

## FBS, CS 및 HS가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향

임정훈 · 한만희 · 서길용

충남대학교 농과대학 동물자원학부

### Effects of Fetal Bovine Serum(FBS), Calf Serum(CS) and Human Serum (HS) on *In Vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes

Lim, J. H., M. H. Han and K. W. Seo

Division of Animal Science and Resources,  
College of Agriculture, Chungnam National University

#### SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of fetal bovine serum(FBS), calf serum (CS) and human serum(HS) on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. The results obtained were summarized as follows :

1. The maturation rates of oocytes cultured in medium containing FBS 5, 10, 20 and 30% were 47.0, 63.5, 48.4 and 43.2%, respectively. There were significantly higher than those of non-treated group(25.3%). And the highest maturation rate was the 10% treatment.
2. The maturation rates of oocytes cultured in medium containing CS 5, 10, 20 and 30% were 55.2, 56.6, 59.4 and 46.5%, respectively. There were significantly higher than those of non-treated group(25.3%). And the highest maturation rate was the 20% treatment.
3. The maturation rates of oocytes cultured in medium containing HS 5, 10, 20 and 30% were 74.5, 78.2, 73.1 and 68.6%, respectively. There were significantly higher than those of non-treated group(29.6%). And the highest maturation rate was the 10% treatment.

(Key words : Porcine follicular oocyte, *In vitro* Maturation(IVM), FBS, CS, HS).

#### I. 서 론

포유동물난자의 체외성숙에 관한 연구는 Pincus와 Enzman(1935)이 토끼의 미성숙 난포란을 채취하여 체외배양하면 체내에서 일어나는 일련의 핵성숙과정이 자발적으로 일어난다는 것을 최초로 보고한 이래, 최근 수정란 이식, 난자 및 수정란의 동결보존, 수정란의 성판별, 핵이식을 통한 복제동물의 작출, 유전자 이식을 통한 유용한 생리활성물질을 생산해 내기 위한 복합개체의 작출 등과 같은 가축번식학 분야의 첨단기술을 연구하기 위해서는 우선적으로 다수의 수정

란을 확보하는 것이 필수적이다. 따라서 이를 해결하는 하나의 수단으로서 가축의 난소내에 다량 존재하는 미성숙난포란을 채취하여 체외에서 성숙배양하여 수정시킴으로서 다량의 수정란을 얻고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

돼지에 있어 미성숙난포란의 체외성숙은 1965년 Edwards에 의하여 체외에서 43~46시간 동안 체외배양함으로써 제1성숙분열 전기(prophase I)의 이중기(diplotene)에 멈추어 있던 난자의 핵이 성숙분열을 재개하여 제2성숙분열중기(metaphase II)에 도달한다는 것이 처음으로 보고된 이래 여러 연구자에 의하여 돼지난포란의 체외성숙율을 높이려는 연구가 다각

적으로 수행하여 왔다. 즉, 난소의 형태(Motlick 등, 1984; Byun과 Lee, 1992) 및 난포의 크기(Leibfried와 First, 1979; Nagai 등, 1993), 그리고 성숙배양시간(Yoshida 등, 1989; Wang 등, 1992; Bousquet, 1994; 이 등, 1994) 등과 같은 요인에 의한 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 대하여 연구가 수행되어 왔으며, 적절한 배양액 선정(Eng 등, 1986; 정 등, 1993), 성선자극호르몬과 혈청의 첨가(Linder 등, 1974; Channing 등, 1978; Racowsky, 1985; Naito와 Toyoda 등, 1992) 등으로 적절한 체외성숙배양조건을 구명하려는 연구가 수행되어져 왔다.

그러나 난포란을 체외에서 성숙시켜 이용하는 연구에 있어서 소의 경우는 현재까지 다수의 산자 생산이 보고되어 어느 정도 기술체계가 확립되었다고 볼 수 있으나, 돼지의 경우에는 난포란이 체외성숙시간이 다른 가축에 비하여 길고, 체외(*in vitro*) 성숙시에는 체내(*in vivo*) 성숙시보다 난구세포와 난포란의 미세음모로 연결되어 있는 수가 적고, 쉽게 분리되어 gap junction의 감소가 빨라져 물질이동에 장애가 발생(Motlick 등, 1984)하고 성숙시 일어나는 난세포질내의 세포내소기관들의 재배열이 불완전하고 난세포질내에 glutathione과 같은 물질의 합성에 장애를 초래(Funahashi 등, 1995)하여 성숙시간이 길어지고 수정시 다정자침입율이 높아지며, 정자 두부의 팽화, 용성전핵(male pronucleus)형성을 감소 및 4-세포기에서 체외발생능 정지현상(*in vitro* cell block)을 초래하는 등 결과적으로 체외수정란생산 및 산자생산이 극히 제한되고 있는 실정이다(Ball, 1983; Racowsky, 1991).

