

토끼의 난포발육 처리후 난포란 체외성숙시 핵의 발달과정[†]

박충생 · 이경미 · 진병균 · 강태영* · 이효종* · 최상용*

경상대학교 축산학과

Nuclear Progression through *In Vitro* Maturation of Follicular Oocytes in Superovulatory Treated Rabbits[†]

C. S. Park, K. M. Lee, B. G. Jeon, T. Y. Kang*, H. J. Lee* and S. Y. Choe*

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

In order to determine the optimum condition and timing for *in vitro* maturation of oocytes to metaphase of meiosis II (M II), the immatured follicular oocytes were recovered by puncturing the large(1.0~1.5 mm in diameter) and small(<1.0 mm in diameter) follicles in the ovaries of rabbits treated intramuscularly with a single dose of 100 IU PMSG 68 hours previously. The follicular oocytes were classified into three grades by the attachment of cumulus cells. The Grade I and II follicular oocytes from large follicles were cultured in BO-DM medium with 10% FCS, 35 μg /ml of FSH, 10 μg /ml of LH and 1 μg /ml of estradiol-17 β at 39 $^{\circ}\text{C}$ in a 5% CO₂ incubator for 11 to 23 hours.

In 3 hours interval during the culture period, the oocytes were harvested and their cumulus cells were removed with hyaluronidase. The denuded oocytes were stained with Hoechst 33342 dye and their meiotic status and extrusion of the first polar body(PB) were examined under a fluorescence microscope. Also the fragmentation of the first PB and the distance between the first PB and nucleus were examined. The results obtained were as follows:

1. The mean recovery rate of follicular oocytes from the large and small follicles was 59.9 and 31.3%, respectively. The mean number of oocytes recovered per rabbit and the Grade I percentage were 14.6 and 94.4% in large follicles, but 2.1 and 61.1% in small follicles, respectively. All the parameters examined were different significantly ($p < 0.05$) between both the follicular size.
2. Most of the follicular oocytes(86.8%) were matured *in vitro* to M II phase in 14 hours in Grade I oocytes, but the significantly($p < 0.05$) less oocytes(45.5%) were matured in Grade II oocytes.
3. The first PB was extruded in most of the oocytes(94.7%) in 14 hours of culture with the fragmentation rate of 29.6%, but the fragmentation rate of the first PB increased significantly($p < 0.05$) as the culture period for maturation was longer to 20 hours(63.5%).

[†] 이 연구는 1992년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초연구 사업비로 연구되었음(KOSEF:92-24-00-10).

* 경상대학교 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

4. The distance between the first PB and nucleus was increased linearly($p < 0.05$) as the maturation time passed from 14(7.1 μm) to 23 hours(58.4 μm).
5. From the above results it was concluded that the optimum time for *in vitro* maturation culture might be 14 hours in the follicular oocytes from rabbit primed with PMSG for 68 hours, especially when these follicular oocytes were used for recipient cytoplasms in embryo cloning.

Key words : *in vitro* maturation, follicular oocytes, rabbit

서 론

대부분의 포유동물의 난포란은 태생기에 체세포 분열에 의해 증식된 원시성세포가 난원세포(oogonia)로 되었다가 출생 전에 제1난포세포상태로 성숙된다. 개체가 태어난 직후부터 성숙이 일어날 때까지 난포내 난자는 제1감수분열 전기(P I)에서 성숙이 정지되고 있다. 이러한 미성숙 난포란은 성숙기부터 뇌하수체에서 분비되는 luteinizing hormone (LH)에 의해 제한된 수의 난포란에서만 핵막붕괴가 일어나고, 제1극체가 형성되며, 제2감수분열 중기(M II)까지 발달하여, 이 단계에서 배란된다(Sirad 등, 1989).

