

## 소 미성숙 난포란의 체외성숙

문승주<sup>†</sup> · 김은국 · 김광현 · 선상수 · 명규호 · 김재홍  
전남대학교 농과대학 동물자원학부

### *In Vitro* Maturation of Bovine Follicular Oocytes

S. J. Moon<sup>†</sup>, E. K. Kim, K. H. Kim, S. S. Sun, K. H. Myung and J. H. Kim

Department of Animal Science, Chonnam National University, 500-757, Republic of Korea

### SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of hormones, protein sources and anti-oxidants on *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) of bovine follicular oocytes.

The rates of Holstein follicular oocytes classified as grade A and B (50.2% and 33.2%) were higher than those of Hanwoo cattle (40.3% and 32.0%,  $P < 0.05$ ). The cumulus cell expansion rates of oocytes cultured in TCM-199 and Ham's F-10 medium supplemented with 10% FCS and hormones were higher (81.9~87.6%) than those of non-treated groups (74.5~81.7%). The fertilization rates of oocytes cultured in TCM-199 and Ham's F-10 medium supplemented with 10% FCS, 1% BSA and 10% bPF was 53.8~55.0%, 51.4~52.6%, and 47.0~50.0%, respectively. The polyspermy rates was 13.6~14.2%, 10.0~11.1%, and 10.0%, respectively.

When the oocytes were cultured in TCM-199 and Ham's F-10 medium with 50  $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol, the fertilization rates was 62.0 and 60.2%, respectively. In the maturation medium added of 100  $\mu$ M cysteamine, the fertilization rates was 64.7 and 66.7%, respectively. The fertilization and polyspermy rates of treated groups were higher than those of non-treated group.

The results show that hormones, protein sources and anti-oxidants can provide a benefit for *in vitro* maturation and fertilization of bovine follicular oocytes.

(Key words : IVM, IVF, hormone, protein source, polyspermy, anti-oxidants)

### 서 론

포유동물 미성숙 난포란의 체외배양시 체내에서 일어나는 일련의 핵성숙 과정이 일어난다는 최초 보고(Pincus와 Enzman, 1935) 이후, 난소의 형태(Mo-

tlick 등, 1984; Byun 과 Lee, 1992)와 난포의 크기 (Leibfried와 First, 1979; Nagai 등, 1993) 및 성숙 배양시간(Yoshida와 Kojima, 1989; Wang 등, 1992; Bousquet, 1994) 등이 미성숙 난포란의 체외 성숙에 미치는 영향에 관한 연구, 배양액의 종류 (Eng 등, 1986), 배양액내 성선자극 호르몬과 혈청

본 연구는 1995년 농림부 첨단기술과제 연구비에 의하여 연구되었음.

<sup>†</sup> Correspondence

의 첨가(Channing과 Tasfriri, 1978; Racowsky, 1985; Naito와 Toyoda 등, 1992) 등 적절한 체외성숙 배양조건을 구명하려는 연구가 수행되어 왔다.

그러나 체외성숙 유기시 난구세포와 난포란이 미세음모로 연결되어 있는 수가 적고, 쉽게 분리되어 gap junction의 감소가 빨라지기 때문에 물질이동에 장애가 발생(Motlick 등, 1984)하고, 성숙 시 일어나는 난 세포질 내에 glutathione과 같은 물질의 합성에 장애를 초래(Funahashi 등, 1995)하여 성숙 시간이 길어지고 수정시 다정자 침입율이 높아지며, 응성전핵(male pronucleus)형성율의 감소 및 체외발생 정지현상(*in vitro* cell block)을 초래하는 등 결과적으로 체외수정란 생산 및 산자생산이 극히 제한되고 있는 실정이다(Ball, 1983; Racowsky, 1991). 이러한 체외 성숙난자의 배발생이 저조한 것은 난포란의 핵 성숙 및 세포질 성숙이 체내상태에서의 성숙과 같이 정상적으로 일어나지 않을 뿐 아니라 수정 및 배발생의 조건이 적합하지 않은데 있으며(Sanbuissho와 Threlfall, 1989; Iwasaki와 Nakahara, 1990), 체외배양시 핵 성숙은 정상적으로 일어나 제 2성숙분열 증기에 도달하나, 세포질 성숙이 정상적으로 일어나지 않아 그 후의 수정 및 배 발생에 영향을 미치기 때문(Schellander 등, 1990)이라고 여겨지고 있다.

