

돼지 액상정액의 정자 주입농도가 서로 다른 체외성숙배지에서 배양된 난포란의 체외수정에 미치는 영향

박창식[†] · 이영주 · 고현진 · 양창범¹ · 손동수² · 서길웅 · 이규승
충남대학교 동물자원학부

Effect on *In-Vitro* Fertilization of Pig Oocytes Matured in Different *In-Vitro* Maturation Media according to Sperm Concentration of Liquid Boar Semen

Park, C. S.[†], Y. J. Yi, H. J. Ko, C. B. Yang¹, D. S. Son², K. W. Seo and K. S. Lee
Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University

ABSTRACT

The present study was carried out to investigate the effects of maturation media on penetrability of pig oocytes by liquid boar sperm coincubated with different sperm concentrations in a modified Tris-buffered medium (mTBM). Follicular oocytes collected from ovaries of prepubertal gilts were matured in a modified TCM-199 (mTCM-199) medium, modified Waymouth MB 752/1 (mWaymouth MB 752/1) medium or NCSU-23 medium. Oocytes (30~40) were transferred into each well of a Nunc 4-well multidish containing 0.5 ml maturation medium. The sperm-rich portion of ejaculates with greater than 90% motile sperm were used in the experiment. The semen was cooled 22 to 24°C over 2 h period. The semen was diluted with Beltsville Thawing Solution (BTS) extender at room temperature to give 2×10^8 sperm/ml in 100 ml plastic bottle. Liquid boar semen of 30 ml in 100 ml plastic bottle was kept at 17°C for 5 days. The sperm with greater than 70% motility after day 5 of storage were used for *in-vitro* fertilization (IVF). After 44 h maturation of immature oocytes in 5% CO₂ in air at 38.5°C, cumulus cells were removed and oocytes (30~40) were coincubated for 6 h in 0.5 ml mTBM fertilization medium with five different (1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 , 6×10^6 , 10×10^6 /ml) sperm concentrations. At 6 h after IVF, oocytes were transferred into 0.5 ml NCSU-23 culture medium for further culture of 6 h. At 12 h after IVF, sperm penetration, polyspermy and male pronuclear formation of oocytes were evaluated. Oocytes of NCSU-23 maturation medium decreased polyspermy and increased male pronuclear formation compared to those of mTCM-199 and mWaymouth MB 752/1 maturation media. Of oocytes matured in NCSU-23 medium and inseminated in mTBM medium with $2 \sim 4 \times 10^6$ /ml sperm concentrations, 50.8~

본 연구는 2001년 농촌진흥청 대형과제로 수행되었음.

[†] Corresponding author : Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764 Korea, E-mail : Parkcs@cuvic.cnu.ac.kr

¹ 농촌진흥청 연구운영과 (Division of Research Coordination, RDA, Suwon 441-707, Korea)

² 농촌진흥청 축산기술연구소 (National Livestock Research Institute, RDA, Sunghwan 330-801, Korea)

50.9% showed sperm penetration, 13.3~19.5% polyspermy and 43.9~45.4% male pronuclear formation.

In conclusion, we found out that oocytes matured in NCSU-23 medium and inseminated in mTBM medium showed superior *in-vitro* fertilization compared to those matured in mTCM-199 and mWaymouth MB 752/1 maturation media and inseminated in mTBM medium. The optimum sperm concentrations for *in-vitro* fertilization of oocytes matured in NCSU-23 medium by liquid boar semen stored at 17°C for 5 days were $2\sim4\times 10^6$ /ml.

(Key words : *In-vitro* fertilization, Pig oocytes, Maturation medium, Liquid boar semen, Male pronuclear formation)

I. 서 론

돼지의 미성숙 난포란의 성숙을 위한 배지는 실험실마다 다르게 사용되고 있다. 그러나 일반적으로 modified TCM-199 성숙배지 (Mattioli 등, 1989; Yoshida 등, 1990; Wang 등, 1991; Funahashi 등, 1994 a,b)와 BSA(bovine serum albumin)-free NCSU-23 성숙배지 (Funahashi 등, 1996)가 많이 사용되고 있다. 그 외에 modified Waymouth MB 752/1 성숙배지 (Kikuchi 등, 1998; Coy 등, 1999)가 사용되고 있다.

수정배지로는 TCM-199 수정배지 (Coy 등, 1993; 1999)와 mTBM (Abeydeera와 Day, 1997) 수정배지가 일반적으로 사용되고 있다. 초기발생배지로는 BECM-6, BECM-7, NCSU-23, 그리고 NCSU-23aa (Long 등, 1999)등이 사용되고 있다.