많은 포유동물의 난포란은 난포로부터 분리한 후 체외성숙 배양을 하면 정지상태의 감수분열이 재개되면서 핵막붕괴가 일어나는데(Edward, 1965; Eppig와 Downs, 1984; Hyttel 등, 1986), 이러한 능력은 난포강 형성 직전의 시기에 이미 난자가 획득하는 것으로 알려져 있다. 체외에서 자생적인 감수분열을 재개할 수 있는 난포란은 적당한 배양액에서 체외배양시 정상적인 발달을 할 수 있다고 Schroeder와 Eppig(1984)는 생쥐에서, Staigmiller와 Moor(1984)는 면양에서, 그리고 Crister 등(1986)과 Sirad와 First(1988)는 소에서 보고한 바 있다. 그리고 미성숙 난포란의 체외성숙에 관하여 Badenas 등(1989), Dekel 등(1988), Polanski(1986) 및 Schroeder와 Eppig(1984)은 생쥐에서, Carolan 등(1994), Younis 등(1989) 및 Ball 등(1984)은 소에서, 그리고 Cran과 Cheng(1985), Motlik와 Fulka(1986) 및 Hunter와 Polge(1966)은 돼지에서 연구 보고한 바 있다.

토끼 난포란의 체외성숙에 있어서는 김 등(1993)

이 hCG 주사 후 시간 및 난포 크기에 따른 체란율과 FSH첨가에 따른 성숙율의 차이에 대해 보고하였고, Jelínková 등 (1994)와 Smith 등 (1978)이 난포의 크기에 따른 성숙율에 관해 보고하였다.

이상과 같이 미성숙 난포란의 체외성숙에 관한 많은 연구가 있었지만, 토끼의 미성숙 난포란을 이용한 체외수정, 핵이식 등 체외조작을 위해서는 체외성숙 배양에서 핵의 발달과정 등 기초정보가 부족하다. 대부분의 연구자들은 토끼 난포란을 채란 후 12시간 동안 체외성숙시키고 있으나, 본 연구에서는 PMSG 100 IU를 처리한 후 68시간에 토끼난소에서 미성숙 난포란을 채란할 경우의 난포란의 체란율과, 핵이식을 위한 수핵난자의 탈핵적이인 M II 까지의 체외성숙에 필요한 최적 배양시간을 규명하고, 또한 체외성숙 시간에 따른 핵의 발달상태와 제1극체와 핵간의 거리 변화 등을 규명하여 복제배 생산기법 확립 등을 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 동물은 New Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 펠렛사료와 물을 자유로이 급식하여 사육하였다.

2. 난포란의 채란

건강하고 성숙한 암토끼에게 PMSG(Sigma Chem. Co., U.S.A.) 100 IU를 근육주사한 다음 68시간 후에 도살하여 난소를 적출하였다. 적출된 난소의 주위조직을 제거한 후 항생제(penicillin G: 100,000 IU / ℓ, streptomycin: 125 mg / ℓ)가 포함된 생리식염수로 난소를 3번 씻은 다음, 10% FCS가

첨가된 Brackett-Oliphant Defined Medium(BO-DM)이 들어있는 35×10 mm dish(Falcon Co., U. S. A.)에 놓고서 난소의 난포를 대난포(직경: 1.0~1.5 mm)와 소난포(직경: 1.0 mm 미만)로 구분하여 23 gauge 주사침으로 천자하였다. 그 후 실체현미경 하에서 난포란을 채란한 후 5% FCS가 함유된 BO-DM으로 3번 씻은 다음 4~5층의 난구세포로 둘러싸인 것은 Grade I으로, 2~3층의 난구세포로 둘러싸인 것은 Grade II로, 그리고 1층의 난구세포로 둘러싸였거나 부분적으로 나화된 것은 Grade III으로 등급을 구분하였다.

3. 난포란의 체외성숙

대난포에서 회수된 난포란 중 Grade I 과 II를 10% FCS 및 호르몬이 함유된 BO-DM 배양액(35 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH 및 1 µg/ml estradiol-17β 첨가)이 1 ml씩 담긴 4-well dish(Nunclon, Co., U.S.A.)에 넣어 5% CO₂, 39°C incubator에서 11~23시간 동안 체외성숙시키는 동안 3시간 간격으로 bovine testes hyaluronidase(Sigma) 1 mg/ml이 함유된 배양액에 처리한 다음, 좁은 pipette으로 흡입을 반복함으로써 난구세포를 제거하고, Hoechst 33342(Sigma)로 핵염색을 한 후 형광현미경 하에서 핵의 발달상태와 제1극체의 유무를 조사하였다.