따라서 본 연구는 배양액내 hormone, 단백질원 및 항산화제 첨가가 한우 미성숙 난포란의 체외성숙과 체외수정율 및 다정자 침입율에 미치는 영향을 비교·조사하여, 한우 체외수정란의 효율적 생산을 위한 자료를 제시하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 난자의 채취

본 실험에 사용된 난소는 도살 직후 한우 암소에서 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin sulfate(100 µg/ml)가 함유된 생리식염수(30~36°C)에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 미성숙 난포란은 항생제가 첨가된 신선한 생리식염수로 난소 표면을 3~4회 세척한 후 18 gauge의 주사침이 부착된 10cc disposable syringe로 난소의 실질을 통과하지 않고 난소 표면을 조심스럽

게 이동하면서 난포의 크기가 3~6 mm인 난포에서 난포액과 함께 난포란을 흡입·채취하였다. 흡입된 난포액을 80 mm petri dish에 담아 약 5~10분간 정지한 뒤 실체 현미경 하에서 pasteur pipette을 사용하여 채취하였으며, 채취한 난포란은 3~4회 세척(TCM-199+10% FCS)하고, 난구세포 층과 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등(1991)의 방법에 따라 선별·채취하였다. 즉, 실체현미경 하에서 4~5층으로 난구세포 층이 충만하고 균일한 세포질을 가지며 전체적으로 밝은 갈색을 띤 것을 등급 A, 2~3층의 난구세포 층을 가지며 전체적으로 다소 어두운 것을 등급 B, 부분적으로 나뉘었으며 전체적으로 어두운 것을 등급 C, 난구세포층이 사방으로 퍼져 있으며 난세포질이 균일하지 않은 것을 등급 D로 구분하였으며, 등급 A와 B에 해당하는 난포란만을 실험에 공시하였다(Funahashi와 Day, 1993).

## 2. 배양액

### 1) 체외성숙 배양액

체외성숙 배양액은 TCM-199과 Ham's F-10 배양액에 streptomycin(100 µg/ml), penicillin G(100 units/ml)와 hormone(10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml HCG), 단백질원(10% FCS, 1% BSA, 10% bFF) 및 항산화제( $\alpha$ -tocopherol 5.0 µM, cysteamine 100 µM)를 첨가하여 사용하였다.

### 2) 정자의 수정능 획득 및 체외수정 배양액

B.O. medium에 10 mM의 caffeine(Sigma, U.S.A)을 첨가하여 정자 세척용 B.O. medium을 제조하였고, B.O. medium에 5 mM의 caffeine 및 0.5% bovine serum albumin(BSA, Sigma)과 heparin(10 µl/ml)을 첨가하여 정자의 수정능 획득 및 성숙난자의 체외수정용 B.O. medium을 제조하였으며, 0.22 µm syringe filter로 여과하고 15 ml cap tube(Falcon, England)에 분주하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 배양기 내에서 20시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

## 3. 난포란의 체외성숙

미성숙 난포란의 체외성숙은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 TCM-199과 Ham's F-10 배양액에 hormone(10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml HCG)과 FCS(10%)가 첨가된 체외성숙 배양액을 60 mm petri-dish (Nunc, Denmark)에 분주하여 배양기 내에서 20시간 이상 전배양을 하여 평형을 실시한 후 여기에 난구세포와 세포질의 충실도가 좋은 난포란 만을 옮겨 체외성숙을 유도하였다. 체외 성숙도는 난구세포의 팽창과 세포질의 충실도 등으로 판정하였다.

