

## 배양액 및 산소농도가 돼지 체외수정란의 발달에 미치는 영향

최창용 · 조상래 · 최선호 · 김현중 · 한만희 · 강다원<sup>1</sup> · 신용원<sup>1</sup> · 한재희<sup>1</sup> · 손동수<sup>†</sup>  
농촌진흥청 축산과학원 가축유전자원시험장

### Effects of Culture Media and Oxygen Concentration on *In Vitro* Development of Porcine IVM/IVF Embryos

C. Y. Choe, S. R. Cho, S. H. Choi, H. J. Kim, M. H. Han, D. W. Kang,  
Y. W. Shin<sup>1</sup>, J. H. Han<sup>1</sup> and D. S. Son<sup>†</sup>

Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, R.D.A.

#### SUMMARY

During *in vitro* culture of mammalian oocytes and embryos, the cells are exposed to the risks that cause cell injury or death. Numerous studies have been reported that the cell injury may be induced by the action of free radicals generated by auto-oxidation. This study was undertaken to investigate the optimal culture condition system for *in vitro* culture of porcine embryos. We first evaluated the effect of culture media on the porcine embryo development. NCSU-23 and PZM-5, culture medium tested, were failed to produce significant difference on the rate of blastocyst formation. In NCSU-23, the developmental rate was slightly higher than that in PZM-5. During *in vitro* maturation (IVM), fertilization (IVF), and culture (IVC) under 5 or 20 % oxygen (O<sub>2</sub>), the rates of cleavage and development were insignificantly different from each other under our culture condition (20% O<sub>2</sub>, in NCSU-23), the mean cell number per blastocyst was 40±10. These results showed that medium and O<sub>2</sub> concentration had no significant effect on the development of porcine embryos.

(Key words : culture media, oxygen concentration, porcine, blastocyst)

#### 서 론

돼지 체외수정란 생산기술 및 이를 이용한 수정란이식은 산업적인 가치가 매우 높다. 구체적인 적용분야로는 형질전환 개체생산을 통한 새로운 품종개발, 질병 저항성 유전자를 보유한 형질전환 돼지 생산, 질환모델 동물개발, 이종장기이식 동물생산 등이 있으며, 멸실위험이 있는 유전자원의 보존을 위해서도 돼지 체외수정란 생산 및 이식은 꾸준하게 연구되어야 하는 생명과학 기술 분야이다. 이러한 연구를 보다 효율적으로 수행하기 위해서는 양질의 수정란을 대량으로 확보하는 것이 선행되어야 한다.

도축된 난소로부터 얻어진 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙은 Edwards(1965)에 의하여 체외에서 43~46시간 체외 배양함으로써 난자가 정자와 수정할 수 있는 성숙된 제2감수분열 중기(metaphase II: M II)에 도달할 수 있는 것이 처음으로 보고되었다. Iritani 등(1978)은 체외수정을 처음으로 성공하였고, Cheng 등(1986)에 의하여 체외성숙 및 수정에 대한 실험

법이 발전되었다. 그 후 Mattioli 등(1989)이 최초로 산자생식을 보고하였다. 그러나 도축된 돼지 난소로부터 난포란을 회수하여 체외에서 성숙, 수정시킨 체외수정란의 배양은 체외성숙 과정이 다른 가축에 비하여 길고 체외수정 시 다정자침입이 많으며, 체외배양 과정 중 4세포기에서 체외발육 억제현상(*in vitro* cell block)이 나타나므로(Jarrell 등, 1991; Schoenbeck 등, 1992) 양질의 돼지 수정란 확보가 어렵다.

