

## 배양액 및 난포액이 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

박병권 · 이규승 · 박창식 · 서길웅

충남대학교 농과대학

### Effect of Maturation Medium and Porcine Follicular Fluid on *In Vitro* Maturation of Porcine Oocytes

Park, B. K., K. S. Lee, C. S. Park and K. W. Seo

College of Agriculture, Chungnam National University

#### SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of maturation medium and porcine follicular fluid on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. The results obtained are as follows:

1. When the oocytes were cultured for 42 hours, the maturation rate was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in TCM-HEPES(75.5%) than Ham's F-10(60.9%) and mKRB(60.7%) medium. The optimal medium for the maturation of porcine oocytes *in vitro* was the TCM-HEPES medium.
2. When the oocytes were cultured for 42 hours in TCM-HEPES medium with 10, 20 and 30% of porcine follicular fluid(pFF), the maturation rates of porcine oocytes were 69.1, 65.6 and 63.3%, respectively. The maturation rate(51.4%) of oocytes cultured without pFF was significantly( $P < 0.05$ ) lower than that of oocytes cultured with pFF.
3. The maturation rates of porcine oocytes cultured for 42 hours in TCM-HEPES medium with 3 different porcine follicular fluid treatments were 68.6%(centrifused), 72.3%(filtered) and 73.1%(heat treated), respectively. The maturation rate(49.4%) of control group without pFF treatment was significantly( $P < 0.05$ ) lower than that of oocytes cultured with pFF treatment.

#### I. 서론

Pincus와 Enzman(1935)에 의하여 토끼난소의 난포에서 회수된 난포란을 생리식염수에서 배양시켰을 때 배란직전의 난포란, 즉 제2성숙분열중기(Met-II)의 상태로 성숙된다는 사실이 확인된 이래, 가축을 포함한 대부분의 다른 포유동물에서도 난소에서 회수한 난포란을 적당한 배양조건에서 배양하면 수정이 가능한 단계까지 체외성숙시킬 수 있다는 사실이 확인되었

다(Hunter와 Polge, 1966; Sato와 Ishibashi, 1977; Fagbohun과 Downs, 1990; Naito 등, 1992; Trounson, 1992; Bousquet 등, 1994; Nagai, 1994). 돼지에서는 체외성숙된 난포란의 체내수정이 Motlik과 Fulka(1976)에 의하여 보고되었고, Iritani 등(1978)이 체외수정에 성공하였다고한 보고가 최초로, 전반적으로 다른 포유동물의 경우보다 다소 늦게 체외배양에 관한 연구가 수행되었다.

일반적으로 체외의 배양액에서 난포란을 배양하는 조건에서는 체내 성숙조건인 경우에서 보다 난포란의

gap junction의 감소가 빨라지는 것으로 알려져 있는데, 그 결과 gap junction의 기능인 물질의 이동에 장애가 발생되고 그에 따라 난포란의 성숙에 불완전성을 가져오게 된다고 한다(Motlik 등, 1984). 돼지의 경우 이러한 현상을 극복하여 난포란의 정상적인 체외성숙을 유도하기 위하여 난소의 형태(Byun과 Lee, 1992) 및 난포의 크기(Leibfried와 First, 1979; Nagai 등, 1993)에 따른 미성숙난포란의 회수, 그리고 미성숙난포란의 성숙배양시간(Yoshida 등, 1989; Wang 등, 1992; Bousquet 등, 1994) 등과 같은 요인에 대하여 연구가 수행되어 왔으며, 또한 적절한 조성의 배양액 선정(Eng 등, 1986), 성선자극호르몬과 혈청의 첨가(Racowsky와 McGaughey, 1982; Leibfried 등, 1987; Naito 등, 1989) 및 성숙촉진인자의 규명(Linder 등, 1977; Channing과 Trafriri, 1978; Racowsky, 1985; Naito 등, 1992) 등으로 적정 체외성숙 배양조건을 밝혀내려고 시도하고 있다. 그러나, 돼지의 경우는 아직까지도 마우스나 래트와 같은 실험동물이나 다른 축종의 가축과는 달리 불완전한 체외성숙율이 높아서 체외수정란의 생산이 제한되고 있는 실정이다. 난포란의 불완전한 체외성숙은 체외수정시에 수정율을 저하시키는 것은 물론이고, 높은 다정자침입율을 나타내고, 더우기 자웅전핵의 형성율을 저하시킨다는 문제점을 유발한다(Nagai, 1994).

