

단백질 공급원 및 체세포와의 공배양이 돼지 체외수정란의 체외발달에 미치는 영향

한선경 · 구덕본 · 이규승¹ · 황윤식² · 김정익² · 이경광 · 한용민[†]
생명공학연구소

Effects of Protein Sources and Co-culture on *In Vitro* Culture of IVF-derived Porcine Embryos

Han, S. K., D. B. Koo, K. S. Lee¹, Y. S. Hwang², C. I. Kim², K. K. Lee and Y. M. Han[†]
Korean Research Institute of Bioscience & Biotechnology

ABSTRACT

This study was conducted to investigate whether various protein sources and co-culture affect *In vitro* development of porcine zygotes derived from *In vitro* maturation/fertilization (IVM/IVF). These results obtained in these experiments are summarized as follows

1. When porcine oocytes matured and fertilized *In vitro* were cultured in NCSU 23 medium supplemented with various BSA concentrations (0.4, 0.8 and 3.2%), *In vitro* developmental rates of porcine zygotes to blastocyst stage were 22.9, 18.4 and 14.6%, respectively. High concentration of BSA (3.2%) showed a smaller nuclei number (36.1 ± 11.8) of blastocysts than 0.4 and 0.8% BSA groups (53.2 ± 27.4 and 61.2 ± 22.5 , respectively) ($P < 0.05$). This result indicates that high concentration of BSA is detrimental on preimplantation development of IVF-derived porcine embryos.
2. No differences were detected in the developmental rate and mean nuclei number of porcine embryos between 10 and 20% FBS concentrations in culture medium.
3. IVF-derived porcine embryos co-cultured with mouse or porcine embryonic fibroblast cells showed a lower development to the blastocyst stage than those without co-culture system.

Consequently, the present study suggests that high concentration of BSA as a protein source in culture medium suppresses development potential of porcine embryos produced *In vitro*. In addition, co-culture with somatic cells is not effective on *In vitro* development of IVF-derived porcine embryos to blastocyst stage.

(Key words : Protein source, Co-culture, Porcine embryo, *In vitro*)

[†] Corresponding author : Korean Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Taejeon 305-600, Korea,
E-mail : ymhan@mail.kribb.re.kr

¹ 충남대학교 동물자원학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University)

² 강원대학교 축산학과(Department of Animal Science, Kwangwon National University)

I. 서 론

최근 돼지 난자의 체외성숙, 체외수정 및 체외 배양 기술이 급격히 발달됨에 따라, 체외에서 성숙·수정된 돼지 수정란을 대리모의 난관에 이식하여 그 산자의 생산이 가능하게 되었다 (Mattioli 등, 1989; Yoshida 등, 1993). 그러나, 돼지 수정란의 체외배양 체계는 아직 완벽하게 확립되지 않은 실정이다. Kikuchi 등 (1999)은 돼지 체외수정란의 경우, 체외배양 기간이 길어짐에 따라 산자의 생산율은 저하된다고 보고하였고, 체내에서 회수한 수정란을 체내 및 체외에서 배반포 단계까지 배발달을 유도하였을 때, 배반포기 수정란의 평균 세포수는 각각 164.5 ± 51.9 와 37.3 ± 11.7 개로 현저한 차이가 나타난다고 보고된 바 있다 (Machaty 등, 1998; Wang 등, 1999). 또한 체외에서 생산된 돼지 수정란은 체내에 비하여 지방의 축적이 왕성하고, 섬유질 핵인의 농도가 낮으며, 크로마틴 및 과립의 양이 저하되는 등 형태학적으로도 큰 차이가 있는 것으로 알려져 있다 (Hyttel 등, 1990; Wang 등, 1998). 이러한 결과들은 체외배양 과정 중에 체외수정란의 발달이 저하될 수 있음을 시사하고 있다 (Wianny 등, 1997). 특히, 다른 종에 비하여 돼지의 경우는 체외 배양체계가 더욱 미비하므로 (Keskintepe 등, 1996), 배반포 단계까지의 발달을 증진시키고 수정란의 질적인 면을 향상시키기 위한 체외배양 조건에 관한 실험이 여러 측면에서 진행되고 있다 (Ocampo 등, 1994, Ka 등, 1997). 그 중 한 방법으로는 배양액 내의 조성 성분을 변형하여 수정란의 발달에 미치는 영향을 비교하는 것이다 (Dobrinsky 등, 1996; Dumoulin 등, 1997; Deborah 등, 1992).

