCs를 0.1% hyaluronidase가 포함되고 pFF가 들어가지 않은 성숙배양액에서 난구세포를 제거한 다음, 난자를 체외수정용 배양액으로 3회 세정하여 35×10 mm petri-dish에 mineral oil로 덮은 90 μ L 수정용 배양소적에 30~40개씩 넣고 매정할 때까지 배양기 내에서 배양했다.

4. 정자의 준비와 체외수정

정액은 수압법으로 채취하여 Modena 희석액(SGI, USA)으로 생존정자수로 3×10^7 sperm/ml의 농도가 되도록 액상정액을 만들어 3일 이내에 사용했고, 정자 세정액은 0.1% BSA와 75 μ g/mL penicillin G 및 50 μ g/mL streptomycin sulfate를 첨가한 D-PBS를 사용했다.

체외수정용 정액을 준비하기 위하여 액상정액 1 mL를 취한 다음 세정액 2 mL과 혼합하여 15 mL 원심분리관에 넣고 700×g에서 5분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거했다. 그 다음 침전된 정자에 세정액 3 mL을 더하여 같은 방법으로 원심분리하고 상층액을 제거하는 세정과정을 2회 더 실시했다. 최종적으로 원심분리관 하단에 남은 정자 침전물에 체외수정용 배양액을 3 mL를 넣어 39℃, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 15분간 정지했다. 부유된 정자들을 회수하여 Makler counting chamber(Sefi-Medical Instruments, Israel)로 운동정자수를 계산한 다음, 운동정자의 최종농도가 1×10^6 sperm/mL가 되도록 체외수정용 배양액으로 다시 희석했다. 이 정액을 난자가 들어있는 90 μ L 소적에 10 μ L씩 주입한 다음, 39℃, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 5~6시간 동안 난자와 함께 배양하여 체외수정시켰다.

5. 체외수정란의 발달배양

체외성숙/체외수정란의 발달배양에는 0.4% BSA(Sigma, Fraction V)가 함유된 NCSU-23(Petters and Wells, 1993)을 사용했다. 체외수정이 완료된 추정수정란은 체외발달배양액으로 3회 세척한 다음 4-well dish(Nunc, Denmark)의 500 μ L 체외발달배양액에 well당 30~40개씩 옮겨 넣은 다음, 39℃, 5% CO₂ 및 포화습도의 배양기 내에서 배양하여 체외발달시켰다. 체외배양 개시후 약 44시간에 난할을, 약 144시간에 배반포발달을 조사했다.

6. 염색과 판정

성숙배양이 끝난 난자의 일부(반복당 6개 또는 9개)를 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로 염색하고 위상차현미경(Olympus AX70, 400~800×)하에서 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 핵성숙 단계를 판정했다.

또 체외수정이 종료된 추정수정란(putative embryos)을 반복당 9개씩 취하여 잔류 난구세포와 투명대에 부착된 정자를 제거하고 체외발달배양액에 옮겨 10시간 동안 추가로 배양한 다음, Byun 등 (1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(Rapid Staining Method)으로 염색하고 위상차현미경(Olympus AX70, 400×)하에서 정자의 침입, 다정자수정, 응성전핵형성 등 수정 여부를 확인했다(Fig. 1).

7. 실험 구성

체외성숙에 사용되는 배양액이 돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여, 단순배양액으로 sorbitol이 들어 있는 NCSU-37과 taurine 및 hypotaurine이 들어 있는 NCSU-23에서 각각 BSA를 제외시킨 mNCSU-37과 mNCSU-23, 그리고 복합배양액으로 TCM-199를 사용하여 체외성숙을 유도한 다음, 정해진 절차와 방법으로 체외수정과 체외발달배양을 실시

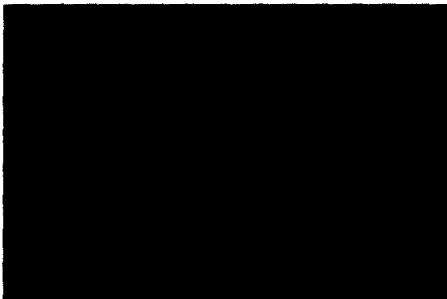


Fig. 1. A rapid stained porcine zygote after 12 hrs postinsemination *in vitro* (400×).