이에 본 실험은 성숙배양액 및 돼지난포액이 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 관하여 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시 난포란의 준비

실험에 공시한 난포란은 품종의 구분없이 도축 직후의 암돼지(체중 100kg 내외)로부터 적출한 난소에서 채취하였다. 도살 직후 적출한 난소를 100IU/ml의 penicillin G(Sigma, USA)와 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate(Sigma, USA)를 첨가한 30~36 $^{\circ}$ C의 멸균 생리식염수로 1~2회 세척한 다음, 동일 생리식염수에 침지하여 30분 이내에 실험실로 운반한 후, 실온(25~30 $^{\circ}$ C)에서 난소의 표면을 생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 39 $^{\circ}$ C의 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

난포란을 채취하기 위하여 18-gauge의 주사침이 장

착된 20ml 주사기로 2~5mm 직경의 포상난포를 연속적으로 찢어 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 15ml 원심분리관(Corning, USA)으로 옮겨, 온수조(39 $^{\circ}$ C)에서 5~10분간 정치시켜 난포란의 침전을 유도한 다음, 침전물만을 취하여 1.5cm 간격으로 방안을 표시한 87 $\times$ 15mm 페트리접시(petri dish)에 넣고 4mg/ml(w/v) BSA(bovine serum albumin, Fraction V, Sigma, USA)가 첨가된 PBS(phosphate buffered solution)로 희석하여 실험현미경(20~40 $\times$ )하에서 난세포질이 균일한 난포란을 난구세포의 부착상태에 따라 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

