

돼지 초기배 체외수정란 이식으로 산자 생산

최창용¹, 김현중¹, 조상래¹, 연성흠¹, 한만희¹, 김재범¹, 김성재¹, 강다원², 손동수^{1,*}
¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²경상대학교 의과대학 생리학교실

Production of Piglet Derived from *In Vitro* Produced Porcine Early Embryos

Changyong Choe¹, Hyun-Jong Kim¹, Sang-Rae Cho¹, Sung-Heum Yeon¹, Man-Hye Han¹,
Jae-Bum Kim¹, Sung-Jae Kim¹, Dawon Kang² and Dong-Soo Son^{1,*}

¹Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

²Department of Physiology, College of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-751, Korea

ABSTRACT

It is not easy for porcine embryos produced by *in vitro* systems to develop into blastocysts with high quality. To solve this problem, many researchers have developed novel culture methods. However, the formation of blastocysts with high quality is still low. In this study, we aimed to produce piglet following transfer of *in vitro* produced early embryos (2~4 cell stage embryos) or morula and blastocyst. The 2~4 cell stage embryos were transferred to five estrus-synchronized recipients (200 embryos per recipient). One of the five sows farrowed three piglets, which contain two live piglets and one dead piglet, 114 days after embryo transfer. However, two recipients transferred with morula and blastocysts did not farrow. Microsatellite analysis confirmed that the genomic DNA of two live piglets were not genetically identical to that of the recipient.

These results indicate that it is possible to obtain piglets by transfer of early embryos produced by *in vitro* production (IVP) systems.

(Key words : porcine, piglet, embryo transfer, microsatellite, IVP)

서 론

돼지 체외수정란을 이용한 수정란 이식은 이종 장기 이식 동물 생산, 형질전환 돼지 생산 및 멸실 위험에 있는 유전 자원의 보존을 위한 연구의 바탕이 되는 기술로서 꾸준히 연구되어 왔다.

돼지에서 수정란 이식을 통한 산자 생산은 Kvangnikii(1951)에 의해 처음으로 성공하였는데, 체내수정란을 통한 산자 생산이 성공한 이후 Yoshida(1987, 1989), Nagai 등(1988)은 체내에서 성숙된 난자를 회수한 후 이를 체외수정시켜 산자를 생산하였으며, 이후 수정란 이식 기술을 선도하는 몇몇 나라에서 체외에서 성숙, 수정시킨 수정란을 수란돈에 이식하여 자돈을 생산하게 되었으며, 이식하는 수정란의 발달 단계도 2~4세포기(Mattioli 등, 1989; Yoshida 등, 1993; Funahashi 등, 1996, 1997; Funahashi와 Day, 1997), 8세포기~상실배(Day 등, 1998), 배반포기(Marchal 등, 2001; Kikuchi 등, 2002; Yoshioka 등, 2003; Suzuki 등, 2004) 수정란으로 다양하게 이식

하여 산자 생산을 이루었다.

우리나라에서는 손(1988)이 체내수정란을 채란하여 이를 발정동기화 시킨 수란돈에 이식하여 산자 생산에 성공하였으나, 아직까지 체외수정란을 이식하여 산자를 생산한 보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 체외에서 성숙, 수정, 발달시킨 수정란을 발정동기화시킨 수란돈에 이식하고 산자를 생산하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 체외수정란의 생산

1) 난포란의 채취

체외수정란 생산을 위해 사용된 돼지 난소는 도축장으로부터 회수되었다. 돼지 도축 즉시 난소를 적출하여 100 units/ml의 penicillin G와 100 µg/ml의 streptomycin이 함유된 30°C 내외의 생리식염수에 담아 1~2시간 내에 실험실로 운반하였

* Correspondence : E-mail : sonds@rda.go.kr

다. 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 등급 분류 방법을 따랐다.

2) 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 North Carolina State University(NCSU)-23 기본 배양액에 10% 돼지 난포액(porcine follicular fluid, PFF), 0.5 $\mu\text{g/ml}$ porcine FSH, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ equine LH, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 17 β -estradiol(E_2) 및 10 ng/ml epidermal growth factor(EGF)를 첨가하여 체외배양하였다. 난포란의 체외성숙용 배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)의 각 well당 500 μl 씩 넣어 39°C CO₂ 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°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양한 후, 호르몬만을 제외한 배양액으로 옮겨 22~24시간 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 μm 와 0.45 μm 필터를 이용하여 여과한 후 -20°C에 냉동 보관하면서 필요시 사용하였다.