#### 4. 체외수정

축협 한우 개량본부 한우 개량부에서 생산된 한우 동결정액을 액체질소탱크에서 꺼내 공기 중에서 약 5초간 방치하고 38 °C의 water bath에서 30초간 용해시킨 후 10 mM caffeine이 첨가된 B.O. 배양액이 담겨져 있는 15 ml 시험관에 혼합하여 희석한 다음 500 × g 으로 5분간 2~3회 원심분리한 후, 정자 pellet을 5 mM caffeine과 0.5% BSA, 10 µg/ml heparin이 첨가된 B.O. 배양액으로 재부유하였다. 그 후 정자의 최종 농도가 1×10<sup>6</sup> 정자/ml가 되게 조정하여 체외수정에 대비하였다.

정자를 함유한 체외수정 배양액 200 µl의 소적을 60 mm petri-dish(Nunc)에 만든 후 mineral oil (Sigma)로 피복하고 체외성숙된 난자를 체외수정용 B.O.배양액으로 2~3회 세척한 후 정자 소적 당 45~50 개씩 옮겨 6시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 체외수정을 유도하였다.

#### 5. 난자의 고정

체외수정 후 6시간 후에 체외배양액에 옮긴 후 다시 6시간 동안 체외배양시킨 수정란을 acetic acid와 ethylalcohol을 3:1로 혼합한 용액에 48시간 이상 고정시킨 후 1% orcein과 45% acetic acid로 염색하여 위상차 현미경 하에서 난자의 수정율과 다정자 침입율을 조사하였다. 난자 내 정자 또는 융성전핵이 관찰되면 정자의 침입이 이루어졌다고 판단하고, 한 개 이상의 정자와 융성전핵이 관찰되면 다정자 침입으로 간주하였다(Nagai 등, 1984; Kano 등, 1994).

#### 6. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS(statistical analysis system)를 이용한 chi-square test에 의해서 분석하였고, P<0.05 일 때 유의하다고 판정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 한우와 Holstein 종 암소의 미성숙 난포란의 등급 비교

한우와 Holstein 종 암소의 미성숙 난포란의 등급을 비교하기 위해서 도축장에서 난소를 채취하여 실험실로 운반한 후 난소표면을 36°C 생리식염수로 3~4 회 깨끗이 세척하여 채취한 난포란의 등급 비교 결과는 Table 1과 같다.

Holstein의 경우, 총 229개의 미성숙 난포란 중 A등급의 난포란은 115개(50.2%), B등급 76개(33.2%), C등급 30개(13.1%), D등급 8개(3.5%)였고 한우의 경우는 176개 중 A 등급 71개(40.3%), B등급 56개(32.0%), C등급 32개(18.2%), D등급 17개

Table 1. Quality of follicular oocytes classified by cumulus cells

Breed	No. of oocytes	Oocyte quality(%)			
		A	B	C	D
Holstein	229	115(50.2) <sup>a</sup>	76(33.2) <sup>a</sup>	30(13.1) <sup>a</sup>	8(3.5) <sup>a</sup>
Hanwoo*	176	71(40.3) <sup>b</sup>	56(32.0) <sup>a</sup>	32(18.2) <sup>b</sup>	17(9.7) <sup>b</sup>

\* Hanwoo : Korean native cattle.

A: grade A(Oocytes with compact and dense cumulus cells)

B: grade B(Partially naked oocytes with thin cumulus layer)

C: grade C(Incompletely attached zona pellucida)

D: grade D(Oocytes with foggy cumulus cells)

<sup>a,b</sup> Different superscripts within column denote significant differences(P<0.05).

(9.7%)로 A, B등급이 홀스타인종에서 83.4%, 한우에서 72.3%로 홀스타인종이 유의적으로 높았다 ( $P < 0.05$ ).

이러한 결과는 난구세포층의 부착유무와 성장에 따라 분류하는 花田(1985)의 방법에 준하여 구분하였을 때 A, B, C, D 등급의 난자 비율이 각각 57.2%, 9.6%, 25.7% 및 7.5%를 보였다고 보고한 花田(1985)의 결과와 A, B, D등급의 난자는 대체로 유사한 결과를 보였으나, B등급의 난자는 花田의 보고보다 높게 나타났다.