많은 연구자들은 양질의 돼지 체외수정란 확보를 위하여 불완전한 체외배양 조건을 개선하고자 하였다. Cosby 등(1988)과 Joenje(1989)는 돼지 체외수정란 생산이 어려운 이유를 체외배양 시 수정란이 높은 농도의 산소에 노출되기 때문이라고 설명하였는데, 수정란의 체외배양은 난관 내보다 높은 산소농도에 노출되기 때문에 과량의 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 발생되고, 이들 유리산소기(oxygen free radical)들은 산화 스트레스를 초래하여 미토콘드리아의 호흡 억제 작용, 세포막의 유동성 감소, 각종 효소의 불활성화 및 DNA와 RNA의 손상을 초래하는 등 난포란의 성숙 및 체외발

<sup>1</sup> 경상대학교 의과대학 생리학교실(Department of Physiology, College of Medicine and Institute of Health Science, Gyeongsang National University)

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : sonds@rda.go.kr

달을 저해하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 체외배양 조건에서 발생하는 유리산소기를 제거하기 위해 낮은 산소농도 적용(Yoneda 등, 2004; 천 등, 2004; Manabu 등, 2006) 및 항산화제 등을 첨가 배양하는 방법들을 연구하고 있다. 그러나 돼지 난자의 체외성숙과 배발달에 있어서 적절한 체외배양 조건은 연구자들에 따라 그 결과가 동일하지 않다. 따라서 본 연구는 돼지 미성숙 난포란의 체외발달에 적합한 배양조건을 구명하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채취

체외수정란 생산을 위해 사용된 돼지 난소는 도축장에서부터 회수되었다. 도축 즉시 난소를 적출하여 100 units/ml의 penicillin G와 100 µg/ml의 streptomycin이 함유된 30°C 내외의 생리식염수에 담아 1-2시간 내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 불필요한 조직을 잘라낸 후 항생제가 첨가된 생리식염수로 3-4회 세척한 후 18 gauge 주사 바늘이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡입법(aspiration)으로 난포란을 채취하였다. 채취한 난포란은 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)에 0.1% polyvinyl alcohol(PVA)이 첨가된 배양액으로 2회 이상 세척 후 실험현미경하에서 회수하였다. 회수된 난포란은 0.1% PVA가 함유된 D-PBS로 3-4회 세척한 후 등급을 분류하였다. 등급의 분류는 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등(1991)의 난포란 등급분류 방법을 따랐다. 난구세포가 4층 이상이고 세포질이 균일한 것은 Grade I, 난구세포가 2-3층인 것은 Grade II, 난구세포가 한 층이거나 나화되었으며, 세포질이 균일한 것은 Grade III, 전체가 나화되었고, 퇴화된 것은 Grade IV로 분류하였으며, 이들 중 Grade I과 Grade II의 난포란만을 본 실험에 사용하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 porcine zygote medium-5(PZM-5) 또는 North Carolina State University(NCSU)-23 기본 배양액에 10% 돼지 난포액(porcine follicular fluid, PFF), 0.5 µg/ml porcine FSH, 0.5 µg/ml equine LH, 1.0 µg/ml 17β-estradiol(E<sub>2</sub>) 및 10 ng/ml epidermal growth factor(EGF)를 첨가하여 체외배양하였다. 난포란의 체외성숙용 배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)의 각 well당 500 µl씩 넣어 39°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 전배양하였다. 회수한 난자는 TALF-HEPES 배양액으로 3회 세정하고, 체외성숙용 배양액으로 1회 세정하였다. 세정된 미성숙 난포란을 4-well dish 각 well당 50개씩 넣어 39.0°C, 20%의 산소가 공급되는 배양기(95% air, 5% CO<sub>2</sub>) 또는 39.0°C, 5% 산소가 공급되는 배양기(90% N<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양한

후, 호르몬만을 제외한 배양액으로 옮겨 22~26시간 더 배양하였다.

돼지 난포액은 5 mm 이상 크기의 가시난포에서 난포액을 채취하여 4°C에서 3,000 rpm으로 30분간 원심분리시킨 후 pellet을 제외한 상층액만 회수하여 0.8 µm와 0.45 µm 필터를 이용하여 여과한 후 -20°C에 냉동보관하면서 필요 시에 사용하였다.

### 3. 체외성숙 난자의 핵염색

체외성숙 난자의 핵염색 정도는 변 등(1991)이 개발한 급속염색법(Rapid staining)을 이용하여 Germinal Vesicle(GV), Metaphase I(M I), Metaphase II(M II)의 핵염색 상태를 형광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)하에서 관찰하여 판정하였다.