3) 정자의 처리 및 체외수정

체외수정용 정자는 도축된 수퇘지의 정소상체 미부를 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 정장 물질 및 오염물을 제거하였다. 세정 후 하단에 남은 정자 침전물에 modified Tris-buffered medium(mTBM) 배양액을 넣어 39°C의 5% CO₂ 배양기에서 20분간 정치하여 수정능 획득을 유도하였다.

체외수정은 2.5 mM caffeine과 0.1% BSA가 첨가된 mTBM에서 이루어졌다. 44시간 동안 체외 성숙된 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 최종 농도를 1.5×10^5 sperm/ml로 조정하여 수정용 소적에 넣어 6시간 동안 39°C의 5% CO₂ 배양기에서 수정을 유도하였다.

4) 체외수정란의 체외배양

돼지 체외수정란의 배양은 체외수정시킨 후 3일 동안 0.4% BSA가 함유된 NCSU-23에서 이루어졌다. 체외수정란은 배양액으로 세정한 후 각 well당 500 μl 의 배양액이 들어있는 4-well dish에서 배양하고(50개 수정란/500 μl 배양액), 체외배양 3일 후 수정란을 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 NCSU-23 배양액으로 옮겨 상실배 및 배반포기까지 발달시켰다.

2. 돼지 체외수정란의 이식 및 친자 감별

1) 수란돈의 발정동기화

본 시험에 사용된 돼지는 국립축산과학원 가축유전자원시험장에서 사육하고 있는 12개월령 이상의 미경산돈으로 발정동기화를 위해 수란돈은 발정 주기와 관계없이 altrenogest(Regumate[®], Intervet, France)를 1일 20 mg씩 14일간 사료에 혼합하여 급여하고, altrenogest 마지막 급여시 equine chorionic gonadotrophin(eCG)(Folligon[®], Intervet, Netherland) 1,000 IU를 피하주사 하였으며, eCG 투여 후 80시간째 human chorionic gonadotrophin(hCG)(Chorulon[®], Intervet, Netherland) 500 IU를 근육주사하였다.

2) 수정란 이식

hCG 투여 후 2일째 2~4 cell 단계의 수정란 또는 5~6일째 상실배 및 배반포 수정란을 개복 수술에 의한 외과적인 방법으로 이식하였다. 수란돈은 수술 12시간 전부터 사료 급여와 급수를 중지시켰다. 수술돼지는 체중 kg 당 atropine sulfate (Atropine[®], 광명약품, 대한민국) 0.04 mg과 azaperone(Stressnil[®], Janssen, Swiss) 1 mg을 근육주사하여 진정(전마취)시키고, 15분 후 체중 kg 당 ketamine HCl(Ketamine 50[®], 유한양행, 대한민국) 10 mg과 xylazine HCl(Rompun[®], 바이엘코리아, 대한민국) 2 mg을 정맥주사하여 전신 마취를 유도하였다.

전신 마취된 돼지는 절개창 주변을 제모와 수세하고, 10% povidone iodide로 소독한 다음 15 cm의 피부를 절개하고, 피하지방을 절개창에 따라 좌우로 둔성분리한 다음 근육과 복막을 절개하였다. 복막절개 후 자궁을 복강 밖으로 노출시킨 다음, 각각의 난소에서 배란점을 확인하였다. 수정란의 이식은 수정란이 장착된 foley catheter를 난관채에서 자궁각쪽으로 최대한 주입하여 2~4 cell 단계의 수정란은 난관에, 5~6일째 상실배 및 배반포 수정란은 자궁각을 천자한 후 자궁각 선단부에 이식하였다(Fig. 1).

3) 수란돈과 자돈의 친자 감별

친자 감별은 FTA card(Whatman®, USA)에 혈액을 흡착, 건조시켜 보관 후 FTA 추출 kit(Whatman®, USA)를 사용하여 흡착된 DNA를 추출한 다음, 증폭에 사용하였다.