사출된 원정액의 돼지정자를 이용하여 체내에서 성숙된 돼지 난포란을 체외에서 성공적으로 수정시킨 결과는 Yoshida (1987, 1989)에 의해서, 체외에서 성숙시킨 돼지 난포란을 체외에서 성공적으로 수정시킨 결과는 Mattioli 등 (1988), Yoshida 등 (1990), Zheng과 Sirard (1992), Funahashi와 Day (1993) 그리고 Rath 등 (1995)에 의해서 보고되었다. 그러나 원정액의 사용은 보존기간이 짧아 체외 수정시마다 채취해야 한다는 번거로움이 있고, 체외수정을 위해서는 같은 특성을 가진 정자의 계속적인 반복사용이 필요하므로 최근에는 동결-융해 정자를 이용한 체외수정 방법 (Nagai 등, 1988; Wang 등, 1991; Abeydeera와 Day, 1997)이 개발되고 있다. 또한 액상정액을 이용한 인공수정의 보급

이 확대됨으로써 액상정액의 정자를 이용한 체외 수정 방법의 개발도 검토할 필요가 있게 되었다. BTS (Beltsville Thawing Solution)회석액에 보존된 액상정액의 정자를 이용한 체외수정은 Coy 등 (1999)에 의해서 보고되었다. 그러나 지금까지 액상정액의 정자 주입농도에 따른 체외 수정의 연구 결과는 보고된 바 없었다.

따라서 본 연구는 서로 다른 체외성숙 배지에서 성숙시킨 난포란을 액상정액의 정자를 이용하여 주입농도별로 체외수정시킴으로써 액상정액을 이용한 새로운 체외수정방법을 개발하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난소 및 난포란의 채취

본 실험에 사용된 난소는 충남 공주시 의당면 수촌리 614번지의 (주) 국일기업 도축장에서 도축되는 암돼지 (체중 100 kg내외)로부터 채취하였다. 도살 직후 적출한 난소는 75 µg/ml penicillin G potassium, 50 µg/ml streptomycin sulfate, 그리고 0.1% BSA (Sigma A3311, USA)가 첨가된 0.9% 생리적 식염수 (30~35°C)에 담아 1~2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포란은 25.0 mM의 NaHCO₃를 2.0 mM로 바꾼 mTLP-PVA (Long 등, 1999) 세척 및 배양액을 이용하여 20-gauge의 주사침이 장착된 10 ml 주사기로 2~6 mm 직경의 포상난포로부터 회수하였다. 회수된 난포란은 mTLP-PVA액과 회석하여 60×15 mm의 tissue culture dish (Falcon, USA)에 옮긴 후 실체현미경 (20~40×)하에서 난세포질이 균일하고 난구세포의 부착

상태가 양호한 것만을 체외성숙에 이용하였다.

2. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란의 체외성숙은 ① TCM-199 with Earle's salt에 26.19 mM NaHCO₃, 0.9 mM sodium pyruvate, 10 µg/ml insulin, 2 µg/ml vitamin B12, 25 mM Hepes, 0.5 µg/ml h-FSH/ml, 0.5 µg/ml h-LH/ml, 10 ng/ml EGF, 0.4% BSA (w/v), 75 µg/ml penicillin G sodium, 50 µg/ml streptomycin sulfate 그리고 10% pFF (v/v)를 첨가한 것, ② Waymouth MB 725/1에 26.66 mM NaHCO₃, 1.65 mM L-cysteine, 0.5 µg/ml h-FSH, 0.5 µg/ml h-LH/ml, 10 ng/ml EGF, 0.1% polyvinyl alcohol (w/v), 0.4% BSA (w/v), 75 µg/ml penicillin G sodium, 50 µg/ml streptomycin sulfate 그리고 10% pFF (v/v)를 첨가한 것, 그리고 ③ NCSU-23 성숙배지 (Wang 등, 1997)를 사용하였다.