4. 제1극체의 형태 관찰과 핵간의 거리 측정

대난포에서 회수된 난포란 중 Grade I의 난포란을 14~23시간 체외성숙시키는 동안 3시간 간격으로 hyaluronidase에 처리한 다음 난구세포를 제거한 후 Hoechst 33342(45 µg/ml)가 들어있는 10% FCS를 첨가한 TCM-199에 넣어 5% CO₂, 39°C incubator에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 형광현미경 하에서 측정시마다 제1극체를 오른쪽에 위치하게 한 후 제1극체와 핵간의 거리를 micrometer로 측정하였다.

5. 통계학적 분석

실험결과는 Chi-square 및 paired-t test를 실시하여 평균간의 차이에 대한 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 난포란의 채란율 및 등급

PMSG 100 IU 주사 후 68시간에 토끼에서 적출한 난소에서 난포를 대난포와 소난포로 구분하여 채란한 후 이들 난포란을 등급별로 분류한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

토끼 17마리의 34개 난소에서 414개의 대난포를 천자하여 총 248개의 난포란을 채란하였고(회수율: 59.9%), 115개의 소난포를 천자하여 36개의 난포란을 채란하여(회수율: 31.3%) 대난포에서의 회수율이 소난포에서의 회수율보다 높았다. 그리고 두당 채란수도 대난포에서는 14.6개이었으나 소난포에서는 2.1개에 불과하였으며, 채란된 난포란의 등급도

Table 1. Recovery and quality of follicular oocytes from rabbits primed with PMSG for 68 hours*

Size of follicles (diameter)	No. of follicles punctured	No. of oocytes recovered	Recovery rate(%)	No. of oocytes recovered /rabbit	No. (%) of oocytes by grade		
					I	II	III
Large (1.0~1.5 mm)	414	248 ^a	59.9 ^a	14.6±2.7 ^a	234 (94.4) ^a	6 (2.4)	8 (3.2)
Small (<1.0 mm)	115	36 ^b	31.3 ^b	2.1±0.5 ^b	22 (61.1) ^b	5 (13.9)	9 (25.0)
Total	529	284	53.6	16.7±1.9	256 (90.1)	11 (3.9)	17 (6.0)

* Mean±SEM. The oocytes were recovered from 17 rabbits. The oocytes surrounded by cumulus cells of 4~5 and 2~3 layers, and denuded partially were denoted by Grade I, II and III.

대난포에서는 94.4%이었으나, 소난포에서는 61.1%이었다. 이들 조사항목 모두에서 대난포와 소난포간에 유의차($p < 0.05$)가 인정되었다. 이는 박과 이(1992)가 돼지에서 대난포에서의 회수율이 중, 소형에서의 회수율보다 높았다는 보고와 일치하는 경향을 보였다. 그러나 김 등(1993)이 토끼에 hCG 100 IU를 주사한 후 대, 중, 소난포에서의 회수율이 각각 12.5, 20.5 및 67.0%였다는 보고와는 차이가 있었는데, 이는 이들이 난포성장을 촉진하는 약품을 사용하지 않은 점, 난포의 크기에 따른 분류 기준의 차이 등 실험방법의 상이에 기인한 것으로 생각된다. 본 실험에서는 직경이 1.5 mm 이상인 난포는 혈포가 많았으며, 점성이 강하여 채란에 어려움이 있어서 실험대상에서 제외하였다.

난구세포의 부착정도에 따라 등급별로 분류하였을 때 Grade I, II 및 III의 난포란이 대난포에서는 각각 234(94.4%), 6(2.4%) 및 8(3.2%)개였고, 소난포에서는 각각 22(61.1%), 5(13.9%) 및 9(25.0%)개로서 치밀한 난구세포를 가진 Grade I 난포란의 회수율이 대난포와 소난포 모두에서 Grade II 및 III 난포란에 비하여 월등히 높았다. 이와 같은 결과는 박과 이(1992)가 난구세포가 부착되어 있는 Good과 Fiar(86.3%)가 채란된 난포란의 대부분을 차지하였다는 보고와 일치한다.