Micorsatellite(MS) marker 분석은 국제동물유전학회(International Society for Animal Genetics, ISAG)가 추천하는 국제 표준 marker 11종을 이용하여 PCR 증폭하였다. 증폭은 Gene-Amp PCR system 9700(AplidBiosystems, USA)을 사용하여 수행하였는데, 94℃에서 5분간 전처리를 실시한 후, 94℃ 60초간 denaturing, 각각의 marker에 적합한 온도에 맞추어 30초간 annealing, 72℃에서 60초간 extension, 72℃에서 7분간의 후처리를 실시하였으며, denaturing부터 extension까지의 반복 수는 30회 실시하였다. PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

결 과

발정 동기화시킨 수란돈 5두는 2~4 세포기 단계의 체외수정란을 양측 난관에 100개씩 이식하였고, 2두는 상실배 및 배반포 단계의 체외수정란을 양측 자궁각에 50~85개씩 이식하였다. 수정란 이식후 114일째에 2~4 세포기 단계의 체외수정란을 이식한 수란돈 1마리가 3마리의 산자를 생산하였다. 생

산된 3마리의 자돈 중 1마리는 저체중(920 g, 수컷)으로 분만 직후 폐사하였고, 암컷 1마리(1,150 g)와 수컷 1마리(1,560 g)는 생존하였다(Table 1, Fig. 1-D).

수정란 이식으로 태어난 개체의 확인을 위하여 11종의 MS markers를 이용하여 친자 감별을 실시한 결과는 다음과 같다. Fig. 2의 S0026 marker에서 보는 바와 같이 수란돈이 가지고 있는 대립 유전자 97이 자돈에서는 관찰되지 않고 공란돈 유래로 추정되는 91 및 93(수컷)과 93 및 99(암컷)의 대립 유전자가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 자돈 수컷에서는 S0097, 자돈 암컷에서는 S0178, S0228 및 SW830 marker에서 관찰되어 수란돈의 유전적인 영향을 받지 않은 체외수정란에서 생산된 것으로 확인되었다(Table 2).

고 찰

최근 가축유전자원 보존의 중요성이 세계적으로 인식되면서 가축의 개량 및 생산성 향상을 위해 활용되어온 수정란 이식 기술이 가축의 유전적 다양성을 장기간 저비용으로 안전하게 보존할 수 있는 수단으로 평가받고 있다(손 등, 2004).

기초과학 및 생명공학 연구의 바탕이 되어온 수정란 이식 기술은 사람과 가장 비슷한 크기 및 생리학적 특성을 가지고 있는 돼지에서 더욱 괄목할 만한 발달이 이루어왔다. 돼지에서 수정란 이식을 통한 산자 생산은 Kvangnikii(1951)이 돼지에서 수정란 이식을 통하여 처음으로 성공한 이후 초창기 여러 연구자들에 의해 돼지의 번식생리와 수정란 이식 방법에 대한 연구가 이루어졌다(Hancock와 Hovell, 1962; Dziuk 등, 1964; Hunter, 1966; Baker와 Coggins, 1968; Christenson 등, 1970; Webel 등, 1970; Guthrie 등, 1974). 체내수정란을 이용한 수정란 이식으로 산자 생산을 성공한 이후 좀 더 다양하고, 대량으로 생산이 가능한 체외수정란을 이용한 연구가 이어지게 되었는데, Nagai 등(1988)이 체내성숙 난자를 체외수정 후 이식하여 산자 생산을 성공하였고, Mattioli 등(1989)에 의해 체외에서 성숙시킨 난자를 체외수정하고 이를 이식하여 산자

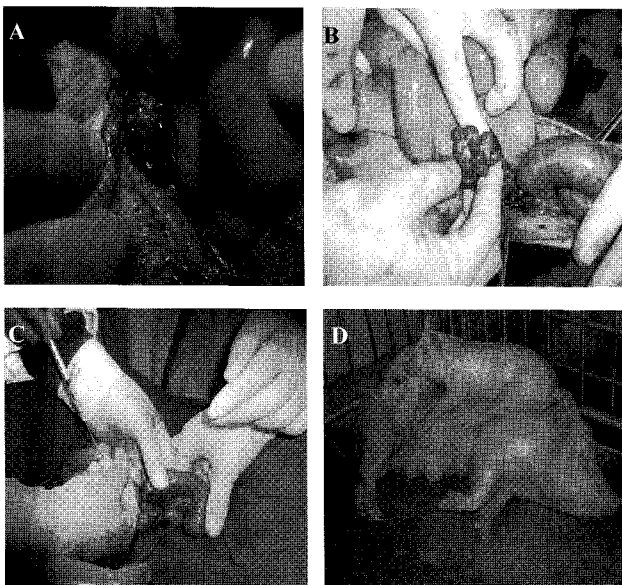


Fig. 1. Surgical embryo transfer and production of piglet. (A) Formulation of corpus rubrum after 1 day of ovulation. (B) Formulation of corpus luteum after 7 days of ovulation. (C) Transfer of morular or blastocyst stage embryos in the fore part of a uterine horn. (D) Piglet production by transfer of 2~4 cell stage embryos.