성숙배양액은 4-well polystyrene culture dish (Nunc, Denmark)에 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복한 후 2~3시간동안 38.5°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 습도로 조절된 CO₂ 배양기내에서 평형시킨 후 well당 30~40개의 미성숙 난포란을 적하하고 44시간 배양하여 성숙을 유도하였다. 체외성숙 배양액들은 pH 7.4, 삼투압은 280~310 mOsmol로 조정하여 사용하였으며, 체외성숙배양액에 첨가하였던 돼지 난포액 (porcine follicular fluid; pFF)은 직경이 2~6 mm의 포상난포에서 난포액을 흡인한 다음 15 ml 원심분리관에 주입, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 0.80 µm millipore filter (Corning, USA)로 1차 여과하였다. 그리고 재차 0.22 µm millipore filter로 여과한 후 분주하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

3. 정자의 준비 및 체외수정

각각의 성숙배지에서 체외배양 시킨 난포란들은 0.1% hyaluronidase가 포함되고 10 mM CaCl₂ · 2H₂O, 2 mM caffeine, 0.1% BSA (fraction V; Sigma A7888), 75 µg/ml penicillin G sodium, 50 µg/ml streptomycin sulfate 함유되고 pH 7.8, 삼투압 290~300 mOsmol로 조정된 modified Tris-buffered

medium(mTBM) 수정배지에 노출시켜 cumulus cells를 제거한 뒤, 0.1% hyaluronidase가 함유되지 않은 mTBM 수정배지에 세 번 세척하였다. 그리고 4-well polystyrene culture dish에 mTBM 수정배지를 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 2~3시간동안 38.5°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 습도로 조절된 CO₂ 배양기내에서 평형시킨 수정배지에 well당 30~40개의 성숙 난포란을 적하하고 수정전 약 30분간 CO₂ 배양기에서 평형시켰다.

체외수정을 위한 정자는 BTS 보존액에 2×10⁸/ml의 정자농도로 17°C에서 5일간 보존시킨 30 ml 액상정액을 이용하였다. 우선 액상정액을 잘 흔들어 섞어 2 ml를 취하고 mTLP-PVA로 1,500 rpm에서 5분간 두 번 세척한 후 최종 mTBM 수정배지 5 ml를 가하여 희석하였다. 그리고 성숙배지별 난포란이 침지 되어있는 수정배지에 정자농도가 1, 2, 4, 6, 그리고 10×10⁶/ml가 되도록 주입하고 CO₂ 배양기에서 6시간동안 수정시켰다.

4. 체외배양

체외수정시킨 수정란들은 수정 6시간후 0.4% BSA (fraction V; Sigma A8022), 75 µg/ml penicillin G sodium, 50 µg/ml streptomycin sulfate 함유되고 pH 7.4, 삼투압 280~300 mOsmol로 조정된 NCSU-23 초기발생배지 (Wang 등, 1997)에 세 번 세척하고 4-well polystyrene culture dish에 NCSU-23 초기발생배지를 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 2~3시간동안 38.5°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 습도로 조절된 CO₂ 배양기내에서 평형시킨 배지에 수정란들을 옮겼다. 그리고 체외배양 6시간 즉 체외수정 후 12시간 성숙배지별 난포란에 대한 정자침입율, 다정자 침투율, 응성전핵 형성율을 관찰하고자 고정시켰다.

5. 수정란의 관찰

체외수정 12시간 후 수정란들은 0.1% hyaluronidase가 포함된 mTLP-PVA에 노출시켜 cumulus cells 및 정자를 깨끗이 제거하고 슬라이드 글라스에 옮겨 실온의 25% acetic alcohol에서 48시간 고정된 후 1% acetic-orcein으로 염색하여 위상차 현미

경 ×200 그리고 ×400에서 성숙배지별 성숙난포란의 정자침입율, 다정자침투율, 응성전핵 형성을 관찰하였다. 본 시험에 사용된 모든 시약은 특별한 언급이 없는 한 Sigma (USA)제품을 사용하였다.

6. 통계 처리

본 실험에서 얻어진 자료는 SAS package (1996)를 이용하여 분산분석을 하였으며, 처리간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. mTCM-199 성숙배지에서 성숙한 난포란을 mTBM 수정배지에서 액상정액으로 체외수정한 결과

mTCM-199 성숙배지와 mTBM 수정배지에서 액상정액의 정자주입 농도가 체외수정에 미치는 영향을 살펴보면 Table 1에 나타난 바와 같이 주입정자 농도가 높을수록 정자침입율, 다정자 침입을 그리고 응성전핵 형성이 높은 경향을 나타내었는데, 다정자 침입율이 응성전핵 형성을 보다 높아 실용화에 문제점이 있는 것으로 나타났다.