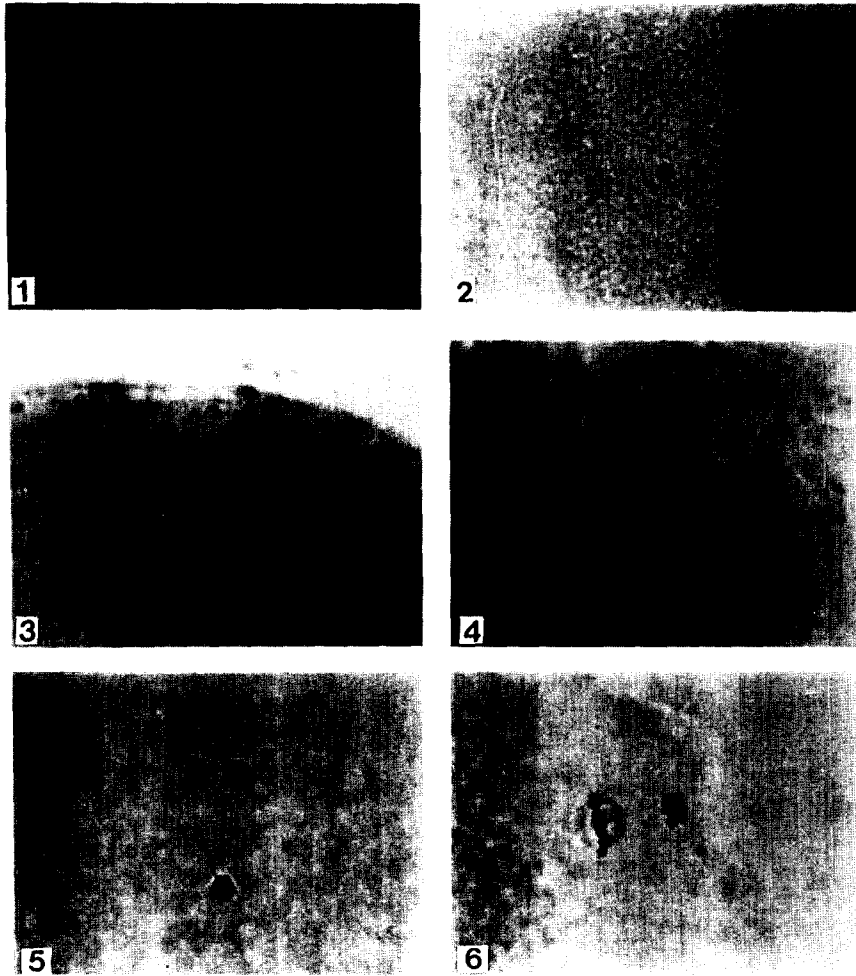
### 2. 체외성숙배양액

본 실험에서 사용된 체외성숙 배양액은 TCM-HEPES, Ham's F-10 및 mKRB 배양액을 각각 pH 7.4, 삼투압 290~300mOsmol로 조정하여 사용하였으며, 사용전에 0.22 $\mu$ m millipore filter로 여과·멸균하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도의 CO<sub>2</sub>배양기에서 10~12시간 동안 평형시킨 후 사용하였다.

### 3. 돼지난포액의 준비 및 처리

난포란의 체외성숙 배양액에 첨가하기 위한 돼지난포액(pFF)은 직경 3~6mm의 포상난포에서 난포액을 흡입한 다음, 15ml 원심분리관에 주입, 3,000 rpm에서 30분간 1차 원심분리를 실시한 후 5,000rpm에서 10분간 2차 원심분리한 처리구, 3,000rpm에서 30분간 1차 원심분리 후 0.80 $\mu$ m millipore filter로 1차 여과 및 0.22 $\mu$ m millipore filter로 2차 여과하여 사용한 처리구, 그리고 1차 원심분리(3,000rpm, 30min)한 후 0.22 $\mu$ m millipore filter로 여과·멸균한 다음, 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화처리한 처리구로 나누어 TCM-HEPES 배양액에 각각 10%(v/v) 첨가함으로써 돼지난포액의 처리방법에 따른 난포란의 성숙율에 차이를 조사하였다.

한편, 돼지난포액의 첨가 농도별 돼지난포란의 체외성숙율을 알아보기 위하여, TCM-HEPES 배양액에 3,000rpm 원심분리 및 0.22 $\mu$ m millipore filter로 여과·멸균한 난포액을 각각 0, 10, 20 및 30%(v/v) 첨가하여 난포란을 36~42시간 동안 체외성숙 배양한 후, 난자급속염색법으로 염색하여 성숙여부 및 핵성숙



**Fig. 1. Whole mount preparation of porcine follicular oocytes stained with the rapid staining method showing nuclear stages of *in vitro* maturation. (350~600×)**

**1; germinal vesicle stage, 2; prometaphase, 3; first metaphase, 4; first anaphase, 5; first telophase, 6; second metaphase.**

단계를 판정하였는데, 처리별로 작성된 각각의 난포액은 적당량 분주하여  $-40^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 사용하였다.

#### 4. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 각각의 기본배양액에 10%(v/v) FBS(Gibco, USA), 10%(v/v) pFF, 호르몬( $1\mu\text{g/ml}$  FSH, 2IU/ml hCG,  $1\mu\text{g/ml}$  estradiol-17

$\beta$ ) 및 100IU/ml의 penicillin G(Sigma, USA)와  $100\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin sulfate(Sigma, USA)를 첨가하여 4-well plastic dish (Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하고 mineral oil(Sguibb, USA)로 피복한 후, 2~3시간 동안  $39^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 95% 공기 및 100% 습도로 조절된  $\text{CO}_2$ 배양기내에서 평형시킨 후, well당 30~35개의 미성숙 난포란을 적하하여 36~42시간 동안 배양하여 성숙을 유도하였다. 체외성

숙 배양액은 pH 7.4, 삼투압을 290~300mOsmol로 조정하여 사용하였다.