### 4. 정자의 처리 및 체외수정

체외수정용 정자는 도축된 수퇘지의 정소상체미부를 절제하여 4°C 전후의 온도를 유지한 보온병에 담아 실험실로 운반한 후 정소상체 미부의 정액으로부터 분리하였다. 채취된 정액은 0.1% BSA가 함유된 D-PBS 용액을 이용하여 1,500 rpm에서 5분간 2-3회 원심분리하여 정장물질 및 오염물을 제거하였다. 세정 후 하단에 남은 정자 침전물에 modified Tris-buffered medium(mTBM) 배양액을 넣어 39.0°C의 5% CO<sub>2</sub> 또는 5% O<sub>2</sub> 배양기에서 20분간 정치하여 수정능 획득을 유도하였다.

체외수정은 2.5 mM caffeine과 0.1% BSA가 첨가된 mTBM에서 이루어졌다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지 난포란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 D-PBS 용액에 넣어 난구세포를 제거하고 mTBM 용액으로 세정하였다. 세정 후, 30개의 성숙난자는 수정용 mTBM 100 µl 소적에서 정자 주입 시까지 배양되었다.

수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도를 1.5 × 10<sup>5</sup> sperm/ml로 조정하여 수정용 소적에 넣어 6시간 동안 39.0°C의 5% CO<sub>2</sub> 또는 5% O<sub>2</sub> 배양기에서 수정을 유도하였다.

### 5. 체외수정란의 체외배양

돼지 체외수정란의 배양은 체외수정시킨 후 3일 동안 0.4% BSA가 함유된 PZM-5 또는 NCSU-23에서 이루어졌다. 체외수정란은 배양액으로 세정한 후 각 well당 500 µl의 배양액이 들어있는 4-well dish에서 배양하였다(50개 수정란/500 µl 배양액). 체외배양 3일 후 수정란을 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 NCSU-23 배양액으로 옮겨 배양하였다. 체외배발달의 확인은 체외수정 후 2일째에 난할률을, 7일째에 배반포 발달률을 조사하였다.

### 6. 배반포의 염색

체외배양 7일째 생산된 배반포는 propidium iodide(PI)로

염색을 하여 총세포수를 조사하였다. 염색방법으로는 PI 염색을 실시하기 전 배반포를 4% paraformaldehyde에 30분간 정지시켜 고정시킨 후, 고정된 배반포를 유리 슬라이드에 올려놓고 PBS로 배반포를 세정한 후 PI와 RNase를 함께 처리하여 30분간 배양하였다. PBS로 수정란을 세정한 후 커버를 덮어 배반포가 움직이지 않도록 눌러서 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 총세포수를 계산하였다.

7. 시약 및 배양액

본 실험에 사용된 시약은 특별한 언급이 없는 한 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

8. 통계분석

실험결과와 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 처리구 간의 유의성을 검정하였고( $p < 0.05$ ), 결과들은 평균±표준편차로 표시하였다.

결 과

1. 체외성숙 시간에 따른 난포란의 체외성숙률

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시간을 결정하기 위하여 38시간부터 48시간까지 성숙 시간을 달리하여 미성숙 난포란을 체외배양하였다(Table 1). 돼지 미성숙 난포란을 호르몬이 첨가된 NCSU-23 배양액에서 22시간 배양시킨 후 호르몬이 없는 NCSU-23 배양액으로 옮겨 16시간에서 26시간까지 배양하였다.