Table 1. Embryo transfer using *in vitro* produced porcine embryos

Development stage of transferd embryos	No. of transferd embryos	No. of		
		Recipients	Parturition (%)	Piglet
2~4 cell	200	5	1 (20.0)	3*
ML + BL**	100~170	2	0 (0.0)	0

* 1 female, 2 male (one of male was immediately dead after birth)

** ML + BL : morular + blastocyst stage

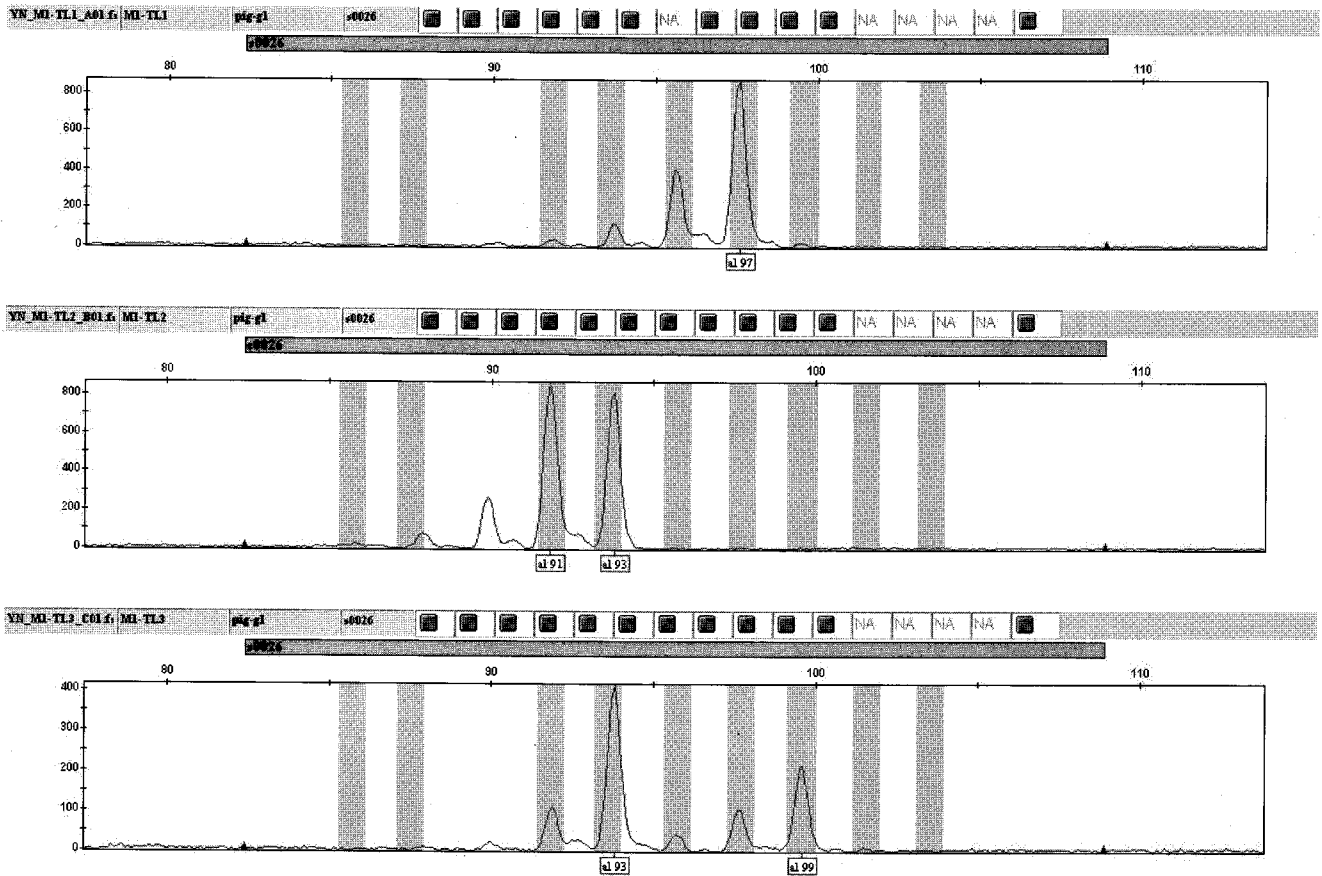


Fig. 2. Microsatellite analysis of two live piglets derived from *in vitro* produced 2~4 cell stage embryos.