### 5. 체외성숙 난포란의 염색

각각의 배양조건에서 42시간 동안 성숙배양시킨 난포란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(rapid staining method)으로 염색하여 난포란의 핵성숙단계를 비교 판정하였다. 염색방법은 먼저, 150~300IU/ml hyaluronidase(IV-S, Sigma US-A) 용액에 성숙배양이 완료된 난포란을 옮겨 1~2분간 처리한 후, 직경이 난포란의 크기와 비슷한 미세피펫으로 pipetting하여 난구세포를 완전히 제거한 다음, 5%(v/v) FBS가 함유된 PBS로 2~3회 세척하였다. 멸균 glass slide 위에 난포란 10~20개를 적하한 다음, cover slip으로 덮고, 난포란의 부피로 생긴 cover slip과 glass slide의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol=1 : 3)을 흘리는 방법으로 5~10분간 고정을 하였다. 고정이 끝난 난포란의 염색은 염색액을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(glacial acetic acid : distilled water : glycerol=1 : 3 : 1)를 흘려 난세포질 이외의 염색액을 제거시킨 다음 위상차현미경(400~1,000×)하에서 난포란의 핵성숙 단계를 판정하였다.

### 6. 통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 실험자료의 통계 처리는  $\chi^2$  검정을 실시하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 배양액에 따른 체외성숙률

돼지난포란의 체외성숙시 영향을 미치는 배양액의 요인에 대하여 알아보기로, 복합배양액인 25mM HEPES가 함유된 TCM-HEPES 및 Ham's F-10 배양액과 단순배양액인 mKRB 배양액에서 난포란을 42시간 또는 36시간 배양한 결과는 Table 1과 2와 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이, 성숙배양 42시간에 TCM-HEPES 배양액에서의 난포란 성숙율은 75.5%로서 Ham's F-10 배양액(60.9%) 및 mKRB 배양액(60.7%)보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 성적을 나타냈다. 그러나, Table 2의 배양 36시간에는 각 배양액의 난포란 성숙율이 53.5~60.2%로서 성숙율의 차이가 인정되지 않았다( $P < 0.05$ ). 하지만, Ham's F-10 배양액 및 mKRB 배양액, 특히 단순배양액인 mKRB 배양액에서의 성숙율이 시간의 경과에 따라 증가되지 않는 것(36시간 60.6%, 42시간 60.7%)으로 볼 때, TCM-HEPES 배양액이 돼지난포란의 체외성숙배양액으로 가장 적합할 것으로 사료된다.

이와 같은 결과는 돼지난포란의 체외성숙 배양액으로 TCM-199 배양액과 mKRB 배양액을 비교하였을 때 TCM-199 배양액에서 높은 성숙율을 나타냈다고 보고한 Wang 등(1992)의 결과와 일치하는 것이었다.

### 2. 난포액의 첨가에 따른 체외성숙률

체외성숙배양액에 난포액을 첨가하면 난포란의 체외성숙을 촉진하거나, 또는 억제한다는 등의 난포액 첨가효과에 대한 견해가 연구자들간에 서로 달라서 논란이 되고 있는 시점에 있어서 성숙배양액내에 난포액을 첨가했을 때 나타나는 효과에 대하여 알아보기 위

**Table 1. Maturation of porcine oocytes cultured for 42 hours in 3 different media**

Medium	No. of oocytes examined	No.(%) of nuclear stage <sup>1</sup>					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
TCM-HEPES	89	7( 7.9)	3(3.4)	7( 7.9)	1(1.1)	4(4.4)	67(75.5) <sup>a</sup>
Ham's F-10	87	9(10.5)	6(6.9)	15(17.2)	1(1.2)	2(2.3)	53(60.9) <sup>b</sup>
mKRB	89	9(10.1)	5(5.6)	16(17.9)	3(3.4)	2(2.3)	54(60.7) <sup>b</sup>

<sup>1</sup> GV : germinal vesicle stage, Pro I : first prometaphase, Met I : first metaphase, Ana I : first anaphase,

Tel I : first telophase, Met II : second metaphase.

<sup>a,b</sup> Means in the same column with the superscript are not different ( $P < 0.05$ ).