한편 체외수정된 돼지 난포란을 체외에서 배양하면 4~8세포기에서 발달이 지연되거나 중지되는 현상을 나타내는데 (Camous 등, 1984; Heyman 등, 1987), 이를 극복하기 위한 대안으로 체세포와의 공배양 실험이 시도되고 있다. 이것은 배양되는 체세포들이 미지의 세포 성장 촉진인자를 생산하거나 배양액 내에 존재하는 세포 성장 저해인자를

제거하기 때문에 공배양 하는 수정란의 생존성을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Eystone & First, 1989). 이때, 공배양에 이용되는 체세포로는 섬유아세포 (Voelkel 등, 1985; Kuzan 등, 1982; White 등, 1989), 난관상피세포 (Gandolfi 등, 1987; Rexroad 등, 1988; Fukui 등, 1989; Smith, 1992), 영양배엽세포 (Heyman 등, 1987; Pool 등, 1988), 난구세포 (Goto 등, 1988), 과립막세포 (Stoklosowa 등, 1982; Goto 등, 1992; Han 등, 1994), 기타 체세포 (Carney 등, 1990; Goto 등, 1992) 등이 있다.

본 연구에서는 단백질 공급원으로서 소 혈청 알부민 (BSA: bovine serum albumin)과 소 태아 혈청 (FBS: fetal bovine serum)의 농도에 따른 돼지 체외수정란의 체외발달을 뿐만 아니라, 태아 섬유아세포와의 공배양이 체외수정란의 발달에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 체외성숙 및 배양

도축장에서 회수한 난소는 $75 \mu\text{g/ml}$ penicillin G와 $50 \mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate (Sigma St Louis, MO, USA)가 함유된 0.9% 생리식염수에서 $22 \sim 27^\circ\text{C}$ 를 유지하여 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 2회 세정한 후 18 게이지 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 직경이 3~6 mm인 가시난포를 흡입하여 50 ml 튜브 (Falcon, Becton Dickinson France)에 넣어 약 10분간 정지하였다 (Funahashi 등, 1994). 바닥에 가라앉은 침전물을 난자 세정용 배양액인 Tyrode's lactate (TL)-Hepes 배양액 (Prather 등, 1995)으로 희석한 후, 실제 현미경 하에서 난구 세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 양질의 난자만을 선별하여 실험에 공시하였다 (Wang 등, 1999). 체외성숙용 배지는 North Carolina State University (NCSSU) 23 (Petters 등, 1993)을 기본 배양액으로 하여 10% 돼지 난포액, 0.1 mg/ml cystein (Sigma), 10 IU/ml PMSG (Sigma), 10 IU/ml hCG (Sigma) 그리고 10 ng/ml EGF (Sigma)를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 6 mm 이상 크기의 난포에서 난포액을 채취하

여 3000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 0.8 μm 필터로 거른 후 -20°C 냉동고에 보관하여 필요시 용해하여 사용하였다. 회수된 난포란은 TL-Hepes 배양액으로 3회 세정하고, 체외성숙용 배양액 (NCSU 23)으로 다시 3회 세정한 후 4-well dish의 각 well에 40~50개씩 넣어 39°C , 5% CO_2 배양기 내에서 배양하였다. 이때, 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간, 첨가되지 않은 배양액에서 22시간 총 44시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