돼지 미성숙 난포란이 정자를 만나 수정을 할 수 있는 시점인 제2감수분열중기(M II)까지 성숙된 비율은 체외성숙 38, 40, 42시간째에 각각 61.1%, 42.9% 및 69.6%를 나타내어 그 비율이 70% 미만으로 낮은 반면, 체외성숙 44, 46, 48시간째

Table 1. Nuclear status of porcine oocytes according to the *in vitro* maturation time

Maturation time (h)	No. of oocytes	No. of (%) oocytes at the stage of		
		GV(%)	MI(%)	M II(%)
38	18	1 (5.6)	6 (33.3)	11 ( 61.1)
40	14	0 (0.0)	8 (57.1)	6 ( 42.9)
42	23	0 (0.0)	7 (30.4)	16 ( 69.6)
44	19	0 (0.0)	5 (26.3)	14 ( 73.7)
46	17	0 (0.0)	1 ( 5.9)	16 ( 94.1)
48	21	0 (0.0)	0 ( 0.0)	21 (100.0)

GV : Germinal vesicle, MI : Metaphase I, MII : Metaphase II

에 각각 73.7%, 94.1% 및 100%의 체외성숙률을 나타내어 최소한 44시간 이상의 체외성숙이 필요한 것으로 조사되었다. 46시간 또는 48시간의 성숙 시간은 높은 비율의 M II 난자를 얻을 수는 있지만 난자의 노화를 초래할 수 있기 때문에 본 연구에서는 체외성숙 시간을 44시간으로 고정하였다. Fig. 1은 체외성숙 44시간째의 난자 핵을 급속염색법을 이용하여 염색한 것이다.

2. 체외배양액 및 산소분압에 따른 체외발달률

돼지 미성숙 난포란 및 체외수정란을 NCSU-23과 PZM-5를 이용하여 체외성숙 및 체외배양한 결과는 Fig. 2와 같다. 체외배양 7일째 배반포로의 발달률이 NCSU-23에서 18.8%, PZM-5에서 배양하였을 때 16.3%를 나타내어 유의적인 차이

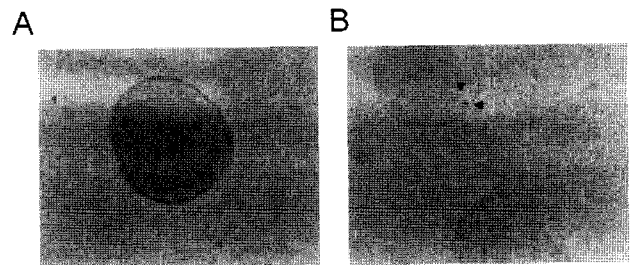


Fig. 1. Photographs of porcine oocytes. Evaluation of nuclear status (x200) (A) Metaphase I stage, (B) Metaphase II stage.

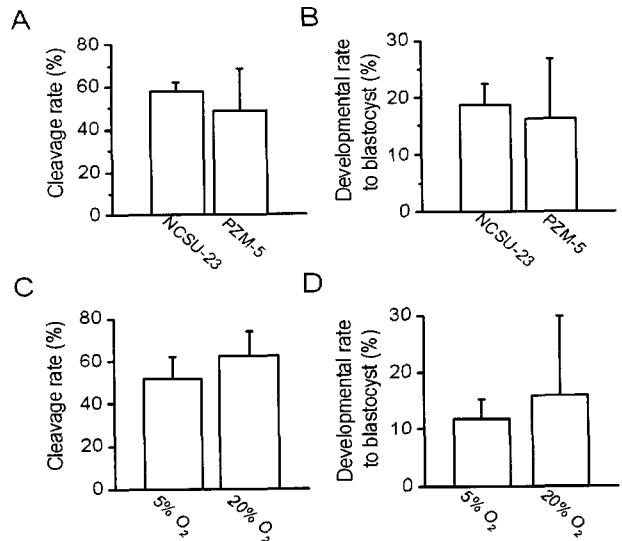


Fig. 2. Development of porcine embryos in different media and oxygen concentrations. (A and B) effect of different media on cleavage rate and blastocyst formation. (C and D) effect of different oxygen concentration on the rates of cleavage and development. Each bar represents the mean±SD of 10 determinations.

를 보이지 않았다( $p>0.05$ ). 난할률 역시 유의한 차이를 보이지 않았다.

돼지 난포란을 5%와 20% 산소분압에서 체외성숙 및 체외 수정시킨 후 체외 발달시켜 난할률과 배반포 발달률을 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 5% 산소 분압에서 배양된 수정란의 난할률과 배반포 발달률은 각각 51.7%와 11.9%를 나타낸 반면 20%의 산소 분압에서는 난할률과 배반포 발달률이 각각 62.5%와 15.8%를 나타내어 두 군간의 유의한 차이는 보이지 않았다( $p>0.05$ ).