2. 난포란의 체외성숙 배양시 핵의 발달과정

Fig. 1에서 보는 바와 같이 PMSG를 처리 후 68시간에 채란한 토끼의 Grade I 난포란은 체외성숙 배양 14시간에 대부분 M II phase로 성숙되고 있

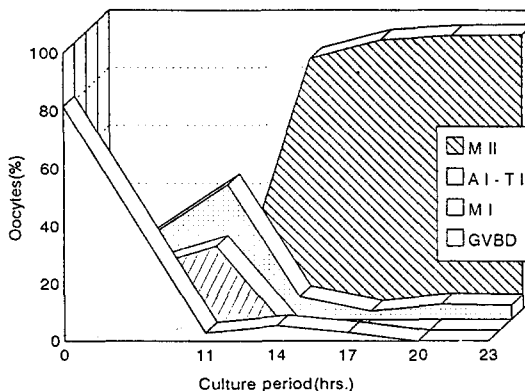


Fig. 1. Nuclear progression during culture for maturation of Grade I follicular oocytes from rabbits primed with PMSG for 68 hours* (M II: metaphase II, A I: anaphase I, T I: telophase I, M I: metaphase I, GVBD: germinal vesicle breakdown).

다. 그리고 Table 2에서 난포란의 등급별 체외성숙도를 보면 배양 14시간에 Grade I은 86.8% 그리고 Grade II는 45.5%가 M II phase에 도달하여 등급간에 유의차($P < 0.05$)가 인정되었다. 체외성숙 배양 20시간까지는 다같이 Grade I이 Grade II보다 유의적으로 높은 M II phase 성숙율을 나타내었다. 이러한 결과는 우수한 품질의 난포란이 보다 조기에 체내 혹은 체외 성숙된다는 사실을 입증하는 것이다. Sato 등(1978)은 돼지에서 난포란을 배양한 결과 난구세포가 없는 난포란에 비해 난구세포가 있는 난포란에서 GVBD가 높고 M II phase로의 이행율이 현저히 높다고 하였으며, 박과 이(1992)는 돼

Table 2. Difference in *in vitro* maturation to M II between Grade I and II of rabbit follicular oocytes*

Culture period (hrs.)	Grade I oocytes		Grade II oocytes	
	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes matured to M II	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes matured to M II
0	27	0(0.0) ^{aA}	14	0(0.0) ^{aA}
14	38	33(86.8) ^{cA}	11	5(45.5) ^{bB}
17	33	31(93.3) ^{cA}	13	8(61.5) ^{bB}
20	38	36(94.7) ^{cA}	11	7(63.6) ^{bB}
23	40	38(95.0) ^{cA}	15	13(86.7) ^{bB}

* The follicular oocytes from rabbits primed with PMSG for 68 hours were used. The different small and capital superscripts denote significant ($p < 0.05$) difference between row and column, respectively.

지에서 난구세포가 두껍고 조밀하게 부착되어 있는 난포란에서의 성숙율이 유의성 있게 높게 나타났다고 보고하였다. 그러나 주 등(1992)은 도출된 소의 난포란의 체외성숙 배양에서 난포란의 체외 성숙속도는 등급간에 일정한 경향의 차이가 없었는데, 이는 채란전 성선자극호르몬 처리 여부 혹은 종간의 차이에 기인될 것으로 생각된다.