2. mWaymouth MB 752/1 성숙배지에서 성숙한 난포란을 mTBM 수정배지에서 액상정액으로 체외수정한 결과

mWaymouth MB 752/1 성숙배지와 mTBM 수정배지에서 액상정액의 정자주입농도가 체외수정에 미치는 영향을 살펴보면 Table 2에 나타난 바와 같이 주입정자 농도가 높을수록 정자침입율, 다정

Table 1. Effect of sperm concentration of liquid boar semen on *in-vitro* fertilization of pig oocytes matured in mTCM199 medium and inseminated in modified Tris buffer medium (mTBM)

Sperm concentration (×10 ⁶ /ml)	No. of oocytes inseminated	% of oocytes penetrated ¹	% of polyspermic oocytes ¹	% of oocytes with male pronucleus ¹
1	49	52.1±2.8	27.1±6.6 ^b	9.2±5.8 ^b
2	60	54.0±2.9	33.9±5.5 ^{ab}	9.5±2.4 ^b
4	41	63.5±9.1	37.7±1.0 ^{ab}	17.5±2.5 ^{ab}
6	45	67.6±3.4	45.0±4.0 ^{ab}	19.7±7.1 ^{ab}
10	60	69.0±8.2	49.7±8.1 ^a	26.6±1.9 ^a

¹ Mean±SE. Experiments were repeated three times.

^{ab} Values in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 2. Effect of sperm concentration of liquid boar semen on *in-vitro* fertilization of pig oocytes matured in mWaymouth MB 752/1 medium and inseminated in modified Tris buffer medium (mTBM)

Sperm concentration (×10 ⁶ /ml)	No. of oocytes inseminated	% of oocytes penetrated ¹	% of polyspermic oocytes ¹	% of oocytes with male pronucleus ¹
1	63	29.7±6.7 ^b	12.0±5.0 ^b	13.9±2.6 ^b
2	63	24.7±5.3 ^b	17.3±4.9 ^b	16.7±3.1 ^b
4	48	38.9±0.7 ^b	19.5±5.1 ^b	25.8±5.5 ^{ab}
6	59	62.5±6.6 ^a	40.0±8.9 ^a	37.9±6.1 ^a
10	60	64.8±4.9 ^a	42.6±7.4 ^a	40.7±4.9 ^a

¹ Mean±SE. Experiments were repeated three times.

^{ab} Values in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 3. Effect of sperm concentration of liquid boar semen on *in-vitro* fertilization of pig oocytes matured in NCSU23 medium and inseminated in modified Tris buffer medium (mTBM)

Sperm concentration ($\times 10^6$ /ml)	No. of oocytes inseminated	% of oocytes penetrated ¹	% of polyspermic oocytes ¹	% of oocytes with male pronucleus ¹
1	58	22.2 \pm 4.0 ^b	10.7 \pm 0.6 ^c	13.5 \pm 0.9 ^b
2	59	50.8 \pm 5.8 ^a	13.3 \pm 1.7 ^c	43.9 \pm 2.5 ^a
4	58	50.9 \pm 3.2 ^a	19.5 \pm 1.9 ^b	45.4 \pm 2.0 ^a
6	61	55.4 \pm 5.0 ^a	24.9 \pm 2.0 ^a	46.7 \pm 1.7 ^a
10	78	65.3 \pm 3.0 ^a	27.3 \pm 1.6 ^a	48.1 \pm 1.9 ^a

¹ Mean \pm SE. Experiments were repeated three times.

^{abc} Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

자침입을 그리고 응성전핵형성율이 높은 경향이있다. 4×10^6 /ml 정자농도에서는 응성전핵형성율이 다정자침입을 보다 높게 나타났으나, 기타 정자농도에서는 응성전핵형성율이 다정자침입을 보다 높게 나타났다. 본 시험의 결과도 Table 1과 같이 실용화에 문제점이 있는 것으로 나타났다.

3. NCSU-23 성숙배지에서 성숙한 난포란을 m-TBM 수정배지에서 액상정액으로 체외수정한 결과

NCSU-23 성숙배지와 mTBM 수정배지에서 액상정액의 정자주입 농도가 체외수정에 미치는 영향을 살펴보면 Table 3에 나타난 바와 같이 1×10^6 /ml의 정자농도가 2×10^6 /ml~ 10×10^6 /ml의 정자농도 보다도 정자침입율, 다정자침입율 그리고 응성전핵형성율이 낮았다. 본 실험의 결과를 보면 액상정액의 경우 2×10^6 /ml~ 10×10^6 /ml의 정자농도로 체외수정을 할 경우 실용화의 가능성이 있음을 알 수 있었다.