**Table 2. Maturation of porcine oocytes cultured for 36 hours in 3 different media**

Medium	No. of oocytes		No. (%) of nuclear stage <sup>1</sup>					
	examined		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
TCM-HEPES	83		13(15.7)	4(4.8)	13(15.7)	8(9.6)	5(6.0)	50(60.2) <sup>a</sup>
Ham's F-10	90		12(13.3)	4(4.5)	19(21.1)	6(6.7)	1(1.1)	48(53.3) <sup>b</sup>
mKRB	104		7( 6.7)	4(3.9)	23(22.1)	2(1.9)	5(4.8)	63(60.6) <sup>b</sup>

<sup>1</sup> GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase, Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

<sup>a,b</sup> Means in the same column with the superscript are not different (P<0.05).

하여 TCM-HEPES 배양액에 난포액을 농도 및 처리 방법별로 첨가하여 실험을 실시하였는 바, 그 결과는 Table 3, 4 및 5, 6과 같다.

Table 3과 4는 체외성숙배양액에 돼지난포액을 0, 10, 20 및 30%(v/v) 첨가하여 배양하므로써 난포란의 배양액내 난포액 첨가농도에 따른 영향을 알아보고자, 체외배양시간을 42(Table 3)시간 및 36시간(T-

able 4)으로 구분하여 조사되었는데, 이는 정상적인 제2성숙분열중기(Met- II) 도달시간에 따른 42시간째의 성숙율과 실제 수정적인 36시간째의 성숙율을 비교해서 알아보아야 할 필요성이 있다고 사료되어 각각 조사되었다.

성숙배양 42시간 후의 난포액 각 농도별 성숙율은 난포액을 처리한 모든 처리구(10, 20 및 30%)에서 대

**Table 3. Maturation of porcine oocytes cultured for 42 hours in TCM-HEPES medium with 4 different porcine follicular fluid(pFF) concentrations**

pFF concentration(%)	No. of oocytes		No. (%) of nuclear stage <sup>1</sup>					
	examined		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
0	35		5(14.3)	2(5.7)	5(14.3)	4(11.4)	1( 2.9)	18(51.4) <sup>a</sup>
10	84		8( 9.5)	2(2.4)	10( 1.9)	2( 2.4)	4( 4.8)	58(69.1) <sup>a</sup>
20	61		2( 3.3)	4(6.6)	10(16.4)	0( 0.0)	5( 8.1)	40(65.6) <sup>a</sup>
30	60		8(13.4)	1(1.7)	5( 8.3)	0( 0.0)	8(13.3)	38(63.3) <sup>a</sup>

<sup>1</sup> GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase, Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

<sup>a,b</sup> Means in the same column with the superscript are not different (P<0.05).

**Table 4. Maturation of porcine oocytes cultured for 36 hours in TCM-HEPES medium with 4 different porcine follicular fluid(pFF) concentrations**

pFF concentration(%)	No. of oocytes		No. (%) of nuclear stage <sup>1</sup>					
	examined		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
0	48		8(16.7)	2( 4.2)	20(41.4)	4( 8.2)	6(12.5)	8(16.7) <sup>a</sup>
10	62		2( 3.2)	0( 0.0)	10(16.1)	5( 8.1)	12(19.4)	33(53.1) <sup>b</sup>
20	67		4( 6.0)	9(13.3)	6( 9.0)	7(10.5)	12(17.9)	29(43.3) <sup>b</sup>
30	45		8(17.8)	5(11.1)	7(15.6)	2( 4.4)	5(11.1)	18(40.0) <sup>b</sup>

<sup>1</sup> GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase, Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

<sup>a,b</sup> Means in the same column with the superscript are not different (P<0.05).

**Table 5. Maturation of porcine oocytes cultured for 42 hours in TCM-HEPES medium with 4 different porcine follicular fluid(pFF) treatments**

pFF treatment	No. of oocytes examined	No.(%) of nuclear stage <sup>1</sup>					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
Control	81	9(11.1)	2(2.5)	23(28.4)	3(3.7)	4(4.9)	40(49.4) <sup>a</sup>
Centrifused	70	5( 7.1)	4(5.7)	8(11.4)	2(2.9)	3(4.3)	48(68.6) <sup>b</sup>
Filtered	65	5( 7.8)	1(1.5)	9(13.9)	1(1.5)	2(3.0)	47(72.3) <sup>b</sup>
Heat treated	78	10(12.8)	0(0.0)	8(10.3)	0(0.0)	3(3.9)	57(73.1) <sup>b</sup>

<sup>1</sup> GV : germinal vesicle stage, Pro I : first prometaphase, Met I : first metaphase, Ana I : first anaphase, Tel I : first telophase, Met II : second metaphase.