하여 각 단계별로 성숙배양액의 영향을 조사하였다.

8. 통계처리

본 연구에서는 각 실험별로 처리당 4회 이상 반복 시험을 수행했으며, 조사된 성적은 분산분석(ANOVA)을 실시한 다음 유의성이 인정된 것에 대해서는 LSD에 의하여 처리간 차이를 구분했다.

결과 및 고찰

mNCSU-37과 mNCSU-23 및 TCM-199를 사용하여 체외성숙을 유도한 결과는 Table 1과 같다. TCM-199에서 성숙된 난자의 난핵포 붕괴율이 88.8%로 다른 두 가지 배양액에서 성숙된 것(92.4~93.0%)보다 약간 낮았으나 배양액간 유의적인 차이는 없었고, TCM-199에서 성숙된 난자의 핵성숙율도 75.6%로 다른 배양액에서의 81.1~82.9%보다 다소 낮았지만 유의적인 것은 아니었다.

이렇게 성숙시킨 난자를 mTBM에서 체외수정시킨 결과는 Table 2와 같다. mNCSU-37, mNCSU-23 및 TCM-199에서 성숙시킨 난자의 정자침투율은 각각 78.5%, 76.4% 및 65.3%로 TCM-199에서 성숙시킨 것에서 다소 낮았으나 유의적인 차이는 아니었다. 그러나 응성전핵 형성율은 mNCSU-37에서 성숙시킨 난자(88.0%)가 mNCSU-23에서 성숙시킨 것(81.8%)과는 차이가 없었지만 TCM-199에서 성숙시킨 것(71.1%)보다는 유의적으로 높았다($p < 0.05$).

Table 1. Effects of *in vitro* maturation media on the nucleic maturation of immature oocytes derived porcine antral follicles

IVM medium	Total no. of oocytes examined	No. of oocytes at the stage of ¹			Percentage of GVBD ¹ (Mean±SE)	Maturation rate (%) (Mean±SE)
		GV	ProM-I ~ T-I	M-II		
mNCSU-37	40	3	4	33	92.4±1.8	82.9±2.9
mNCSU-23	42	3	5	34	93.0±3.1	81.1±2.5
TCM-199	45	5	6	34	88.8±1.7	75.6±1.5

¹ GV : germinal vesicle stage, ProM-I : first prometaphase, T-I : first telophase, M-II : second metaphase, GVBD : germinal vesicle breakdown.

이어서 이들 난자를 NCSU-23에서 체외발달시킨 결과는 Table 3과 같다. 난분할율은 mNCSU-37이나 mNCSU-23에서 성숙시킨 것(각각 52.3, 53.7%)이 TCM-199에서 성숙시킨 것(43.1%)보다 유의적으로 높았다($p<0.05$). 한편, 배반포 발달율은 분할란 및 추정수정란 대비 모두 mNCSU-23과 mNCSU-37이 TCM-199보다 다소 높은 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 없었다.

이와 같은 결과는 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 배양액으로 NCSU-23, TCM-199 및 modified Whitten's medium을 비교했을 때에 핵성숙율, 정자 침투율, 응성전핵 형성율, 난분할율에서는 유의적인 차이가 없었지만 배반포발달율은 각각 30, 19 및 6%로 NCSU-23이 가장 좋았다는 Wang 등(1997)의 보고와 부분적인 차이는 있지만 대체로 일치하는 경향이였다.

Coy 등(1999)은 Waymouth medium과 TCM-199를 비교한 결과 첨가물과 배양시스템이 서로 다름에도 불구하고 핵성숙율(각각 83.3, 86.5%)과 GSH