2. 체외수정

체외수정용 배양액은 2.5 mM caffeine (Sigma)과 0.1% BSA (Sigma)가 함유된 modified Tris-buffered medium (mTBM)을 기본 배양액으로 사용하였고 (Abeydeera and Day, 1997), 정액의 세정액으로는 CaCl_2 가 함유된 DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; Gibco, Life Technologies Inc., Grand Island, NY)에 0.1% BSA가 첨가된 배양액을 사용하였다. 성숙이 유도된 난포란은 0.1% hyaluronidase (Sigma)를 처리하여 난구세포를 제거하였고, 2.5 mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 용액으로 3회 세정하였다. 정액은 인공수정용 액상 정액 (다비육중에서 제공)으로 사용 직전까지 17°C 항온고에서 최대 5일간 보관하며 사용하였다. 정액은 사용 직전에 정액 세정액과 1:1 비율로 혼합하여 15 ml falcon tube에 넣고 1500 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 3회 실시하였으며, 마지막으로 하단에 남은 정자 침전물에 정자 세정액을 넣어 39°C , 5% CO_2 배양기 내에서 10분간 정지하였다. 운동성을 가진 부유된 정자들을 회수하여 1500 rpm에서 3분간 원심분리한 다음, 침전된 정자는 최종 농도가 5×10^5 정자 수/ml이 되도록 희석하여 첨가한 후 39°C , 5% CO_2 배양기 내에서 6시간 동안 체외 수정을 실시하였다.

3. 생쥐 및 돼지 태아 섬유아세포 준비

생쥐 태아 섬유아세포 (MEF: mouse embryonic fibroblast)는 Wurst와 Joyner (1993)등에 의한 방법으로 준비하였다. 즉, 임신 14~15일된 생쥐로부터

태아를 무균상태로 회수하여 머리와 장기 및 내장들을 제거하였고, 나머지 몸체 부분을 안과용 가위로 세절하였다. 세절된 조직을 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 첨가되지 않은 PBS (Gibco)으로 3회 세정하고, 0.1% trypsin/0.05% EDTA (Gibco) 용액에 넣어 37°C 에서 10분간 3회 처리하여 단일세포로 분리하였다. 세포 부유액을 stainless 여과기 (Ikemoto Co, Tokyo)로 걸러내고 1,000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 그 후, 세포 침전물을 10% FBS가 함유되어 있는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium; Gibco)에 재부유하였다. 세포 부유액은 태아 한 마리당 직경 100mm petri-dish 한 개에 해당하는 면적에 배양하였다. 초기 생쥐 배아섬유아세포는 37°C , 5% CO_2 배양기 내에서 confluency를 보일 때까지 약 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 회수된 생쥐 배아섬유아세포는 DMEM에 50% (v/v) FBS 및 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma)로 구성된 동결배양액에 부유시켜 동결 튜브에 포장하여 -70°C 에서 24시간 동안 예비 동결한 후 액체질소에 옮겨 장기간 보존하였다. 동결된 생쥐 배아섬유아세포는 37°C 온수에서 용해하여 다섯 개의 100 mm petridish에 분주한 다음 confluent 하게 자랄 때까지 2일 동안 배양하였다. 동결용해 후 배양된 이들 세포는 공배양에 사용하기 전 불활성화시키기 위해서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mitomycin C (Sigma)가 포함된 배양액에서 2.5시간 동안 배양한 후 PBS로 3회 세정하여 mitomycin C를 제거하였다. 생쥐 배아섬유아세포를 단일 세포층으로 만들기 위해서 4-well dish의 각 well에 6×10^5 세포수/ml의 농도가 되도록 조정하여 배양하였다. 돼지 태아섬유아세포 (PEF: porcine embryonic fibroblast)는 임신 40일경의 한국 재래돼지 (*Sus scrofa domestica* L.)에서 분리하였으며, 세포의 준비는 생쥐에서와 같은 방법으로 실시하였다.