### 2. 체외성숙 배양액 내 hormone 첨가가 체외성숙에 미치는 영향

체외성숙 배양액 TCM-199과 Ham's F-10에 PMSG와 HCG를 각각 첨가하여 한우 미성숙 난포란을 체외 성숙배양한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서 제시한 바와 같이 TCM-199에 hormone을 첨가 배양했을 때 Holstein종의 경우 난구세포 확장 정도가 fully expanded 56.1%, partially expanded 31.5%로 총 87.6%였고, 한우의 경우 fully expanded 54.0%, partially expanded 30.2%로 총 84.2%로 hormone을 첨가하지 않은 구보다 높았으며 Ham's F-10 배양액에서도 비슷한 결과를 보였으나 유의적인 차이는 없었다( $P < 0.05$ ).

이러한 결과는 난포란의 체외성숙에 있어 FSH, LH, estradiol-17 $\beta$ 의 첨가는 난구세포의 확장, 전핵

형성율의 향상, 핵 및 세포질 성숙의 향상과 체외발생능 증진을 유기하고(Fukui 등, 1982; Ball 등, 1983; Brackett 등, 1989), 과립막세포의 첨가는 배 발생을 향상시킨다고 한 Critser 등(1986)의 결과와 일치하였다. 또 미성숙 난포란의 체외배양시 FSH의 첨가가 난포란의 핵성숙을 촉진시켰으며(Eppig, 1982), PMSG를 단독으로 첨가하여 배양했을 때 배양시간별로 GVBD 도달율과 성숙율을 높이는 데 매우 효과적인 것으로 나타났다고 보고한 Funahashi 등(1994)의 보고 및 성숙배양액에 PMSG를 첨가함으로써 성숙율이 현저히 높아졌다고 한 Wu 등(1992)의 보고와 일치하는 결과였다. 축종은 다르지만 돼지 난포란 배양시 PMSG와 HCG를 첨가하여 배양시 체외발생율이 무첨가구에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다는 김과 이(1995)의 결과와도 유사한 경향을 보였다.

### 3. 체외성숙 배양액 내 FCS, BSA, bFF 첨가가 체외수정율과 다정자 침입율에 미치는 영향

체외성숙 배양액(TCM-199, Ham's F-10)에 단백질원인 FCS, BSA 및 bFF를 첨가했을 때 체외수정 후 난자 내 정자 침입율 및 다정자 침입율은 Table 3과 같다.

TCM-199 배양액에 FCS를 첨가한 경우 수정율은 55.0%, 다정자 침입율은 13.6%였고, BSA와 bFF를 첨가한 경우 52.6%와 47.0%의 수정율과 다

Table 2. Effect of maturation medium and hormone on cumulus expansion of Holstein and Hanwoo oocytes

Medium	Breed	Supplements hormone	No. of oocytes	No. of oocytes /cumulus complexes with CE		
				Fully expanded(%)	Partially expanded(%)	Total(%)
TCM-199	Holstein	+	89	50(56.1)	28(31.5)	78(87.6)
		-	120	61(50.8)	37(30.8)	98(81.7)
	Hanwoo*	+	63	34(54.0)	19(30.2)	53(84.2)
		-	82	39(47.6)	24(29.3)	63(76.8)
Ham's F-10	Holstein	+	97	51(52.6)	32(33.0)	83(85.6)
		-	109	54(49.5)	32(29.4)	86(78.9)
	Hanwoo*	+	61	31(50.8)	19(31.3)	50(81.9)
		-	94	42(44.7)	28(29.8)	70(74.5)

\* Hanwoo : Korean native cattle

+ : Supplemets hormone(PMSG, HCG) in maturation media

- : Non-supplements hormone(PMSG, HCG) in maturation media

Table 3. Effects of FCS, BSA and bFF in maturation medium on fertilization and polyspermy rates after fertilization *in vitro*