함량(5.2, 3.5 pM/oocyte)에 차이가 없었다고 보고했다. 그러나 Park 등(1997)은 Waymouth medium, TCM-199 및 mTLP-PVA에 10% pFF를 첨가하여 비교한 결과 배양액간에 핵성숙율 및 수정율에는 차이가 없었지만, 응성전핵형성율은 Waymouth medium이 다른 두 배양액보다 높았다고 하였고, 한(2001)은 NCSU-23과 TCM-199에 10% pFF를 첨가하여 비교했을 때에 NCSU-23에서 배반포발달율이 유의적으로 높았다고 보고했다. TCM-199와 Waymouth medium에 포함되어 있는 아미노산과 Waymouth medium에 포함되어 있는 cystein을 첨가해도 pFF를 첨가하지 않은 protein-free NCSU-23은 체외성숙율과 정자 침투율이 낮았다는 Abeydeera 등(1998a)의 보고로 미루어 볼 때, 이러한 결과는 성숙배양액의 어떤 성분이나 첨가물과의 상호작용에 의해 특정 물질의 첨가가 난자의 발달에 이렇게 작용하거나 작용하지 못하기 때문인 것 같다. 본 실험에서 Wang 등(1997)과 다르게 나타난 난분할율의 유의적인 차이는 β -mercaptoethanol을

Table 2. Effects of *in vitro* maturation media on *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes derived porcine antral follicles

IVM medium	Total no. of oocytes examined	% (mean \pm SE) of oocytes ¹			Rate of polyspermy (Mean \pm SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean \pm SE)
		Penetrated	with MPN	with PPN		
mNCSU-37	51	78.5 \pm 4.4	88.0 \pm 4.4 ^a	32.5 \pm 6.0	34.1 \pm 3.2	1.7 \pm 0.2
mNCSU-23	52	76.4 \pm 5.7	81.8 \pm 4.6 ^{ab}	31.1 \pm 7.8	40.1 \pm 4.7	1.9 \pm 0.2
TCM-199	52	65.3 \pm 4.4	71.1 \pm 2.3 ^b	24.2 \pm 9.2	43.5 \pm 5.2	1.8 \pm 0.3

¹ MPN : Male pronucleus, PPN : Polypronucleus.

^{ab} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ($p<0.05$).

Table 3. Effects of *in vitro* maturation media on *in vitro* development of *in vitro* fertilized embryos derived porcine antral follicles

IVM medium	No. of oocytes inseminated	% of oocytes cleaved (Mean \pm SE)	% of blastocysts at day 6 (mean \pm SE)	
			/ cleaved	/ inseminated
mNCSU-37	458	52.3 \pm 2.6 ^a	18.8 \pm 1.7	9.7 \pm 1.1
mNCSU-23	441	53.7 \pm 3.6 ^a	19.6 \pm 1.7	10.6 \pm 1.3
TCM-199	499	43.1 \pm 2.6 ^b	15.4 \pm 1.5	6.9 \pm 1.0

^{ab} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ($p<0.05$).

cysteine과 함께 첨가함으로써 응성전핵 형성을 이 다소 개선된 결과로 보인다. Abeydeera 등(1998b)은 mNCSU-23에 cysteine과 함께 β -mercaptoethanol을 첨가하면 난자내 GSH이 증가했다고 보고했으며, Bing 등(2001)과 Yamauchi와 Nagai (1999)는 TCM-199에 cysteamine을 첨가하면 난자내 GSH이 증가하여 응성전핵형성율이 개선된다고 보고한 바 있다.

한편 NCSU-37의 결과는, 같은 배양액에서 핵성숙율 87.6%, monospermy 31.8%, 다정자수정 발생율 30.8%, 난분할율 39~45%, 배반포발달율 19.8~21.8%이었다는 Long 등(1999)의 보고와 배반포 발달율을 제외한 대부분이 일치하는 것이었는데 배반포 발달율에서의 차이는 본 실험에서 성숙배양액에 EGF를 첨가하지 않았기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 Kikuchi 등(1999)은 같은 배양액에서 핵성숙율 68%, 정자침투율 30% monospermic 18%, 응성전핵 형성을 28%, 난분할율 31%, 배반포 발달율 13.7%로 본 실험보다 저조한 결과를 얻은 반면에 Funahashi 등(1997)은 핵성숙율 80.6~93.1%, 정자 침투율 97%, 응성전핵 형성을 87.7%, 난분할율 약 70%, 배반포 21.5%로 본 실험과 비슷하거나 다소 높은 결과를 얻은 것으로 보고했다. 이러한 차이는 본 실험에서는 액상정액을 이용하여 mTBM에서 체외수정시킨 반면, Kikuchi 등(1999)은 동결정액을 이용하여 BO액에서 수정시켰고, Funahashi 등(1997)은 본 실험에서보다 높은 정자농도(1×10^6 대 5×10^5)로 수정시켰기 때문인 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 보다 안정된 돼지 체외수정란 생산시스템 확립을 목적으로 체외성숙배양액 mNCSU-37, mNCSU-23 및 TCM-199가 각각 미성숙 난포란의 체외성숙, 체외수정, 체외발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여 수행하였다. 도축돼지의 난소에서 채취한 COCs를 10% pFF가 포함된 각각의 성숙배양액에서 체외성숙시키고, mTBM에서 운동정자의 최종동도가 $1 \times 10^5/ml$ 의 농도로 체외수정시킨 다음, NCSU-23에서 체외발달을 유도한 결과