<sup>a,b</sup> Means in the same column with the superscript are not different (P<0.05).

**Table 6. Maturation of porcine oocytes cultured for 36 hours in TCM-HEPES medium with 4 different porcine follicular fluid(pFF) treatments**

pFF treatment	No. of oocytes examined	No.(%) of nuclear stage <sup>1</sup>					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
Control	51	3( 6.0)	2(3.9)	23(45.1)	5( 9.8)	8(15.7)	10(19.5) <sup>a</sup>
Centrifused	41	4( 8.5)	1(2.1)	12(25.5)	8(17.1)	1( 2.1)	21(44.7) <sup>b</sup>
Filtered	57	5( 8.8)	3(8.3)	9(15.8)	6(10.5)	2( 3.5)	32(56.1) <sup>b</sup>
Heat treated	57	7(12.2)	4(7.0)	12(21.1)	2( 3.5)	5( 8.8)	27(47.4) <sup>b</sup>

<sup>1</sup> GV : germinal vesicle stage, Pro I : first prometaphase, Met I : first metaphase, Ana I : first anaphase, Tel I : first telophase, Met II : second metaphase.

<sup>a,b</sup> Means in the same column with the superscript are not different (P<0.05).

조구와 유의차가 인정되지 않는 비슷한 성적(69.1, 65.6, 63.3%)을 나타냈다. 그러나 돼지난포액을 첨가하지 않은 처리구(대조구)에서는 성숙율이 51.4%로 난포액 첨가 처리구에 비하여 저조한 성적을 나타냈다. 한편, 성숙배양 36시간에서도 돼지난포액 첨가 전 처리구(40.0, 43.3, 53.1%)가 첨가하지 않은 대조구(16.7%)보다 유의성이 인정되는(P<0.05) 높은 성숙율을 나타냈다.

Table 5 및 6에서는 체외성숙배양액에 첨가하는 돼지난포액의 처리방법에 따른 영향을 알아보기 위하여 돼지난포액을 3,000rpm에서 30분간 1차 원심분리한 후, 5,000rpm에서 10분간 2차 원심분리하여 첨가한 처리구, 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 0.82 $\mu$ m 및 0.22 $\mu$ m millipore filter로 1, 2차 여과·멸균하여 첨가한 처리구 및 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 0.22 $\mu$ m millipore filter로 여과·멸균을 실시하고 비동화처리(56 $^{\circ}$ C, 30분)하여 첨가한 3 처리구로 나누

어 조사되었으며, 대조구는 난포액을 채취 후 15ml 원심분리관에 주입하여 30분 동안 정치시킨 후 상층액 10ml만을 취하여 실험에 공시하였으며, 각각의 난포액은 TCM-HEPES 배양액에 각각 10%(v/v) 첨가하였다.

난포액의 처리방법에 따른 성숙배양 42시간 후의 성숙율은 3가지 처리구 모두 대조구와 유의차가 인정되지 않는 비슷한 성적(centrifused 68.6%, filtered 72.3%, heat treated 73.1%)을 나타내므로써 성숙배양액내 첨가 돼지난포액의 처리방법에 따른 성숙율의 차이가 없었다. 이것은 돼지난포액의 비동화처리 및 여과·멸균처리가 난포액내의 난포란 체외성숙 촉진인자를 제거하지 않았음을 의미한다고 사료된다. 그러나 세척, 멸균 및 비동화처리를 하지 않은 대조구는 49.4%의 성숙율을 나타내서 처리구와 유의적인 차이를 나타냈다(P<0.05). 이와 같은 결과는 난포란의 체외성숙배양시 난포액의 첨가가 성숙율을 높이는 요