Medium	Supplement*	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized(%)	No. of polyspermic oocytes(%)
TCM-199	FCS	40	22(55.0)	3(13.6)
	BSA	38	20(52.6)	2(10.0)
	bFF	42	20(47.0)	2(10.0)
Ham's F-10	FCS	39	21(53.8)	3(14.2)
	BSA	35	18(51.4)	2(11.1)
	bFF	40	20(50.0)	2(10.0)

\* FCS : 10%(v/v) fetal calf serum

BSA : 1%(w/v) bovine serum albumin

bFF : 10%(v/v) bovine follicular fluid

각 10.0%의 다정자 침입율을 보임으로써, 체외성숙 배양액에 FCS를 첨가했을 때가 BSA나 bFF를 첨가했을 때보다 수정율과 다정자 침입율 모두 높았다.

이러한 결과는 Ham's F-10 배양액에서도 마찬가지로 FCS 첨가시 수정율과 다정자 침입율이 53.8%, 14.2%로서 BSA와 bFF 첨가 시 수정율 51.4%, 50.0%, 다정자 침입율 11.1%, 10.0% 보다 높게 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

정자의 수정능 획득과 침체반응은 정자가 수정을 위하여 난자의 투명대를 침투하기 위한 필수적인 생리현상인데(Yanagimachi, 1981), 정자는 자성의 생식기도관에서 분비되는 특수한 단백질 결합물질 또는 albumin, taurine, hypotaurin, catecholamine 등에 의하여 두모(galea capitis, acrosome cap)가 파괴되고 수정능력을 얻게 된다. 체외에서 소 정자의 수정능 획득과 침체반응을 인위적

으로 유도하기 위해 소 난포액(Fukui 등, 1983), BSA(Byrd, 1981 ; Fulka 등, 1982 ; Takahashi와 Hanada, 1984)등을 이용한 연구가 보고된 바 있는데, 본 실험에서는 배양액에 쉽게 희석되는 단백질 물질인 FCS가 가장 높은 수정율과 다정자 침입율을 보였다. 또 다정자 침입율에 있어서는 bFF 첨가구가 FCS 나 BSA에 비해 낮았는데, 이러한 결과는 난관 분비액의 어떤 인자가 정자의 침체반응을 유도하여 정자 침입을 및 다정자 침입을 감소시켰다는 보고(Kim 등, 1996 ; 김 등, 1996)와 비슷한 경향을 보였으나 본 실험에서는 유의차가 인정되지 않았다.

#### 4. 체외성숙 배양액 내 항산화제 첨가가 체외수정율과 다정자 침입율에 미치는 영향

체외성숙 배양액 내 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol 5.0  $\mu$ M과 cysteamine 100  $\mu$ M을 첨가, 체외성숙 유기

Table 4. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and cysteamine in maturation medium on fertilization and polyspermy rate after fertilization *in vitro*

Medium	Supplements	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized(%)	No. of polyspermy oocytes(%)
TCM-199	Control	102	57(55.9)	8(14.0)
	$\alpha$ -Tocopherol	92	57(62.0)	10(17.5)
	Cysteamine	85	55(64.7)	10(18.1)
Ham's F-10	Control	94	50(53.2)	7(14.0)
	$\alpha$ -Tocopherol	88	53(60.2)	9(16.9)
	Cysteamine	90	60(66.7)	11(18.3)

후 체외수정 결과는 Table 4와 같다.

TCM-199에  $\alpha$ -tocopherol과 cysteamine을 첨가 성숙배양 후 체외수정 결과는 체외수정율이 각각 62.0%와 64.7%로 대조구의 55.9%에 비하여 약간 높았고, Ham's F-10을 체외성숙 배양액으로 사용했을 경우에도 대조구의 53.2% 보다 처리구에서 각각 60.2%와 66.7%로 모두 높았으나 통계적인 유의차는 없었다. 또한 다정자 침입율은 처리구에서 대조구보다 약간 높았으나 이것 역시 통계적인 유의차는 없었다.