4. 체외배양

돼지 수정란의 체외배양에는 0.4% BSA가 함유된 NCSU 23을 기본배양액으로 사용하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 체외발달율을 조사하기 위하여 0.4, 0.8 및 3.2% BSA가 각각 첨가된 NCSU

23 배양액에서 3일간 배양하였다. 배양 3일 이후부터 난할된 체외수정란을 10 또는 20%의 FBS를 첨가한 NCSU 23 배양액에서 계속 배양하였다. 또한, 돼지 체외수정란을 생쥐 배아섬유아세포나 돼지 태아섬유아세포와의 공배양을 실시하였다.

5. 배반포 염색

체외수정된 돼지 수정란은 체외배양 7일째, 수정란의 배반포 단계에서 Hoechst 염색을 실시하여 그 세포수를 조사하였다. Hoechst 염색을 실시하기에 앞서 수정란을 1% formalin 용액에 1분간 정치시켜 고정한 후 수정란을 슬라이드글라스 위에 올려놓고 커버글라스를 덮은 다음 이 수정란이 움직이지 않을 정도로 누르고 슬라이드글라스와 커버글라스 사이에 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 Hoechst 염색액을 흘려 넣어 염색을 실시하였다. 염색 후 1 시간 후에 형광 현미경 (Olympus, Japan) 하에서 각각의 배반포기 수정란으로부터 세포수를 조사하였다 (Fig. 1).

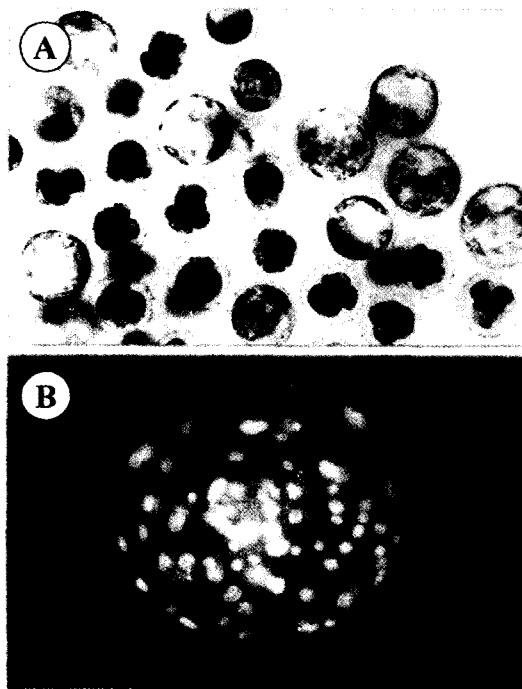


Fig. 1. IVM/IVF-derived porcine blastocysts (A) and Hoechst 33342 stained blastocysts (B).

6. 통계처리

본 연구에서는 각 처리구에 대해 4회 이상 반복 실험을 실시하였으며, 얻어진 자료는 SAS의 General Linear Models 방법을 이용하여 통계 처리하였다. 체외 발달을 및 평균 세포수는 Duncan's group 검정에 의해 분석하였으며, $P < 0.05$ 이하의 유의성만을 통계학적으로 차이가 있는 것으로 인정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. BSA 농도가 돼지 체외수정란의 체외발달에 미치는 영향

돼지 체외수정란의 체외발달에 있어서 체외수정 후부터 NCSU 23 배양액에서 배양하는 3일간 BSA의 농도를 달리하여 그에 따른 효과가 있는지 살펴보았다. 체외수정된 난자를 각각 0.4, 0.8 및 3.2%의 BSA가 첨가된 배양액에서 배양하여 각 처리구에 대한 배반포 단계까지의 발달을 및 평균 세포수를 비교, 조사하였다 (Table 1). 이때 사용된 BSA의 농도는 양이나 소 등의 수정란 체외배양시 널리 이용되고 있는 농도를 근거로 하여 실험에 적용하였다.