IV. 고 찰

원정액을 이용한 체외수정시 Yoshida 등 (1992)은 돼지 난포액이 포함된 mTCM-199과 mWaymouth MB 752/1 성숙배지에서 성숙된 난포란을 mTCM-199 수정배지에서 $2.5 \sim 5 \times 10^4$ /ml 최종정자농도로 체외수정시켰을 때 정자침투율은 각각 87과 94%, 그리고 응성전핵형성율은 63과 91%라고 보고하였다.

Wang 등 (1991)은 동결-융해 정자로 mTCM-199 성숙배지에서 성숙된 난포란을 mTBM 수정배지에서 최종정자농도가 $25 \sim 50 \times 10^6$ /ml 되도록 하여 체외수정한 결과 정자침투율은 85~89%, 다정자침입율은 62~67%, 그리고 응성전핵 및 자성전핵형성율은 5~24%였다고 보고하였다.

Abeydeera와 Day (1997)는 BF5회석액을 이용한 동결정액 (Purse과 Johnson, 1975)으로 NCSU-23 성숙배지에서 성숙된 난포란을 최종정자농도가 1×10^5 , 5×10^5 그리고 1×10^6 /ml 되도록 하여 12시간 공배양한 결과 정자침입율이 각각 39.9, 83.5 그리고 86.9%, 다정자침입율이 각각 16.2, 57.2 그리고 64.4%, 그리고 응성전핵형성율이 91.9, 88.5 그리고 92.9%라고 보고하였다.

Coy 등 (1999)은 BTS회석액을 이용한 액상정액으로 mTCM-199 성숙배지에서 성숙한 난포란을 mTCM-199 수정배지에서 최종정자농도가 1×10^4 , 5×10^4 , 2.5×10^5 그리고 5×10^5 /ml 되도록 하여 18시간 공배양한 결과 정자침입율은 각각 20.6, 56.7, 90.7 그리고 99.1%, 다정자침입율은 각각 42.8, 52.7, 70.1 그리고 91.2% 그리고 응성전핵형성율은 57.1, 61.8, 57.5 그리고 71.9%라고 보고하였으며, mWaymouth MB 752/1 성숙배지와 mTCM-199 수정배지에서도 mTCM-199 성숙배지와 비슷한 경향을 나타낸다고 보고하였다.

이상의 연구결과들과 본 연구결과를 종합해 볼 때 미성숙 난포란의 체외성숙 후 정자침입율과 다정자침입율은 증모돈, 난포란의 체외성숙방법, 정

자농도 (Wang 등, 1991; Yoshida 등, 1992; Abeydeera와 Day, 1997; Coy 등, 1999)와 정액의 처리 방법 등에 따라 다를 수 있음이 입증되었다.

Coy 등 (1999)에 의하면 응성전핵 형성율은 종모돈과 난포란 성숙방법에 따라 다를 수 있으나 정자농도와는 관계가 없다고 하였다. 그러나 본 시험의 결과는 어느 일정수준 이상에서 정자농도가 높은 것이 응성전핵 형성율이 높았다. 결론적으로 성숙난포란을 mTBM 수정배지로 체외수정한 결과는 mTCM-199 및 mWaymouth MB 752/1 성숙배지에 비하여 NCSU 성숙배지가 우수하였다. 또한 BTS 희석액으로 5일 보존한 액상정액의 체외수정시 최종정자농도는 NCSU 성숙배지와 mTBM 수정배지 조합에서 $2\sim4\times 10^6/\text{ml}$ 이었다.

V. 요약

본 연구는 mTCM-199, mWaymouth MB 752/1 그리고 NCSU-23 성숙배지에서 성숙시킨 난포란을 mTBM 수정배지에서 액상정액의 정자를 이용하여 주입정자 농도별로 체외수정시킴으로써 액상정액을 이용한 새로운 체외수정 방법을 개발하고자 실시하였다.

미성숙 난포란은 0.5 ml의 성숙배지에 각 well 당 30~40개씩 적하하였다. 액상정액 제조용 정액은 90% 이상의 운동성을 가진 농후정자부분을 사용하였으며 정액채취 후 2시간 동안에 22~24°C의 실온까지 냉각시켰다. 실온까지 냉각한 정액은 BTS 희석액으로 $2\times 10^8/\text{ml}$ 정자농도로 조정하여 100 ml 플라스틱병에 30 ml씩 주입하여 17°C에서 5일 보관하였다. 5일 보관후 운동성이 70% 이상인 정자를 체외수정에 이용하였다. 38.5°C, 5% CO₂, 95% 공기로 조절된 CO₂ 배양기에서 44시간 성숙 후 cumulus cell들이 제거된 성숙 난포란은 0.5 ml의 mTBM 수정배지에 30~40개씩 적하하고 최종정자농도를 1, 2, 4, 6 그리고 $10\times 10^6/\text{ml}$ 되도록하여 주입하고 6시간 동안 수정시켰다. 체외수정시킨 수정란들은 수정 후 6시간 동안 0.5 ml의 NCSU-23 배양배지에서 배양한 후 정자침입율, 다정자침입율 그리고 응성전핵 형성율을 조사하였다.