Table 2. The microsatellite genotypes of a recipient and its offsprings which are derived from *in vitro* produced 2~4 cell stage embryos

Marker	Size of alleles					
	Recipient		Piglet 1 (♂)		Piglet 2 (♀)	
S0005	236	240	228	240	228	236
S0026	97	97	91	93	93	99
S0090	240	244	240	242	240	242
S0097	204	234	238	240	204	234
S0155	155	155	145	155	155	157
S0178	108	118	108	122	122	122
S0218	163	163	163	163	163	163
S0228	218	240	218	222	222	222
SW72	97	105	97	107	97	107
SW830	176	186	176	176	178	180
SW857	147	155	147	155	139	147

생산까지 이루게 되었다. 그러나 우리나라에서는 손(1988)이 체내수정란을 수란돈에 이식하여 산자 생산에 성공한 이후 최근까지 체외수정란을 이식하여 산자 생산에 이르지 못하다가 본 연구에서 2~4세포기의 체외수정란을 이식하여 산자 생산에 성공하였다.

최근 체외수정란 이식은 2~4세포기의 초기배 수정란 뿐만 아니라 8세포기에서 상실배 수정란(Day 등, 1998), 배반포 수정란(Suzuki 등, 2004, 2006)을 이식하여 산자 생산에 성공하였다.

또한 다른 동물에 비해 돼지 수정란이 동결에 취약하여 동결수정란을 이용한 산자 생산에 성공하지 못하다가 최근 몇몇 국가에서 동결보존한 돼지 수정란을 융해한 후 이식하여 자돈생산에 성공하고 있다(Berthelot 등, 2000; Dobrinsky 등, 2000; Beebe 등, 2002; Misumi 등, 2003). 우리나라에서는 김과 석(2008)이 동결수정란을 이식하여 임신까지는 도달하였으나, 산자 생산까지는 성공하지 못하였다.

돼지의 수정란 이식은 오랜 기간 동안 외과적인 방법을 이용하여 왔으나, 좀 더 안전하고, 편리하게 이식할 수 있는 비외과적인 방법이 개발되고 있다. Martinez 등(2004)은 공란돈

에서 채취한 체내수정란을 비외과적 이식기를 이용하여 높은 출산율을 보고하였고, Suzuki 등(2004)은 체외에서 생산한 배반포 수정란을 비외과적 방법으로 이식하여 산자 생산에 성공하였다.

본 연구에서 돼지 초기배 체외수정란을 이식하여 산자 생산에 성공하기는 하였으나, 위에서 언급한 후기배 수정란 이식, 동결수정란 이식, 비외과적 이식 등 첨단 생명공학 기술을 이용한 돼지 수정란 이식 및 산자 생산은 이룩하지 못한 실정이다. 특히 후기배 수정란을 이식해서는 산자 생산까지 도달하지 못하였는데, 이는 수란돈의 공시두수가 2마리밖에 되지 않으므로 이후 후기배 수정란을 이용한 이식을 반복하고, 이식 시 스트레스를 줄이기 위하여 비외과적 방법 등을 이용한다면 좋은 연구 결과가 있을 것으로 추측되며, 본 연구를 바탕으로 생명공학 연구의 근간이 되는 돼지 수정란 이식을 통한 산자 생산을 위해 좀더 지속적이고, 폭넓은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

돼지의 경우 체외에서 품질이 좋은 배반포 단계의 수정란을 발달시키는 것이 아직까지 쉽지 않은 편이다. 이와 같은 문제를 해결하기 위해 많은 연구자들이 새로운 체외배양 방법을 연구해 왔지만 배반포 수정란으로의 발달 효율이 높지 않은 실정이다.

본 연구는 체외에서 생산된 돼지 2~4 세포기 단계의 초기배 수정란과, 상실배 또는 배반포의 후기배 수정란을 이식하여 산자를 생산하고자 실시하였다. 발정동기화 시킨 수란돈의 양측 난관에 100개씩 총 200개의 2~4 세포기 초기배 수정란을 이식한 다섯 마리의 수란돈 중 한 마리가 수정란 이식후 114일째 3마리의 자돈(수컷 2, 암컷 1)을 분만하였다. 이들 중 수컷 1마리는 저체중으로 분만후 바로 폐사하였고, 2마리는 생존하였다. 그러나 상실배와 배반포의 후기배를 자궁각에 이식한 2마리의 수란돈은 새끼를 생산하지 못하였다. 생산된 자돈 2마리는 Microsatellite(MS) 분석으로 수란돈이 자돈의 친자가 아님을 확인하였다.