3. 제1극체의 형태와 핵간의 거리

대난포에서 회수된 Grade I 의 난포란은 Table 3에서 보는 바와 같이 체외성숙 14시간만에 대부분(94.7%)이 성숙되어 제1극체의 방출이 관찰되었다. 이는 Smith 등(1978)이 토끼에서 대난포(1.0~1.5 mm)에서 채란한 난포란을 16~20시간 동안 체외성숙시킬 경우 제1극체 방출율이 90~100%라고 보고한 것과 유사한 결과였다. 그러나 방출된 제1극체의 fragmentation율은 체외성숙 배양 14시간에 29.6%이었으나, 배양시간이 경과됨에 따라 계속 유의적으로($p < 0.05$) 높아져 20시간에는 63.5%에 이

르렀다. 이러한 체외성숙 배양시의 제1극체의 fragmentation율의 증가에 대한 기존의 보고는 접할 수 없으며, 이 현상이 난자의 aging에 유의한지는 의문시된다. Yang 등(1992)도 체내에서 배란된 직후의 토끼 난자 중 5%가 2개 혹은 그 이상의 극체를 가지고 있다고 보고한 바 있다.

난포란을 14~23시간 동안 체외성숙시키면서 3시간 간격으로 제1극체와 핵간의 거리를 측정된 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. 체외성숙 14, 17, 20 그리고 23시점에 제1극체와 핵간의 거리는 평균 7.1, 15.3, 29.0 그리고 58.4 μm 로서 시간이 지남으로써 유의적($p < 0.05$)으로 멀어졌다. 이는 Kono 등(1991)이 생쥐에서 hCG 처리 후 채란시간에 따라 염색체의 위치가 제1극체로부터 멀어진다고 보고한 결과와 일치하였다. 이러한 결과로 미뤄볼 때 토끼에서 핵이식에 체외성숙 난자를 이용할 경우 PMSG를 68시간 priming한 토끼에서 채란한 난포란의 경우 14시간 체외성숙 배양하여 탈핵에 사용하는 것이 적당할 것으로 사료된다.

Table 3. Configuration of first polar body in rabbit follicular oocytes during *in vitro* maturation*

Culture period (hrs.)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes with 1st PB extrusion	Configuration of 1st PB extruded (%)	
			Normal	Fragmentation
14	57	54(94.7) ^a	38(70.4) ^a	16(29.6)
17	54	52(97.3) ^a	26(50.0) ^a	26(50.0)
20	52	52(100) ^a	19(36.5) ^b	33(63.5)
23	58	58(100) ^a	22(37.9) ^b	36(62.1)

* The Grade I follicular oocytes from rabbits primed with PMSG for 68 hours were used. The values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Distance between first polar body and nucleus in rabbit follicular oocytes during *in vitro* maturation*

Culture period (hrs.)	No. of oocytes examined	Distance between the first polar body and nucleus (μm)
14	26	7.1 \pm 3.4 ^a
17	16	15.3 \pm 7.0 ^b
20	16	29.0 \pm 17.8 ^c
23	10	58.4 \pm 21.9 ^d

* Mean \pm SEM. The Grade I follicular oocytes from rabbits primed with PMSG for 68 hours were used. The values with different superscripts in the column are significantly different ($p < 0.05$).

적 요

성숙한 암토끼에게 PMSG 100 IU를 처리한 후 68시간에 난소를 적출하고, 난포의 크기에 따라 난포란을 채란하였던 바, 채란율, 두당 평균 채란수 및 Grade I 비율이 직경 1.0~1.5 mm의 대난포에서는 59.9%, 14.6개, 94.4%였으나, 직경 1.0 mm 미만의 소난포에서는 31.3%, 2.1개, 61.1%로 유의적 ($p < 0.05$)으로 낮았다.

대난포에서 회수된 난포란을 10% FCS, 35 μ g/ml의 FSH, 10 μ g/ml의 LH 그리고 1 μ g/ml의 estradiol-17 β 이 함유된 BO-DM 배양액으로 14시간 체외성숙 배양한 결과, M II phase로 성숙한 비율은 Grade I 난포란은 86.8%였는데, Grade II 난포란은 유의적 ($p < 0.05$)으로 적은 45.5%이었다.