각 처리구에 따른 난할율에 있어서는 유의차가 없었으며 (각각 71.1, 73.9, 73.7%), 배반포까지의 발달율은 각각 22.9, 18.4 및 14.6%로서 BSA의 농도가 높을수록 다소 감소하는 경향이 있으나 유의성이 인정되지는 않았다 ($P > 0.05$). 그러나 발달한 배반포의 평균 세포수는 3.2% BSA (36.1 ± 11.8) 첨가구가 0.4% (53.2 ± 27.4) 및 0.8% (61.2 ± 22.5) 첨가구 보다 유의적으로 낮게 나타났다 ($P < 0.05$). 소 혈청 알부민은 glucose (Davis 등, 1978; Petters 등, 1990)나 glutamin (Petters 등, 1990; Galvin 등, 1993)등과 더불어 단백질 공급원으로서 돼지 수정란의 체외발달을 증진한다고 보고된 바 있다 (Wright 등, 1977; Beckmann 등, 1990; Bavister 등, 1995). 본 실험에서 사용한 BSA의 농도에 따라 돼지 체외수정란의 발달에 별다른 영향을 미치지 못했으나, 3.2%의 높은 BSA 농도에서는 배반포의 세포수가 유의적으로 감소하였다. 결과적으로, 높

Table 1. Effects of BSA concentration on *In vitro* development of IVF-derived porcine embryos

BSA conc.	No. of oocytes examined	No. (%) of eggs cleaved	No.(%)of blastocysts	Nuclei no. (Mean ±SD)
0.4%	135	96(71.1)	31(22.9)	53.2±27.4 ^a
0.8%	119	88(73.9)	22(18.4)	61.2±22.5 ^a
3.2%	137	102(73.7)	20(14.6)	36.1±11.8 ^b

^a vs ^b : P<0.05.

은 농도의 BSA 첨가는 돼지 수정란의 체외배양시 수정란의 발달 및 질적 수준을 떨어뜨리는 요인이 될 수 있다는 것을 알게 되었다. 이러한 원인은 정확하게 알려져 있지 않지만, 포유동물 수정란의 체외배양시 BSA의 농도는 종에 따라 다소 차이가 있을 것으로 생각된다.

2. FBS농도에 따른 돼지 수정란의 체외발달

체외에서 수정된 돼지 수정란을 배양 3일째 이후부터 4일간 각각 10%와 20%의 FBS가 첨가된 NCSU 23 배양액에서 배양하여 FBS 농도에 따른 수정란의 체외발달능을 비교 조사하였다 (Table 2). 배반포 단계까지의 발달율에 있어서 통계적인 차이는 나타나지 않았으나 (20.3 vs 26.9%), 20% FBS를 첨가하여 배양한 실험군이 다소 높은 성적을 보여주었다. 배반포기 수정란의 세포수에 있어서는 두 그룹간에 유의적인 차이가 없었다 (52.3±15.5 vs 54.6±22.4). 소 혈청은 배반포 단계의 수정란의 부화를 유도하는 매우 중요한 인자로 알려져 있다 (Robl 등, 1981). 혈청과 혈청 구성물질은 에너지 대체제, 비타민, 아미노산, 성장인자 등을 포함하고 있어서 배양 환경에 유익한 요소를 제공할 뿐만 아니라 (Bavister 등, 1995) 생물학적으로 중요한 역할을 한다 (Maurer 등, 1992). 그러나, 소 혈청은 포유 동물에 있어서 수정란 발달의 초기

단계에 유해한 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에 (Dorbrinsky 등, 1996), 본 실험에서는 수정 후 3일째 분할된 수정란만을 선별하여 추가 배양한 결과, 소 태아 혈청의 첨가 농도가 돼지 체외수정란의 발달율과 세포수에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 돼지 체외수정란의 체외배양에 있어서 10% 이상의 혈청 첨가가 체외발달에 부가적으로 영향을 미치지 못한다는 것을 시사하고 있다.