mTCM-199, mWaymouth MB 752/1 그리고 NCSU-23 성숙배지에서 성숙시킨 난포란을 mTBM 수정배지에서 액상정액으로 체외수정한 결과 NCSU-23 성숙배지에서 성숙한 난포란이 응성전핵형성율이 높았고 다정자침입율이 낮았다. NCSU-23 성숙배지에서 성숙한 난포란을 mTBM 수정배지에서 수정할 경우 최적정자농도는 $2\sim4\times 10^6/\text{ml}$ 이었으며, 정자침입율은 50.8~50.9%, 다정자침입율은 13.3~19.5% 그리고 응성전핵형성율은 43.9~45.4%였다.

결론적으로 NCSU-23 성숙배지에서 성숙되고 mTBM 수정배지에서 수정된 난포란은 mTCM-199이나 mWaymouth MB 752/1 성숙배지에서 성숙되고 mTBM 수정배지에서 수정된 난포란보다 우수한 체외수정 결과를 나타내었다. 17°C에서 5일 동안 보존한 액상정액으로 NCSU-23 배지에서 성숙한 난포란을 체외수정하기 위한 최적정자농도는 $2\sim4\times 10^6/\text{ml}$ 이었다.

VI. 인용문헌

1. Abeydeera, L. R. and Day, B. N. 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57:729-734.
2. Coy, P., Martinez, E., Ruiz, S., Vazquez J. M., Roca, J. and Matas, C. 1993. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pig. *Theriogenology* 40: 539-546.
3. Coy, P., Ruiz, S., Romar, R., Campos, I. and Gadea, J. 1999. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology* 51:799-812.
4. 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. Fertil.* 98:179-185.

5. Funahashi, H., Stumpf, T. T., Terlouw, S. L., Cantley, T., Rieke, A. and Day, B. N. 1994a. Developmental ability of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 41:1425-1433.
 6. Funahashi, H., Cantley, T., Stumpf, T. T., Terlouw, S. L., Rieke, A. and Day, B. N. 1994b. *In vitro* development of *in vitro*-matured pig oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 50:1072-1077.
 7. Funahashi, H., Kim, N. H., Stumpf, T. T., Cantley, T. and Day, B. N. 1996. Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Biol. Reprod.* 54:1412-1419.
 8. Kikuchi, K., Nagai, T., Kashiwazaki, N., Ikeda, H., Nouguchi, J., Shimada, A., Soloy, E. and Kaneko, H. 1998. Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 50:615-623.
 9. Long, C. R., Dobrinsky, J. R. and Johnson, L. A. 1999. *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. *Theriogenology* 51:1375-1390.
 10. Mattioli, M., Galeati, G. and Seren, E. 1988. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res.* 20:177-183.
 11. Mattioli, M., Bacci, M. L., Galeati, G. and Seren, E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 31:1201-1207.
 12. Nagai, T., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. and Hanada, A. 1988. *In-vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 84:585-591.
 13. Pursel, V. G. and Johnson, L. A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40:99-102.
 14. Rath, D., Niemann, H. and Tao, T. 1995. *In vitro* maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo yield *in vitro*. *Theriogenology* 44:529-538.
 15. SAS/STAT. 1996. SAS user guide. release 6.12 edition, SAS Inst. Inc., Cary NC.
 16. Wang, W. H., Niwa, K. and Okuda, K. 1991. *In vitro* penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 93:491-496.
 17. Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Cantley, T. C. and Day, B. N. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 111:101-108.
 18. Yoshida, M. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49:711-718.
 19. 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.
 20. Yoshida, M., Ishizaki, Y. and Kawagishi, H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 88:1-8.
 21. Yoshida, M., Ishizaki, Y. and Pursel, V. G. 1992. Effects of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 31:68-71.
 22. Zheng, Y. S. and Sirard, M. A. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 37:779-790.
- (접수일자: 2001. 12. 21. / 채택일자: 2002. 1. 28.)