따라서 본 실험은 성숙배양액에 여러 가지 혈청 즉, FBS, CS 및 HS가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 관하여 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시 난포란의 채취

난포란의 채취를 위한 난소는 도축직후의 암돼지(체중 120kg 내외)로부터 적출하여 100IU/ml의 penicillin G(Sigma, U.S.A.)와 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate(Sigma, U.S.A.)를 첨가한 35~37 $^{\circ}$ C의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 1회 세척하고, 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분

이내에 실험실로 운반한 후, 39 $^{\circ}$ C의 신선 멸균생리식염수로 난소표면을 2~3회 세척하여 혈액 등 이물질을 제거한 다음, 39 $^{\circ}$ C의 온수조에 보관하면서 실험에 공시하였다. 난포란의 채취를 위하여 18-gauge의 주사침이 장착된 10ml 주사기로 직경 2~5mm의 포상난포를 연속적으로 찢어 난포액과 함께 난포란을 흡인하였으며, 이것을 15ml 원심분리관으로 옮겨, 39 $^{\circ}$ C의 온수조에서 5~10분간 정치시켜 난포란의 침전을 유도하였다. 다음에 침전물만을 취하여 1.5cm 간격으로 방안이 표시된 87 $\times$ 15mm 페트리접시(petri dish)에 넣고, 4mg/ml(w/v) BSA(bovine serum albumin, Fraction V, Sigma, U.S.A.)가 첨가된 PBS와 희석하여 실제현미경(20~40 $\times$ )하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 부착되고 난세포질이 균일한 난포란을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

### 2. 체외성숙배양액

본 실험에서 사용된 체외성숙 배양액은 TCM-HEPES(Sigma, U.S.A.)를 기본배양액으로 하여 0.6mM cysteine, 0.2mM Na-pyruvate, 1mg/ml FSH, 2IU/ml hCG, 100IU/ml penicillin G 및 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가하여 pH 7.4, 삼투압 290~300 mOsmol/kg으로 조정하여 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. 혈청의 처리

FBS(Gibco 16000-044), CS(Sigma C6278) 및 HS(Sigma H1388)를 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화처리한 후 0.22 $\mu$ m Milipore filter(MFS, U.S.A)로 여과·멸균하여 3~5ml씩 분주한 다음 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에 냉동 보관하였다. FBS, CS 및 HS의 농도에 따른 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배양액에 각각의 혈청을 0, 5, 10, 20 및 30% 첨가하였다.

### 4. 난포란의 체외성숙배양

난포란의 체외성숙은 처리구별로 계획된 조성을 가진 배양액을 4-well plastic dish (Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하여, 2~3시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>,

95% 공기 및 100%습도로 조절된 CO<sub>2</sub>배양기내에서 평형시킨 후, 채취된 난포란을 체외성숙용 배양액으로 3차례 세척한 다음, well당 40~50개의 미성숙 난포란을 적하하여 42시간 동안 배양하여 성숙을 유도하였다.

### 5. 체외성숙 난포란의 염색 및 성숙판정

각각의 배양조건에서 42시간 동안 성숙배양시킨 난포란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로 염색하여 난포란의 핵성숙단계를 판정하였다. 염색방법은 먼저 0.3%의 hyaluronidase(IV-S, Sigma U.S.A.) 용액에 성숙배양이 완료된 난포란을 옮겨 1~2분간 처리한 후, 직경이 난포란의 크기와 비슷한 미세피펫으로 pipetting하여 난구세포를 완전히 제거한 다음, 5%(v/v)의 FBS가 함유된 PBS로 2~3회 세척하였다. 멸균 slide glass위에 난포란 10~20개를 적하한 다음, cover slip과 slide glass의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol = 1 : 3)을 흘리는 방법으로 5~10분간 고정하였다. 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×)으로 난포란의 핵성숙 단계를 검경하였으며, 핵성숙단계의 판정은 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 실시하였다.