체외배양 7일째 발달된 배반포를 PI 염색법을 이용하여 배반포의 총세포수를 조사하여 40개 내·외의 총 세포수를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

## 고 찰

본 연구는 양질의 돼지 체외수정란 생산을 위한 체외배양 체계를 개선하기 위한 일환으로 배양액 및 산소농도의 효과를 조사하였다. 돼지 체외수정란 배양시 배양액과 산소농도는 배발달에 있어서 유의한 차이를 보이지 않았다.

돼지 미성숙 난포란은 43~46시간 동안 체외배양을 해야만 제2감수분열중기까지 도달한다는 것이 보고된(Edwards 등, 1965) 이래 Suzuki 등(2000)과 Wongsrikeao 등(2005)이 그 사실을 재확인하였다. 그들 역시 제2감수분열중기의 성숙 난자를 유도하기 위해서는 각각 44시간과 42시간이 필요하다고 보고하였다. 본 연구 결과 역시 앞선 보고와 동일하게 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙을 위해서는 최소한 42~46시간의 체외성숙 시간이 필요하였다. 이후 본 연구 수행은 44시간의 체외성숙 시간을 고정하였다.

NCSU-23과 PZM 배양액의 차이점은 에너지원으로 첨가한 glucose, pyruvate, lactate와 아미노산의 첨가 유무이다. PZM

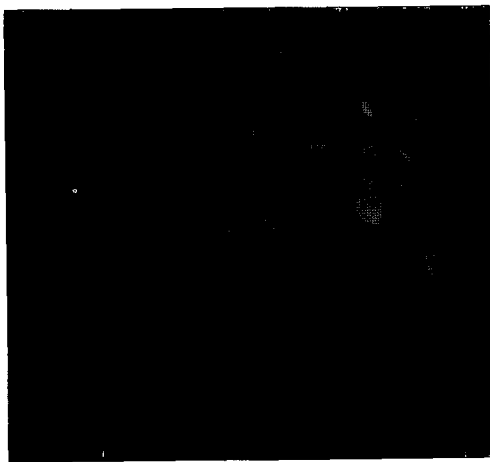


Fig. 3. Total cell number of blastocyst at day 7.

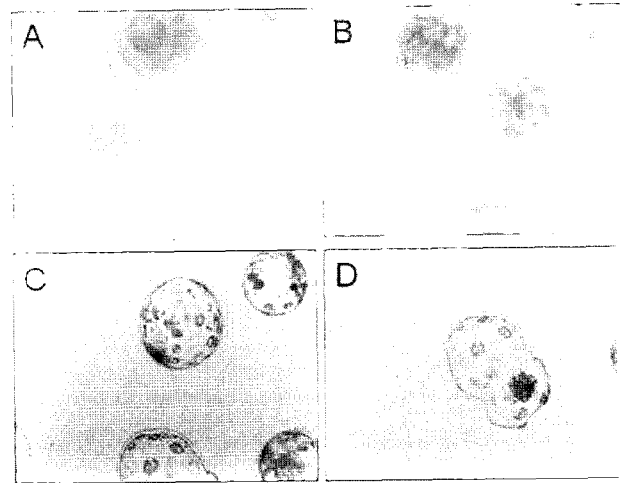


Fig. 4. Photographs of *in vitro* cultured oocytes and embryos derived from porcine (A) immature oocytes (B) 16-cell stage embryos (C) blastocyst stage embryos (D) Hatching embryo

에 첨가된 pyruvate와 lactate는 세포 내 미토콘드리아에서 호기적 산화과정을 통하여 바로 ATP를 생산할 수 있는 에너지 원으로써 각종 포유동물의 초기배 발육에 사용되어왔다. NCSU-23은 에너지원으로 glucose를 사용하는데 이 배양액은 초기비보다 후기배 발달을 촉진하는 것으로 보고되어 있다(Lane과 Gardner, 2000; Gandhi 등, 2001). Yoshioka 등(2002)은 돼지 체외수정란에서, 한 등(2004)은 돼지 체외수정란에서 PZM 배양액이 NCSU-23 배양액보다 더 높은 발달률을 보였다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 두 체외배양액 사이에 유의한 발달률 차이를 볼 수 없었다( $p>0.05$ ).