Grade I 난포란에서 제1극체 방출은 체외성숙 배양 14시간에 94.7%에 달하여 대부분이 이 시간에 성숙이 완료됨을 알 수 있었으나, 제1극체의 fragmentation 현상이 나타났고(29.6%), 시간이 지남에 따라 유의적 ($p < 0.05$)으로 증가하여 체외배양 20시간에는 63.5%에 달하였다. 또한 제1극체와 핵간의 거리는 체외배양 14시간에 평균 7.1 μ m였으나, 23시간에는 58.4 μ m로서 유의적 ($p < 0.05$)으로 멀어졌다.

이상의 결과로부터 토끼에서 68시간 PMSG priming 후 채란한 난포란의 경우 충분한 체외성숙 배양기간은 14시간이며, 특히 복제배 생산을 위한 수핵난자로 이용할 경우는 이 기간이 최적인 것으로 사료된다.

참고문헌

- Badenas J, Santalo J, Calafell JM and Egozcue J. 1989. Effect of the degree of maturation of mouse oocytes at fertilization: A source chromosome imbalance. *Gamete Res.* 24: 205-218.
- Ball GD, Leibfried ML, Ax RL and First NL. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 67:2775-2785.
- Carolan CM, Gallagher M and Gordon I. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilizations and culture *in vitro*. *Theriogenology* 41:1061-1068.
- Cran DG and Cheng WTK. 1985. Changes in cortical granules during porcine oocytes maturation. *Gamete Res.* 11:311-319.
- Crister ES, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1986. Influence of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryonic development. *Biol. Reprod.* 34(suppl 1):192.
- Dekel ND, Galiani D and Beers WH. 1988. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: The response to gonadotropins at different stages of follicular development. *Biol. Reprod.* 38:517-521.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208:349-351.
- Eppig JJ and Downs SM. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 30:1-11.
- Hunter RHF and Polge C. 1966. Maturation of follicular oocyte in the pig after injection of human chorionic gonadotropin. *J. Reprod. Fert.* 12:525-531.
- Hyttel P, Xu KP, Smith S and Greve T. 1986. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.* 78:615-625.
- Jeřínková L, Kubelka M, Motlik J and Guerrier P. 1994. Chromosome condensation and histon H1 kinase activity during growth and maturation of rabbit oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37:210-215.
- Kono T, Kwon OY and Nakahara T. 1991. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J. Reprod. Fert.* 93:165-172.

- Motlik J and Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25:87-96.
- Polanski Z. 1986. *In vivo* and *in vitro* maturation rate of oocytes from two strains of mice. *J. Reprod. Fert.* 78:103-109.
- Sato E, Iritani A and Nishikawa Y. 1978. Rate of maturation deviation of pig follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap. J. Zootech. Sci.* 49:400-405.
- Schroeder AC and Eppig JJ. 1984. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Dev. Biol.* 102:493-497.
- Sirad MA, and First NL. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.* 39:229-234.
- Sirad MA, Florman HM, Leifried-Rutledge ML, Barnes FL, Smis ML and First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 40:1257-1263.
- Smith PM, Tyler JPP and Ericson GF. 1978. Effects of medium composition and progesterone on maturation *in vitro* of rabbit oocytes from Graafian follicles of different sizes. *J. Reprod. Fert.* 54:393-400.
- Staigmiller RB and Moor RM. 1984. Effect of follicular cells on maturation and developmental competence of ovine oocyte matured outside the follicle. *Gamete Res.* 9:221-229.
- Yang X, Jiang SE, Kovács A and Foote RH. 1992. Nuclear totipotency of cultures rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 47:636-643.
- Younis AI, Brackett GB and FryerHosken RA. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* 23:189-201.
- 김창근 등. 1993. 체외수정 및 미세조작에 의한 가축배의 생산과 효율적 이용에 관한 연구 I. 체외성숙, 체외수정된 토끼 및 소 배의 이식과 동결. *한국가축번식학회지* 17:57-68.
- 박미희, 이효종. 1992. 돼지 난포내 난모세포의 체외성숙에 관하여. *대한수의학회지* 32:135-142.
- 주영국, 공일근, 정미경, 강대진, 박충생. 1992. 우난포란의 체외성숙시 핵의 발달과정. *한국수정란이식학회지* 7: 125-131.