본 연구는 체외에서 성숙, 수정, 발달된 돼지 초기배 체외 수정란을 이식하여 산자를 생산하는 것이 가능함을 확인하게 되었다.

참고문헌

- Baker RD and Coggins EG. 1968. Control of ovulation rate and fertilization in prepuberal gilts. J. Anim. Sci. 27:1607-1610.
- Beebe FS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Higgins A and Nottle MB. 2002. Piglets born from vitrified zona-intact blastocysts. Theriogenology 57:2155-2165.
- Berthelot F, Marinnat-Botte F, Locatelli A, Perreau C and Terqui M. 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. Cryobiology 41:116-124.
- Christenson RK, Pope CE, Zimmerman VA and Day BN. 1970. Synchronization of ovulation in superovulated gilts. J. Anim. Sci. 31:219.
- Day BN, Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH and Cantley TC. 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.
- Dobrincky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. Biol. Reprod. 62:564-570.
- Dziuk PJ, Polge C and Rowson LEA. 1964. Intra-uterine migration and mixing of embryos in swine following egg transfer. J. Anim. Sci. 23:27-42.
- Funahashi H and Day BN. 1997. Advances in *in vitro* production of pig embryos. J. Reprod. Fertil. Suppl. 52:271-283.
- Funahashi H, Cantley TC and Day BN. 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutylryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following *in vitro* fertilization. Biol. Reprod. 57:49-53.
- Funahashi H, Kim NH, Stumpf TT, Cantley TC and Day BN. 1996. Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. Biol. Reprod. 54:1412-1419.
- Guthrie HD, Henricks DM and Handlin DL. 1974. Plasma hormone levels and fertility in pigs induced to superovulate with PMSG. J. Reprod. Fert. 41:361-370.
- Hancock JL and Hovell GJR. 1962. Egg transfer in the sow. J. Reprod. Fert. 4:195-201.
- Hunter RHF. 1966. The effect of superovulation on fertilization and embryonic survival in the pig. Anim. Prod. 8:457-465.
- Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H. 2002. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. Biol. Reprod. 66:1033-1041.
- Kvansnickii AV. 1951. Interbreed ova transplantation. Sovetsk, Zootech. 1:36-42.

- Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M, Mermillod P. 2001. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 56:17-29.
- Martinez EA, Caamano JN, Gil MA, Rieke A, McCauley TC, Cantley TC, Vazquez JM, Roca J, Vazquez JL, Didion BA, Murphy CN, Prather RS and Day BN. 2004. Successful non-surgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 61:137-146.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 31:1201-1207.
- Misumi K, Suzuki M, Sato S and Saito N. 2003. Successful production of piglets derived from morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 60:253-260.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioyo Y, Kuiwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In-vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 84:585-591.
- Suzuki C, Iwamura S and Yoshioka K. 2004. Birth of piglets through the non-surgical transfer of blastocysts produced *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 50:487-491.
- Suzuki M, Misumi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Fuchimoto D, Onishi A, Iwamoto M, Saito N, Nagai T and Kikuchi K. 2006. Successful piglet production by IVF of oocytes matured *in vitro* using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. *Theriogenology* 65:374-386.
- Weibel SK, Peters JB and Anderson LL. 1970. Control of estrus and ovulation in the pig by ICI 33828 and gonadotropins. *J. Anim. Sci.* 30:791-794.
- 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.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishiaki 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.
- Yoshida M. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49:711-718.
- Yoshida M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vivo*. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 35:35-37.
- Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S and Rodriguez-Martinez H. 2003. Production of piglets derived from *in vitro*-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: Effects of theophylline, adenosine, and cysteine during *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 69:2092-2099.
- 김인덕, 석호봉. 2008. Open pulled straw (OPS) 방법에 의한 체외배양 동결 수정란의 미경산돈 이식. *한국수정란이식학회지* 23:217-222.
- 손동수, 연성흠, 허태영, 강석진, 서국현, 최선호, 류일선, 이규승, 박창식. 2004. 재래돼지에서 수정란의 회수 및 동결보존에 관한 연구. *한국수정란 이식학회지* 19:257-264.
- 손동수. 1988. 돼지의 수정란이식에 관한 고찰. *한국수정란 이식학회지* 3:6-12.