### 6. 통계분석

본 연구에서 얻어진 모든 실험자료의 통계처리는 SAS Package를 사용하여 2요인실험 또는 2<sup>3</sup>요인실험으로 분산분석하여 처리의 효과를 비교하였다.

## III. 결과 및 고찰

FBS, CS 및 HS 각각의 혈청을 단독첨가하여 돼지 난포란의 체외성숙에 적당한 농도와 가장 효과적인 혈청을 구명하기 위하여 각 혈청을 농도별로 첨가한 TCM-HEPES배양액에서 42시간동안 배양하여 얻어진 결과는 Table 1, 2, 3 및 Fig. 1과 같다. FBS를 5, 10, 20 및 30% 첨가했을 때의 성숙율은 47.0, 63.5, 48.4 및 43.2%로서 첨가하지 않은 대조군 25.3%에 비하여 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈으며, 10%에서 가장 높은 성숙율을 나타냈다. CS를 5, 10, 20 및 30% 첨가했을 때의 성숙율은 55.2, 56.6, 59.4 및 46.5%로서 대조군 25.3%에 비하여 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈으며, 5~20%에서 높은 성숙율을 나타냈다. HS를 5, 10, 20 및 30% 첨가했을 때의 성숙율은 74.5, 78.2, 73.1 및 68.6%로서 대조군 29.6%에 비하여 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈으며, 5~20%에서 높은 성숙율을 나타냈다. 또한, 혈청별 성숙율은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 FBS 및 CS에 비하여 HS가 유의성이 인정되는 높은 성숙율을 보였다(p<0.05).

이와 같은 결과는 Leibfried-Rutlege 등(1986)이 소의 미성숙난포란을 mTALP 배양액에서 비동화처

**Table 1. Effect of fetal bovine serum(FBS) concentrations on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes**

Concentration of FBS(%)	No. of oocytes examined	No.(%) of nuclear stage <sup>1</sup>					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
0	79	42(53.2)	1(1.3)	15(19.0)	1(1.3)	—	20(25.3) <sup>c</sup>
5	83	19(22.9)	5(6.0)	19(22.9)	—	1(1.2)	39(47.0) <sup>b</sup>
10	96	29(30.2)	1(1.0)	15(15.6)	—	1(1.0)	61(63.5) <sup>a</sup>
20	91	26(28.6)	—	19(20.9)	1(1.1)	1(1.1)	44(48.4) <sup>b</sup>
30	74	20(27.0)	1(1.4)	21(28.4)	—	—	32(43.2) <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>abc</sup> Means in the same column with different superscripts differ significantly(p<0.05).

**Table 2. Effect of calf serum(CS) concentrations on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes**

Concentration of CS(%)	No. of oocytes examined	No. (%) of nuclear stage <sup>1</sup>					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
0	75	40(53.3)	2(2.7)	14(18.7)	—	—	19(25.3) <sup>c</sup>
5	58	12(20.7)	—	12(20.7)	2(3.5)	—	32(55.2) <sup>a</sup>
10	83	10(12.0)	3(3.6)	19(22.9)	2(2.4)	2(2.4)	47(56.6) <sup>a</sup>
20	69	14(20.3)	2(2.9)	12(17.4)	—	—	41(59.4) <sup>a</sup>
30	43	5(11.6)	1(2.3)	15(34.9)	1(2.3)	1(2.3)	20(46.5) <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.

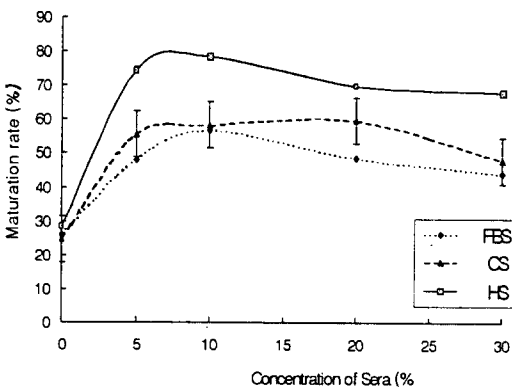
<sup>abc</sup> Means in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