Johnson과 Nasr-Esfahani(1993)는 불완전한 체외배양 조건 중의 하나로 산소분압을 언급하였는데, 수정란의 체외배양 시에는 난관내의 산소분압(40~60 mmHg, 1~10%)보다 높은 산소분압(150 mmHg, 20%)에 노출되기 때문에 과량의 활성산소에 의해 수정란들은 영향을 받을 수 있다. 일반적으로 체외배양 시 산소농도는 대기중의 산소농도인 20%(151 mmHg)가 된다. 이는 난관내의 생리적 산소농도보다 높기 때문에 산소들은 단순확산에 의해 세포막을 통과하여 세포질내의 산소농도를 점차 증가시킨다. 그 결과로 수정란이 높은 산소농도의 환경에 노출되게 된다(Mastroianni와 Jones, 1965; Maas 등, 1976). 체외배양 시 높은 농도의 산소는 과량의 활성산소를 생산하여 체외발달 정지현상(*in vitro* cell block)을 유발한다고 보고하였다(Johnson과 Nasr-Esfahani, 1993). 지금까지 여러 연구자들이 다양한 종류의 동물에서 산소농도를 조절하여 배발달을 개선시키고자 하였는데, Pabon 등(1989)은 생쥐에서, Mckiernan과 Bavister(1990)는 햄스터에서, Li와 Foote(1993)는 토끼에서, Tervit 등(1972)은 양에서, 그리고 Thompson 등(1990)과 Lim 등(1999)은 소에서 각각 20%보다 낮은

산소농도에서 높은 배발달률을 보였다. 반면, Wright 등(1976) 및 Betterbed와 Wright(1985)는 양에서, Johnston 등(1991)은 고양이에서 산소농도가 유의한 발달률의 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 산화 스트레스를 줄이기 위해 5%의 산소농도를 20% 산소농도와 비교해 보았으나, 두 산소농도간의 유의한 차이를 확인할 수 없었다. 이는 Tervit 등(1972), Thompson 등(1990), Lim 등(1999)의 연구결과와 유사하였다.

본 연구를 바탕으로 배반포 수정란의 생산효율을 높이기 위하여 체외배양 조건을 개선하는 등 좀더 폭넓은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

### 적 요

본 연구는 돼지 체외수정란 생산효율을 향상시켜 돼지의 품종개량, 형질전환 돼지생산 등과 멸실위험에 처해 있는 유전자원의 보존을 위한 기술로 활용하기 위해 미성숙 난포란의 적정 체외성숙 시간을 알아보고, 배양액의 종류 및 체외 배양시의 산소 농도에 따른 체외수정란의 생산 효율을 확인한 결과는 다음과 같다.

1. 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시간별 제2감수분열중기(MII)까지 성숙된 비율이 체외성숙 38, 40, 42시간째에 각각 61.1%, 42.9% 및 69.6%를 나타내어 그 비율이 70% 미만으로 낮은 반면, 체외성숙 44, 46, 48시간째에 각각 73.7%, 94.1% 및 100%의 체외성숙률을 나타내어 최소한 44시간 이상의 체외성숙이 필요한 것으로 조사되었다.
2. 체외배양액의 종류에 따른 배반포 발달률이 NCSU-23 18.8%, PZM-5 16.3%를 나타내어 유의적인 차이를 보이지 않았으며( $p>0.05$ ), 산소분압에 따른 배반포 발달률이 5% 산소분압에서 11.9%, 20%의 산소분압에서 15.8%를 나타내어 두 군간의 유의한 차이는 보이지 않았다( $p>0.05$ ).
3. 체외배양 7일째 발달된 배반포 수정란의 총세포수는 40개 내·외를 나타내었다.