는 다음과 같다.

1. TCM-199에서 성숙시킨 난자가 mNCSU-37이나 mNCSU-23에서 성숙시킨 것보다 난핵포 봉괴율과 핵 성숙율에서 다소 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었다.
2. 정자 침투율은 성숙배양액간 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 응성전핵 형성은 mNCSU-37에서 성숙시킨 난자가 88.0%로 TCM-199에서 성숙시킨 것의 71.1%보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$).
3. 난분할율은 mNCSU-37(52.3%)이나 mNCSU-23(53.7%)에서 성숙시킨 난자가 TCM-199(43.1%)에서 성숙시킨 난자보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 배반포발달율도 mNCSU-37이나 mNCSU-23에서 성숙시킨 것이 TCM-199에서 성숙시킨 것보다 다소 높았지만 유의적인 차이는 아니었다.

이상의 결과로 보아 돼지 미성숙 난포란 유래의 체외수정란 생산을 위한 체외성숙배양액으로 TCM-199보다 mNCSU-37이나 mNCSU-23이 적합한 것으로 사료된다.

참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997a. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 57:729-734.
- Abeydeera LR and Day BN. 1997b. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48:537-544.
- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS and Day BN. 1998a. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 58:1316-1320.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS and Day BN. 1998b. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of

- pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 50:747-756.
- Bing YX, Nagai T and Rodriguez-Martinez H. 2001. Effects of cysteamine, FSH and estradiol-17 on *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*, 55:867-876.
- Bolling LC. 2001. The effect of growth hormone on pig embryo development *in vitro* and an evaluation of sperm-mediated gene transfer in the pig. Thesis presented to Graduate school of Virginia Polytechnic Institute and State Univ. for degree of MS.
- Boquest AC, Abeydeera LR, Wang WH and Day BN. 1999. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 51:1311-1319.
- Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Development of a rapid staining method of the oocytes from domestic animal. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
- Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos I and Gadea J. 1999. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology*, 51:799-812.
- Day BN, Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Cantley TC and Rieke A. 1998. Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa stored by high speed flow cytometry. *Theriogenology*, 49:360 (abstr.).
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:347-351.
- Funahashi H, Cantley TC and Day BN. 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.*, 57:49-53.
- Hunter RHF and Polge C. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.*, 12:525-531.
- Iritani A, Niwa K and H Imai. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 54:379-383.
- Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T and Nagai T. 2002. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol. Reprod.*, 66:1033-1041.
- Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M and Kaneko H. 1999. Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 60:336-340.
- Long CR, Dobrinsky JR and Johnson LA. 1999. *In vitro* production of pig embryos: Comparisons of culture media and boars. *Theriogenology*, 51:1375-1390.
- Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M and Mermillod P. 2001. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*, 56:17-29.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 46:1201-1207.
- Motlik J and Fulka J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 36:235-237.
- Park CS, Lee KS, Park BK, Zhang XK, Lee YH and Xu Z. 1997. Effect of maturation media and liquid boar semen on maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Kor. J. Anim. Reprod.*, 21:19-23.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig

- embryos. J. Reprod. Fertil., 48: 61-73.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC and Day BN. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. J. Reprod. Fertil., 111:101-108.
- Yamauchi, N and Nagai T. 1999. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. Biol Reprod., 61:828-833.
- Yoshida, M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T and Nagai T. 1993. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 39:1303- 1311.
- 한만희. 2001. 항산화제 및 산소조건이 돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외발달배양에 미치는 영향. 충남대학교 박사학위논문.
-
- (접수일: 2004. 3. 2/ 채택일: 2004. 6. 25)