**Table 3. Effect of human serum(HS) concentrations on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes**

Concentration of HS(%)	No. of oocytes examined	No. (%) of nuclear stage <sup>1</sup>					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
0	54	27(50.0)	1(1.9)	10(18.5)	—	—	16(29.6) <sup>c</sup>
5	51	—	—	13(25.5)	—	—	38(74.5) <sup>a</sup>
10	87	6(6.9)	—	13(14.9)	—	1(1.2)	68(78.2) <sup>a</sup>
20	52	3(5.8)	1(1.9)	10(19.2)	1(1.9)	—	37(73.1) <sup>ab</sup>
30	51	6(11.8)	—	9(17.7)	—	1(2.0)	35(68.6) <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>abc</sup> Means in the same column with different superscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 1. Effects of fetal bovine serum(FBS), calf serum(CS) and human serum(HS) Concentrations on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes.**

소의 미성숙난포란을 mTALP 배양액에서 비동화처리한 FCS를 0.1, 1.0, 5.0 및 10%를 각각 첨가하여 성숙을 유도하였을 때 33, 66, 65 및 67%의 성숙율을 나타내 FCS의 첨가농도가 높을수록 높은 성숙율을 보이며 10% 첨가할 경우 가장 높은 체외성숙율을 나타냈다는 보고와 돼지 난자의 체외성숙에 있어서 TCM-199 배양액내에 FCS를 첨가하여 돼지 난자성숙율을 증가시켰다는 보고(Nagai 등, 1988; Matioli, 1988), Kim 등(1990)이 직경 3~7mm의 난포에서 채취한 돼지 난포란만을 15%FCS가 첨가된 mKRB 용액에서 배양했을 때 제2성숙분열중기(M II) 도달율이 56.1%라고 한 보고 및 가 등(1995)이 돼지 난포란을 TCM-HEPES배양액에 10%의 FBS를 첨가하여 42~44시간 배양하였을 때 65.8%의 성숙율을 보고한 결과와 일치되는 결과였으며, 정 등(1991)이 TCM-HEPES배양액에 10%FBS를 첨가하여 돼지 난포란

을 42시간 배양하였을 때 84.6%의 성숙율을 보고한 결과보다는 다소 낮은 결과였다. 한편, mKRB용액에 FCS를 첨가하여 돼지난자의 체외성숙을 유도하였을 때 돼지난자의 성숙을 오히려 억제된다는 보고(Naito 등, 1988)와는 일치하지 않은 결과였다.

돼지 미성숙 난포란을 체외성숙시키기 위하여 배양액 내에 CS를 첨가하여 배양한 실험 결과는 현재까지 보고된 바가 없으나, Cartwright 와 Shah(1994)가 FBS 와 CS의 성분분석결과 상이한 점이 없는 것으로 보고하였으나, 본 실험에서는 10%의 FBS 첨가구를 제외하고 CS 첨가구에서 높은 체외성숙율을 나타낸 것으로 조사되어 CS의 첨가가 난포란의 성숙에 미치는 연구는 앞으로 더 연구조사가 필요할 것으로 사료된다.

HS에 관한 연구보고는 Eppig와 Schroeder(1986)가 마우스(mouse)의 체외성숙배양액에 HS와 fetal cord serum을 첨가하여 배양했을 때, HS를 첨가하여 배양한 처리구가 투명대경화현상(zona hardening)을 현저히 방지하며, 또한 수정율에 있어서도 51%로서 2%의 fetal cord serum첨가구 보다 높은 수정율을 보고하였으나, 돼지의 난포란에 관한 실험은 보고된 바 없다. 그러나 본 실험에서 FBS와 CS보다 전반적으로 높은 성숙율을 나타내 이에 대한 연구도 수정율 및 배발달율과 연계해서 체계적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

각종 혈청이 난포란의 성숙에 미치는 영향은 혈청내에 1~100ng/ml의 각종 성장인자(EGF, PDGF, IGF, FGF, insulin 등), 1~10 $\mu$ g/ml의 Fibronectin, 0.01 $\mu$ M의 selenium 및 albumin 등이 함유되어 있어 배양액의 pH, 금속이온, 단백질해작용 및 여러 가지 독성물질에 대하여 완충역할(Cartwright와 Shah, 1994)을 수행하므로써 난자와 난구세포가 분해되지 않도록 유지시켜 주고, 성숙시 필요한 각종 영양소, 호르몬, 성장인자 등의 난자로의 전이를 촉진시켜 주어 결과적으로 성숙율을 높여주는 역할을 수행한다고 보고되었다.