3. 체세포와의 공배양이 돼지 체외수정란의 발달에 미치는 영향

돼지 체외수정란의 체외발달에 있어서 생쥐 배아 섬유아세포 및 돼지 태아 섬유아세포와의 공배양이 체외발달에 영향을 미치는지를 조사하였다. 체외수정 후 배양 3일 이후부터 7일째까지 MEF 및 PEF와의 공배양을 실시한 그룹과 공배양하지 않은 대조구에서 발달된 배반포의 세포수는 각각 46.7±20.3, 44.3±15.4 및 50.2±16.4개로서 유의적인 차이가 없었다. 그러나, 각 실험군에 있어서 배반포까지의 발달율은 각각 3.8, 1.5% 및 17.7%로서, 섬유아세포와 공배양한 돼지 체외수정란의 발달율이 현저하게 감소하였다 (P<0.05). 이러한 결과는 생쥐나 돼지 태아 섬유아세포와의 공배양이 돼지 수정란의 체외발달에 적합하지 않음을 제

Table 2. Effects of FBS concentration on *In vitro* development of IVF-derived porcine embryos

FBS conc.	No. of oocytes examined	No. (%) of blastocysts	Total cell no. (Mean ±SD)
10%	108	24(20.3)	52.3±15.5
20%	104	28(26.9)	54.6±22.4

Table 3. Effects of co-culture with MEF and PEF on *In vitro* development of IVF-derived porcine embryos

Coculture*	No. of oocytes examined	No. (%) of blastocysts	Total cell no. (Mean ±SD)
MEF	209	8(3.8) ^a	46.7±20.3
PEF	200	3(1.5) ^a	44.3±15.4
Control	158	28(17.7) ^b	50.2±16.4

* MEF, mouse embryonic fibroblast; PEF, porcine embryonic fibroblast.

^a vs ^b; P<0.05.

시하고 있다. 소의 경우, 생쥐 태아 섬유아세포와 공배양하였을 때 미지의 성장 촉진인자를 생산하거나 배양액내에 존재하는 수정란 유해인자를 제거하는 등으로 수정란의 발달이 향상되었다는 보고가 있으나(Eyston & First, 1989; Park et al., 2000), 본 연구의 결과에서 보여주듯이 생쥐 섬유아세포와의 공배양이 돼지 체외수정란의 체외발달에 유해한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이것은 중간에 분비되는 성장인자의 차이와 미지의 효과에 의한 결과라고 추측할 수 있다. 그러나 같은 종인 돼지 태아 섬유아세포와의 공배양에서도 좋은 결과를 얻지 못하였기 때문에 돼지 수정란의 체외발달에 효과적인 체세포를 확립하기 위해서는 배양액 조성 변화 및 다른 체세포 이용 등 보다 다각적이고 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

IV. 적 요

본 연구는 체외성숙, 수정된 돼지 수정란의 체외발달에 다양한 단백질 공급원의 첨가 및 공배양이 미치는 영향을 조사하기 위해서 수행하였다. 본 실험에서 얻은 결과들을 요약하면 다음과 같다.

1. 체외성숙, 수정된 돼지 수정란을 BSA의 농도가 각각 0.4, 0.8 및 3.2% 첨가된 NCSU 23 배양액 내에서 체외배양하였을 때, 배반포 단계까지의 발달율은 각각 22.9, 18.4 및 14.6%로서 BSA의 농도가 높을수록 체외발달율은 감소하는 경향을 나타내었다. 높은 농도의 BSA (3.2%)에서 발달한 배반포의 평균 세포수 (36.1±11.8)는 0.4 및 0.8% BSA 그룹의 평균

세포수 (각각 53.2±27.4, 61.2±22.5)보다 유의적으로 적은 수를 나타내었다 (P<0.05). 이러한 결과는 높은 농도의 BSA가 돼지 체외수정란의 체외발달을 저해한다는 것을 시사하였다.