이러한 결과는 Kito와 Bavister(1997)가 체외성숙 배양액 내 cysteamine을 첨가하여 hamster 난포란을 체외성숙 유기 후 체외수정시킨 결과 체외수정율과 응성전핵 형성율이 유의적으로 높았다는 보고 및 체외성숙배양액 내 항산화제 첨가는 소와 돼지의 체외수정율을 개선할 수 있을 것(Isselemd, 1998)이라는 보고와 유사한 결과를 보였다. 또 소 체외수정시 배양액 내  $\alpha$ -tocopherol과 ascorbic acid를 동시에 첨가하여 배양했을 때 보다는 각각 첨가했을 경우가 통계적인 유의차는 없었으나 체외수정율이 높게 나타났다는 보고(Dalvit 등; 1998)와도 비슷한 결과를 보였다. 그러나 TCM-199에 cysteamine을 첨가하여 돼지 미성숙 난포란을 44시간 동안 체외성숙 유기시 핵성숙율이 무첨가구에서 유의적으로 높았다(한 등, 1998)는 보고와는 차이를 보였다. 이와 같이 미성숙 난포란의 체외성숙 효율을 높이기 위하여 체외성숙 배양액 내 항산화제 첨가는 연구자들마다 상이한 결과를 보고하고 있기 때문에 다양한 항산화제 첨가 시험이 필요하다고 사료된다.

## 적 요

본 실험은 체외성숙 배양액 내 호르몬, 단백질원 및 항산화제 첨가가 한우 미성숙 난포란의 체외성숙과 수정 및 다정자 침입에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 난포란의 등급 비교에 있어서는 실험에 사용할 수 있는 A, B등급의 난포란이 한우보다 홀스타인 종에서 유의적으로 더 많았고, 체외성숙시 배양액내 호르몬을 첨가했을 때 난구세포의 확장 정도는 처리구가 대조구보다 높았으나

유의적인 차이는 보이지 않았다.

체외수정율과 다정자 침입율은 10 % FCS를 첨가했을 때가 가장 높았으나(55.0%, 13.6%), BSA 및 bFF 첨가구와 유의차는 인정되지 않았고, 배양액 종류에 상관없이 TCM-199과 Ham's F-10 에서 비슷한 경향을 보였다.

배양액내 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol 50  $\mu$ M과 cysteamine 100  $\mu$ M을 첨가시 유의적인 차이는 보이지 않았으나 무첨가구 보다 높은 수정율과 다정자 침입율을 보였다.

배양액내 호르몬과 혈청 및 항산화제 첨가가 한우 미성숙 난포란의 체외성숙과 수정에 있어서 무첨가구와 유의적인 차이는 없었지만 좀 더 높은 결과를 보여 이러한 물질을 첨가하는 것이 한우 체외수정란 생산의 효율을 높이는데 도움이 될 것이라 사료된다.

## 참고문헌

- Ball GB, Leibfried L, Lent RW, Ax RL, Bavister BD and Frist NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28:717-725.
- Bousquet D, Milovanov C, Bell JC, Drocher J and Smith LC. 1994. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. Theriogenology, 172(Abstr.).
- Brackett BG, Youms AI and Rayer-Hosken RA. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentration of luteinizing hormone. Fertil. Steril., 52:319-324.
- Byun TH and Lee SH. 1992. Morphological and cellular criteria ovaries, follicles and oocytes for *in vitro* maturation in the pig. Kor. J. Emb. Trans., 7:97-110.
- Byrd W. 1981. *In vitro* capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. J. Exp. Zool., 215:246.
- Channing CP and Tasfriri. 1978. Regulation of