이상의 결과, 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시간은 44시간 정도가 적정한 것으로 확인되었으며, 서로 다른 배양액과 산소농도가 돼지 체외수정란의 배발달에 있어서 유의적인 차이를 나타내지는 못하였다.

### 참고문헌

Betterbed B and Wright RW Jr. 1985. Development of one-cell bovine embryos in two culture media under gas atmospheres. *Theriogenology*, 23:547-553.

Cheng WTK, Polge C and Moor RM. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes. *Theriogenology*, 25:146 (abstr.).

Cosby IM, Gandolfi F and Moor RM. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 82:769-775.

Edawrd RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.

Gandhi, AP, Lane M, Gardner DK and Krisher RL. 2001. Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 58:269-275.

Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54: 379-383.

Jarrell VL, Day BN and Printher RS. 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. *Biol. Reprod.*, 44:62-68.

Joenje H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. *Mut. Res.*, 291: 193-208.

Johnson MH and Nasr-Esfahani. 1993. Radical solutions and cultural problems: Could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian-embryos *in vitro*? *Bioessays*, 16(1):31-38.

Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ and Wildt DE. 1991. Influence of temperature and gas atmosphere on *in-vitro* fertilization and embryo development in domestic cats. *J. Reprod. Fert.*, 92:377-392.

Lane M and Gardner DK. 2000. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse. *Biol. Reprod.*, 62:16-22.

Li J and Foote RH. 1993. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. *J. Reprod. Fert.*, 98:163-167.

Lim JM, Reggio BC, Godke RA and Hansel W. 1999. Development of *in-vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. *Humam Reprod.*, 14(2):458-464.

Maas DHA, Storey BT and Mastroianni L. 1976. Oxygen tension in the oviduct of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil. Steril.*, 27:1312-1317.

Manabu O, Takashi N, Hiroyuki K, Junko N, Katsuhiko O and

- Kazyhiro K. 2006. Successful pig embryonic development *in vitro* outside a CO<sub>2</sub> gas-regulated incubator: Effects of pH and osmolality. *Theriogenology*, 65:860-869.
- Mastroianni L and Jones R. 1965. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J. Reprod. Fert.*, 9:99-102.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1209.
- Mckiernan SH and Bavister BD. 1990. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 43:404-413.
- Pabon JE, Findly WE and Gibbons WE. 1989. The toxic effect of shirt exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fert. Steril.*, 51: 896-900.
- Schoenbeck RA, Peter MS, Rickords LF, Stumpf TT and Parther RS. 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.
- Suzuki H, Jeong BS and Yang X. 2000. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 63:723-729.
- Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 30:493-497.
- Thomson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE and Tervit HR. 1990. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.*, 89:573-578.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI and Fick GH. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- Wongsrikeao P, Kaneshige Y, Oki R, Taniguchi M, Agung B, Nii M and Otoi T. 2005. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.*, 40:166-170.
- Wright RW Jr, Anderson GB, Cupps PT and Drost M. 1976. Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 14:157-162.
- Yoneda A, Suzuki K, Mori J, Ueda J and Watanabe T. 2004. Effects of delipidation and oxygen concentration on *in vitro* development of porcine embryos. *J. Reprod. Dev.*, 50(3): 287-295.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM and Iwamura K. 2002. Birth of piglet derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.*, 66:112-119.
- 변태호, 이상호, 송해범. 1991. 가축 난자핵의 급속 염색법 개발. *한국축산학회지*, 33(1):25-31.
- 천행수, 한만희, 김종화, 박병권, 이규승, 서길웅. 2004. 배양액 과 산소농도가 돼지난포란의 체외 성숙과 배발달에 미치는 영향. *한국동물번식학회지*, 28(2):119-126.
- 한만희, 천행수, 김종화, 박병권, 서길웅, 이규승. 2004. PZM 배양액이 돼지체외 수정란의 배발달에 미치는 영향. *한국 동물번식학회지*, 28(2):113-117.

---

(접수일: 2007. 8. 15 / 채택일: 2007. 8. 31)