2. FBS의 농도가 10% 및 20%로 첨가된 배양액에서 배양된 돼지 체외 수정란의 체외발달율과 평균 세포수는 차이가 없었다.
3. 생쥐나 돼지 태아 섬유아세포와의 공배양은 돼지 체외수정란의 체외발달에 오히려 부정적 효과를 나타내었다.

본 연구 결과는 돼지 수정란의 체외배양에 있어서 단백질 공급원인 BSA나 FBS의 첨가 농도에 따라서는 수정란의 발달 및 질적 향상을 도모할 수 없었으며, 섬유아세포와의 공배양도 돼지 체외수정란의 발달에 부정적 효과가 있다는 것을 제시하였다.

V. 인용문헌

1. Abeydeera, L.R. and Day, B.N. 1997. In penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: Effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48:537-544.
2. Bavister, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update*, 1:91-148.
3. Beckmann, L.S., Cantly, T.C., Rieke, A.R. and Day, B.N. 1990. Development and viability of one- and two-cell porcine embryos cultured

- through the "four-cell block." *Theriogenology*, 33:193.
4. Camous, S., Heyman, Y., Meziu, W. and Menezo, Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fertil.*, 72:479-485.
 5. Davis, D.L. and Day, B.N. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *In vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46:1043-1053.
 6. Dobrinsky, J.R., Johnson, L.A. and Rath, D. 1996. Development of culturemedium (BECM-3) for porcine embryos: Effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol. Reprod.*, 55:1069-1074.
 7. Deborah, K. and Barry, D. 1992. Hypotaurine requirement for *in vivo* development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocysts, and production of term offspring from *In vitro*-fertilized ova. *Biol. Reprod.*, 47:297-304.
 8. Dumouline, C.M., Van Wissen, C.P., Menheere, P.C.A., Michiels, H.J.C., Geraedts, P.M. and Evers, L.H. 1997. Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos. *Biol. Reprod.*, 56:739-744.
 9. Eystone, W.H. and First, N.L. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.*, 85:715-720.
 10. Fukui, Y. and Ono, H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *In vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 86:501-506.
 11. Galvin, J.M., Stewart, A.N.V. and Meredith, S. 1993. Higher sodium chloride concentrations can induce a four cell block in porcine embryos. *Theriogenology*, 39:244.
 12. Gandolfi, F. and Moor, R.M. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviductal epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.*, 81:23-28.
 13. Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Kobe, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *In vitro* fertilization of *In vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 83:753-758.
 14. Goto, K., Iwai, N., Takuma, Y. and Nakanishi, Y. 1992. Co-culture of *In vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
 15. Han, Y.M., Yamashina, H., Koyama, N., Lee, K.K. and Fukui, Y. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF- derived bovine blastocysts cultured *In vitro* after freezing and thawing. *Theriogenology*, 42: 645-654.
 16. Heyman, Y., Menezo, Y., Chesne, P., Camous, S. and Garnier, V. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: Improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27:59-68.
 17. Hyttel, P. and Niemann, H. 1990. Ultrastructure of porcine embryos following development *In vitro* versus *in vivo*. *Mol. Reprod. Devel.*, 27:136-144.
 18. Ka, H.H., Sawai, K., Wang, W.H., Im, K.S. and Niwa, K. 1997. Amino acid in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *In vitro*. *Biol. Reprod.*, 57:1478-1483.
 19. Keskinetepe, L. and Brackett, B.G. 1996. *In vitro* developmental competence *In vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.*, 55:333-339.