인으로 작용하였고(Naito 등, 1989; Fleming 등, 1993), 100% 난포액내에 돼지난포란을 25시간 성숙 배양하였을 때 난핵포봉괴울(GVBD)이 90%로서 난포액에 의하여 핵성숙이 촉진되었다(Sato와 Ishibashi, 1977)고 보고한 결과와 일치되었다. 그러나, 난포액이 토끼난포란의 핵성숙을 억제한다(Chang, 1955)는 보고와 돼지에서 15% 돼지 혈청이 첨가된 TCM-199과 돼지난포액을 각각 50%로 하여 난포액을 배양했을 때 난포액이 첨가되지 않은 배지에서 배양했을 때보다 성숙율이 저하되어 난포액이 결국 핵성숙 억제인자라고 한 보고(Tasfriri와 Channing, 1975)와는 상이한 결과를 나타냈다. 그렇지만, 비교적 최근 연구자의 보고에 의하면, 난포액내에 난포란의 성숙을 촉진시키는 인자인 glycosaminoglycans가 함유되어 있어 난포액은 난포란의 촉진인자라고 보고(Sato 등, 1990)하고 있다.

#### IV. 적 요

본 실험은 돼지난포란의 체외성숙에 있어서 배양액 및 배양액내에 첨가하는 돼지난포액이 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시되었다. 본 실험에서 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 체외성숙배양 42시간에 TCM-HEPES 배양액에서의 난포란 성숙율은 75.5%로서 Ham' F-10 배양액(60.9%) 및 mKRB 배양액(60.7%)보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 성적을 나타내어서 TCM-HEPES 배양액이 돼지난포란의 체외성숙 배양액으로 가장 적합한 것으로 조사되었다.
2. 성숙배양 42시간의 배양액내 첨가난포액 각 농도별 성숙율은 난포액을 처리한 모든 처리구(10, 20 및 30%)에서 대조구와 유의차가 인정되지 않는 비슷한 성적(69.1, 65.6, 63.3%)을 나타냈다. 그러나 돼지난포액을 첨가하지 않은 처리구(대조구)에서는 성숙율이 51.4%로 난포액 첨가 처리구와 유의차가( $P < 0.05$ ) 인정되는 차이를 나타냈다.
3. 난포액의 처리방법에 따른 성숙배양 42시간의 성숙율은 3가지 처리구 모두 비슷한 성적(Centrifused 68.6%, Filtered 72.3%, Heat treated 73.1%)을 나타냈다. 그러나, 대조구는 49.4%의

성숙율을 나타내서 처리구와 유의한 차이를 나타냈다( $P < 0.05$ ).

#### V. 인용문헌

1. Bousquet, D., C. Milovanov, J. C. Bell, J. Drocher and L. C. Smith. 1994. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. *Therio.*, 172. Abstr.
2. Byun, T. H. and S. H. Lee. 1992. Morphological and cellular criteria ovaries, follicles and oocytes for *in vitro* maturation in the pig. *Kor. J. Emb. Tran.*, 7:97-110.
3. Byun, T. H., S. H. Lee and H. B. Song. 1991. Development of a rapid staining method for of the oocytes from domestic animals. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
4. Chandley, A. C. 1987. Meiotic analysis in germ cells of man and the mouse. *In* 'mammalian development: a practical approach', M. Monk, ed., IRL Press Ltd., Oxford, U. K., 73-74.
5. Chang. M. C. 1955. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in fallopian tube. *J. Exp. Zool.* 128: 378-399.
6. Channing, C. P. and A. Tsafri. 1978. Regulation of ovulatory processes: Ovum maturation, follicular rupture and luteinization. *In: Advance: in fertility Regulation through Basic Research*(W. A. Sadler and S. Seagal, eds), Plenum Press, New York.
7. Chian, R. C. and M. A. Sirard. 1994. Effects of cumulus cells and hormones during *in vitro* maturation on the parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Therio.*, 186. Abstr.
8. Collins, A. R. and R. W. Wright, Jr. 1995. Effects of embryo development of heat tre-