- ovulatory processes:Ovum maturation, follicular reapture and luteinization. Plenum Press, New York.
- Crister ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL and First NL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 25:150 (Abstr).
- Eng LA, Konegay ET, Huntington J and Wellman T. 1986. Effects incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. *Reprod. Fert.*, 76:657-662.
- Eppig JJ. 1982. The relationship between parthenogenetic embryonic development and cumulus cell oocyte intercellular coupling during oocyte meiotic maturation. *Gamete. Res.*, 5: 229-237.
- Fukui Y, Terawaki Y and Ono H. 1982. Effects of gonadotropin, steroids and culture on bovine oocyte maturation. *Theriogenology*, 18:161-175.
- Fukui Y, Fukushima M and Ono H. 1983. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedures. *Theriogenology*, 29 (6):651-660.
- Fulka J. Jr, Palvok A and Fulka J. 1982. *In vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 64: 496-499.
- Funahashi H. and Day BN. 1993. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 39:965-973.
- Funahashi H, Cantley T and Day BN. 1994. Different hormone requirements of pig oocytes-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 101:159-165.
- Funahashi H, Stumpf TT, Cantley TC, Kim NH and Day BN. 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.
- Iwasaki S, and Nakahara T. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. *Theriogenology*, 33:669-675.
- Kano K, Miyano T and Kato S. 1994. Effect of oviductial epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42: 1061-1068.
- Kim NH, Funahashi H, Moon SJ, Abeydeera L, Prather RS and Day BN. 1996. Effects of oviductal fluid on the cortical granule reaction and polyspermy in the porcine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* (In press).
- Kito S and Bavister BD. 1997. Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured *in vitro* with gonadotropin, amino acids and cysteamine. *J. Reprod. Fert.*, 110:35-46.
- Lebfried ML and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocyte and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
- Motlik J, Crozet N and Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:323-328.
- Nagai T, Niwa K and Iritani A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 70: 271-275.
- Nagai T, Ding J and Moor RM. 1993. Effects of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. *J. Exp. Zool.*, 266:146-151.
- Naito K and Toyoda Y. 1992. Comparison of histone between two types of pig oocytes matured in different media *in vitro*. *Biol. Rep-*

- rod., 47:43-47.
- Pincus G and Enzmann EV. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. J. Exp. Med., 62 :655-657.
- 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.
- 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.
- Sanbisscho A and Threlfall WR. 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocytes. Theriogenology, 31:693-699.
- Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, Krob H and Schleger W. 1990. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrus serum. Theriogenology, 33:477-485.
- Takahashi Y and Hanada A. 1984. Penetration of zona-free hamster eggs *in vitro* by ejaculated bull sperm after treatment with ionophore A 23187. J. Anim. Reprod., 31(1) :30-38.
- Wang ZK, Wei PH, Wang JZ, Lei C and Kou MQ. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 37:733-739.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev., 30:330-338.
- Wu GM, Qun PC, Tan JH and Wang LA. 1992. *In vitro* maturation of *in vitro* matured pig oocytes. Theriogenology, 37:323.
- Yanagimachi R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni, L. Jr, Biggers, J.D. Ed. Fertilization and Embryonic Development *in vitro*. New York:Plenum Press., pp. 81-182.
- Yoshida M and Kojima Y. 1989. Male pronuclear formation by boar spermatozoon with hair-pun-curved tail in zona-free hamster egg. Jpn. J. Vet. Sci., 51(2):428-430.
- 花田 章. 1985. 牛 卵胞内 未熟卵子 受精卵 生産. 臨床獸醫, 3(9):71-75.
- 김남형, 문승주, 임준교, 구덕분, 이훈택, 정길생. 1996. 체외수정시 배양액 내 난관액 첨가가 돼지 난포란의 수정을 및 배 발달율에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 20(1):1-8.
- 김상근, 이종진. 1995. 돼지 분할 초기배와 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포와의 공배양이 생존율에 미치는 영향에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 19(2):135-140.
- 한만희, 박병권, 박창식, 서길웅, 이규승. 1998.  $\beta$ -Mercaptoethanol 및 Cysteamine이 돼지 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 22(4):375-383.

---

(접수일 : 2000. 2. 23 / 채택일자 : 2000. 4. 24)