20. Kikuchi, K., Kashiwazaki, N., Noguchi, J., Shimada, A., Takahashi, R., Hirabayashi, M., Shino, M., Ueda, M. and Kaneko, H. 1999. Development competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured *In vitro*. *Biol. Reprod.*, 60:336-340.
21. Kuzan, F.B. and Wright, R.W. 1982. Blastocyst expansion, hatching and attachment of porcine embryos cocultured with bovine fibroblasts *In vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 5:57-63.
22. Machaty, Z., Day, B.N. and Prather, R.S. 1998. Development of early porcine embryos *In vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 59:451-455.
23. Mattioli, M., M. L. Bacci, G. Galeati and E. Seven. 1989. Developmental confidence of pig oocytes matured and fertilized *In vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1207.
24. Maurer, H.R. 1992. Towards serum free, chemically defined media for mammalian cell culture. In: Freshney RI (ed.), *Animal cell culture: A practical approach* (2nd ed.). Oxford: Oxford University, pp. 15-46.
25. Ocampo, M.B., Ocampo, L.C., Mori, T., Ueda, J. and Kanagawa, H. 1994. Nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes cultured in the amniotic fluid of developing chick embryos. *Vet. Med. Sci.*, 56:173-176.
26. Park, J.S., Han, Y.M., Lee, C.S., Kim, S.J., Kim, Y.H., Lee, K.J., Lee, K.S. and Lee, K.K. 2000. Improved development of DNA-injected bovine embryos co-cultured with mouse embryonic fibroblast cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 59: 13-22.
27. Petters, R.M. and Wells, K.D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 48:61-73.
28. Pool, S.H., Rorie, R.W., Pendleton, R.J., Menio, A.R. and Godke, R.A. 1988. Culture of early stage bovine embryos inside day-13 and day-14 precultured trophoblastic vesicles. *Ann. N. Y. Acad. Seri.*, 54:407-409.
29. Prather, R.S., Mayes, M.A. and Murphy, C.N. 1997. Parthenogenetic activation of pig eggs by exposure to protein kinase inhibitor. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9:539-544.
30. Robl, J.M. and Davis, D.L. 1981. Effects of serum on swine morulae and blastocysts *In vitro*. *J. Anim. Sci.*, 52:1450-1456.
31. Smith, S., Schmidt, M., Purwantara, B. and Greve, T. 1992. Oviduct epithelial cell co-culture of early porcine embryos. *Acta. Vet. Scand.*, 33:349-355.
32. Stoklosowa, S.E. and Channing, C.P. 1982. Estrogen and progesterone secretion by isolated cultured porcine thecal and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 26:943-952.
33. Voelkel, S.A., Amborski, G.F., Hell, D.G. and Godke, R.A. 1985. Use of a uterine-cell monomaturational-promoting factor and its constituent protein during *In vitro* maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 56:253-259.
34. Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Prather, R.S. and Day, B.N. 1998. Morphologic comparison of ovulated and *In vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *In vitro* fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 49:308-316.
35. Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Han, Y.M., Prather, R.S. and Day, B.N. 1999. Morphologic evaluation and action filament distribution in porcine embryos produced *In vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 60:1020-1028.
36. White, K.L., Henke, K., Rickords, L.F., Southern, L.L., Thomason, D.L. and Wood, T.C. 1989. Early embryonic development *In vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol. Reprod.*, 41:425-430.
37. Wianny, F., Perreau, C. and Hochereau, M.T. 1997. Proliferation and differentiation of por-

- cine inner cell mass and epiblast *In vitro*. Biol. Reprod., 57:756-764.
38. Wright, R.W. 1977. Successful culture *In vitro* swine embryos to the blastocyst stage. J. Anim. Sci., 44:853-858.
39. Wurst, W. and Joyner, A.L. 1993. Production of targeted embryonic stem cell clones. Gene Targeting: A practical approach, pp 33-61.
40. Yoshida, M., Mizoguchi, Y., Ishigaki, 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.
- (접수일자: 2000. 8. 31. / 채택일자: 2000. 9. 20.)