- atment and filtration of bovine follicular fluid used to supplement IVM medium. *Abster.* 189.
9. Ding, J. and G. R. Foxcroft. 1994. Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:1377-1384.
  10. Eng, L. A., E. T. Konegay, J. Huntington and T. Wellman. 1986. Effects incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 76:657-662.
  11. Fagbohun, C. F. and S. M. Downs. 1990. Maturation of the mouse oocyte cumulus complex: stimulation by lectins. *Biol. Reprod.*, 42:413-423.
  12. Fenton, S. E., M. R. Dentine and R. L. Ax. 1993. Modulation of bovine oocyte-cumulus cell complex maturation and fertilization *in vitro* by glycosaminoglycans. *J. Dairy Sci.*, 76:701-712.
  13. Flemming, A. D., W. Khalil and D. T. Armstrong. 1993. Porcine follicular fluid does not inhibit maturation of rat oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 69:665-670.
  14. Hunter, R. H. and C. Polge. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fert.*, 12:525-531.
  15. Iritani, A., K. Niwa and H. Imai. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:394-384.
  16. Ishibashi, I., M. Takeda, K. Takagishi and K. Naito. 1992. Effects of porcine follicular fluid added to the maturation medium on fertilization and development into the two-cell stage of rat follicular oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Develop.*, 38:229-223.
  17. Leibfried, L. and N. L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
  18. Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Crister, W. H. Eytone, D. L. Northey and N. L. first. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* 36:376-383.
  19. Linder, G. M. and R. W. Wright, Jr. 1978. Morphological and quantitative aspects of the development of swine embryos *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46:711-717.
  20. Moor, R. M. and A. O. Trounson. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent development capacity. *J. Reprod. Fertil.* 49:101-109.
  21. Motilik, J. and J. Fulka. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 198:155-162.
  22. Motlik, J., N. Grozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.* 72:323-328.
  23. Nagai, T., J. Ding and R. M. Moor. 1993. Effects of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. *J. Exp. Zool.*, 266:146-151.
  24. Nagai, T. 1994. Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Therio.*, 41:73-78.
  25. Naito, K., F. P. Dean and Y. Toyoda. 1992. Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of pig oocytes matured in different media *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 47:43-47.
  26. Naito, K., Y. Fukuda and I. Ishibashi. 1989. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid in *in vitro* and fertilized *in vitro*. *Theriogenology.* 31:1049-1057.
  27. Pincus, G. and E. V. Enzmann. 1935. The



- comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. J. Exp. Med., 62: 655-657.
28. Racowsky, C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. J. Reprod. Fert., 74:9-24.
  29. Racowsky, C. and R. W. McGaughey. 1982. Further studies of the effects of follicular fluid and membrane granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocytes. J. Reprod. Fert., 66:505-512.
  30. Sato, E. and T. Ishibashi. 1977. Meiotic arresting action of the substance obtained from cell surface of porcine ovarian granulosa cells. Jpn. J. Zootech. Sci., 48(1):22-26.
  31. Sato, E., H. Miyamoto and S. S. Koide. 1990. Glycosaminoglycans in porcine follicular fluid promoting viability of oocytes in culture. Mol. Reprod. Dev., 26:391-397.
  32. Tasfriri, A. and C. P. Channing. 1975. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes *in vitro*. J. Repröd. Fert., 43:149-152.
  33. Trounson, A. 1992. The production of ruminant embryos *in vitro*. Anim. Reprod. Sci. 28:125-137.
  34. Wang, Z. K., P. H. Wei, J. Z. Wang, C. Lei and M. Q. Kou. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. Therio., 37:733-739.
  35. Yoo, H. J., S. C. Choi and S. H. Lee. 1993. Nuclear maturation and pronuclei formation in bovine oocytes matured *in vitro* for prolonged period. Kor. J. Anim. Sci., 17:331-337.
  36. Yosida, M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vivo*. Jpn. J. Anim. Reprod., 35:34-37.
  37. Yoshida, M., K. Ishigaki and V. G. Pursel. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. & Develop., 31:68-71.