#### IV. 적 요

본 연구는 FBS, CS 및 HS의 첨가가 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실시하였

는 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. FBS를 5, 10, 20 및 30% 첨가했을 때의 성숙율은 47.0, 63.5, 48.4 및 43.2%로서 무첨가 대조구 25.3%에 비하여 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈으며, 10%첨가구에서 가장 높은 성숙율을 나타냈다.
2. CS를 5, 10, 20 및 30% 첨가했을 때의 성숙율은 55.2, 56.6, 59.4 및 46.5%로서 대조구 25.3%에 비하여 유의적으로 높은 성적을 나타냈으며, 20%첨가구에서 가장 높은 성숙율을 나타냈다.
3. HS를 5, 10, 20 및 30% 첨가했을 때의 성숙율은 74.5, 78.2, 73.1 및 68.6%로서 대조구 29.6%에 비하여 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈으며, 10%첨가구에서 가장 높은 성숙율을 나타냈다.

#### V. 인용문헌

1. Ball, G. D., M. L. Leibfrid, R. W. Lenz, R. L. Ax, B. D. Bavister, and N. L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28:717-725.
2. 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. Theriogenology, 172. Abstr.
3. Buyn, 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. 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.
5. Cartwright, T. and G. P. Shah. 1994. Culture media : Basic cell culture a practical approach. IRL Press, pp57-91.
6. Channing, C. P. and Tsafiriri. 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), Plenum Press, New York.
7. Edwards, R. G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
  8. Eng, L. A., E. T. Konegay, J. Huntinton and T. Wellman, 1986. Effects incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 76: 657-662.
  9. Eppig, J. J. and A. C. Schroeder, 1986. Culture systems for mammalian oocytes development : Progress and prospects. *Teriogenology* 25:97-106.
  10. Funahashi H, and Day B. N. 1993. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 98:177-185.
  11. Funahashi, H., T. T. Stumpf, T. C. Cantley, N. H. Kim and B. N. Day. 1995. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro*-matured porcine oocytes following *in vitro* fertilization and /or electrical activation. *Zygotes* 3:273-281
  12. Funshashi H., Cantley T. and Day B. N. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 101:159-165.
  13. Hunter, R. H. F. and C. Polge. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotropin. *J. Reprod. Fert.*, 12:525-531
  14. Leibfried, L. and N. L. First. 1979. Chacterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86
  15. Leibfried-Rutledge M. L., Critser E. S. and First N. L. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus oocyte complexes. *Biol. Reprod.*, 35:850-857.
  16. Linder, G. M. and R. W. Right, Jr. 1978. Morphological and quantitative aspects of the development of swine embryos *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46:711-717
  17. Mattioli M., G. Galeati and E. Seren. 1988. Effect of follicle somatic cells duration pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res.*, 20:177-183.
  18. Mattioli M., Galeati G., Bacci M. L. and BarboniB. 1991. Changes in maturation promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:119-125.
  19. Motilik, J., N. Grozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:323-328.
  20. 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. Zoo.*, 266:146-151.
  21. Naito K., Fukuda Y. and Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete Res.*, 21:289-295.
  22. Pincus, G. and E. V. Enzmann. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro* : I. The activation of mammalian eggs. *J. Exp. Med.*, 62:665-675.
  23. 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
  24. Racowsky C. 1991. Gamete resources: Origin and production of oocytes. In R. A. Pedersen, A. McLaren, N. First(eds) : "Animal

- Application of Research in Mammalian Development." Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, PP 22-82.
25. Wang, Z. K., P. H. Wei, J. Z. Wang, C. Lei and M. Q. Kou. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 37:733-739.
  26. Yoshida M., Y. Isigaki, H. Kawagishi, K. Bamba and Y. Kojima. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. J. Reprod. Fert., 95:481-488.
  27. 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., 35:34-37.
  28. 가학현, 정구민, 한정호, 임경순. 1995. Gel filtration에 의해 분획한 소 태아혈청과 돼지 난포액이 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 효과. 한국가축번식학회지 19(4):251-258.
  29. 김창근, 정영채, 이명식, 윤종택, 방명정, 정길생. 1990. 돼지 난포란의 최외성숙에 관한 연구. 한국가축번식학회지 14(1):84-91.
  30. 이장희, 김창근, 정영채. 1994. 돼지 난포란의 체외성숙시 성선자극호르몬의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 배발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 9(1):85-93.
  31. 정형민. 1993. 형질전환동물의 생산을 위한 돼지 난포란의 체외발생에 관한 연구. 건국대학교 박사학위논문. pp. 13-23.
- (접수일자 : 1997. 11. 16 / 채택일자 : 1997. 12. 5)