韓國家畜繁殖學會誌 26(1) : 17~23 (2002)
Korean J. Animal Reprod.

체외성숙 돼지 난포란의 액상정액을 이용한 체외수정

박 창 식† · 이 영 주
충남대학교 동물자원학부

In Vitro Fertilization of Pig Oocytes Matured *In-Vitro* by Liquid Boar Spermatozoa

Park, C. S.† and Y. J. Yi
Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University

ABSTRACT

The present study was carried out to investigate the effects of the maturation media such as a modified TCM-199 (mTCM-199) medium, modified Waymouth MB 752/1 (mWaymouth MB 752/1) medium or NCSU-23 medium on penetrability of pig oocytes by liquid boar sperm. Oocytes (30~40) were transferred into each well of a Nunc 4-well multidish containing 0.5 ml maturation medium. When immature pig oocytes were cultured in mTCM-199, mWaymouth MB 752/1 and NCSU-23 maturation media for 44 h in 5% CO_2 in air at 38.5℃, the germinal vesicle breakdown (GVBD) rates of the oocytes were 95.6, 94.1 and 94.9%, respectively, and the maturation rates (metaphase Ⅱ) of oocytes were 92.5, 90.1 and 91.1%, respectively. No differences were observed among the maturation media. The sperm -rich portion of ejaculates with greater than 90% motile sperm were used in the experiment. The semen was cooled 22 to 24℃ 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℃ 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, cumulus cells were removed and oocytes (30~40) coincubated for 6 h in 0.5 ml mTCM-199 and mTBM fertilization media with 2×10^6/ml sperm concentration. At 6 h after IVF, oocytes were transferred into 0.5 ml mTCM-199 and NCSU-23 culture media for further culture 6 or 42 h. Sperm penetration, polyspermy and male pronuclear formation of oocytes at 12 h after IVF, and developmental ability of oocytes at 48 h after IVF were evaluated. The oocytes in combination with NCSU-23 medium for maturation and mTBM medium for IVF increased male pronuclear formation (48.0%) compared to those in combination with mTCM-199 media for maturation and IVF, and mWaymouth MB 752/1 medium for maturation and mTCM-199 medium for IVF. The rates of cleaved embryos (2~4 cell stage) at 48 h after IVF were 24.1% in combination with mTCM-199 media for maturation, IVF and culture,

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

43.6% in combination with mWaymouth MB 752/1 medium for maturation and mTCM-199 media for IVF and culture, and 71.2% in combination with NCSU-23 medium for maturation, mTBM medium for IVF and NCSU-23 medium for culture. In conclusion, we found out the oocytes matured *in vitro* were fertilized by liquid boar sperm stored in BTS extender at 17℃ for 5 days. We recommend the simple defined NCSU-23 medium for nuclear maturation, mTBM medium and liquid boar sperm for IVF, and NCSU-23 medium for embryo culture.

(Key words: *In vitro* fertilization, Pig oocyte, Liquid boar spermatozoa, Maturation, Culture)

Ⅰ. 서 론

돼지에서 *in vitro*에서 성숙시킨 난포란을 체외수정시켜 정상자돈을 생산한 결과가 Mattioli 등 (1989)에 의해서 보고됨으로써 양돈업에서 체외수정기술의 실용화 가능성을 나타내었다. 그러나 돼지에서의 체외수정은 체내 수정과는 달리 다정자침입과 전핵형성율 저하 등 해결해야할 많은 문제점을 내포하고 있다. 돼지의 경우 이러한 현상을 극복하여 난포란의 체외성숙율, 다정자침입율 그리고 웅성전핵형성율을 개선하기 위한 다각적인 연구가 수행되고 있다. 미성숙 돼지 난포란의 체외성숙과 배양을 위해서는 mTCM-199, mWaymouth MB 752/1 그리고 mTLP (Yoshida 등, 1992a, b; Abeydeera 등, 1998) 배지들과 NCSU-23 (Abeydeera와 Day, 1997; Abeydeera 등, 1998)배지가 많이 사용되고 있다. 수정배지로는 TCM-199 수정배지 (Coy 등, 1993; 1999)와 mTBM (modified Tris-buffered medium) 수정배지가 일반적으로 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 (1989), Yoshida 등 (1990), Zheng과 Sirard (1992), Funahashi와 Day (1993) 그리고 Rath 등 (1995)에 의해서 보고되었다.

최근에는 동결-융해 정자를 이용한 체외수정 방법 (Nagai 등, 1988; Wang 등, 1991; Abeydeera와 Day, 1997)이 개발되었고, BTS (Beltsville Thawing Solution) 희석액에 보존된 액상정액의 정자를 이용한 체외수정 방법이 Coy 등 (1999)에 의해서 보고되었다. 앞으로는 액상정액을 이용한 돼지의 인공수정이 확대될 것임으로 액상정액의 정자를 이용한 체외수정의 방법도 개발할 필요성을 갖게 되었다.

따라서 본 연구는 지금까지 많이 사용되고 있는 체외성숙 배지를 비교 검토하고 액상정액을 이용한 체외수정 방법을 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 kg 내외)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℃)에 담아 1~2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포란은 25.0 mM의 $NaHCO_3$를 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-PVA 액과 희석하여 60×15 mm의 tissue culture dish (Falcon, USA)에 옮긴 후 실체현미경 (20~40×)하에서 난세포질이 균일하고 난구세포의 부착상태가 양호한 것만을 체외성숙에 이용하였다.

2. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란의 체외성숙은 ① TCM-199 with Earle's salt에 26.19 mM $NaHCO_3$, 0.9 mM sodium

pyruvate, 10 μg/ml insulin, 2 μg/ml vitamin B_{12}, 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 752/1에 26.66 mM $NaHCO_3$, 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℃, 5% CO_2, 95% 공기 및 100% 습도로 조절된 CO_2 배양기내에서 평형시킨 후 well당 30~40개의 미성숙 난포란을 적하하여 모두 44시간 배양하여 성숙을 유도하였다. 체외성숙 배양액들은 pH 7.4, 삼투압은 280~310 mOsmol로 조정하여 사용하였으며, 체외성숙 배양액에 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 1차여과 하였다. 그리고 재차 0.22 μm millipore filter로 여과한 후 분주하여 −20℃에 보관하면서 사용하였다.

3. 정자의 준비 및 체외수정

mTCM-199 성숙배지와 mWaymouth 성숙배지에서 배양시킨 성숙 난포란은 ① TCM-199 with Earle's salt에 26.19 mM $NaHCO_3$, 0.9 mM sodium pyruvate, 25 mM Hepes, 2.92 mM calcium lactate, 2.0mM caffeine, 0.4% BSA (w/v), 75.0 μg/ml penicillin G sodium 그리고 50.0 μg/ml streptomycin sulfate를 첨가한 mTCM-199 체외수정 배지에 체외수정하였고, NCSU-23 성숙배지에서 배양시킨 성숙 난포란은 ② 10.0 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2.0 mM caffeine, 0.1% BSA (fraction V; Sigma A7888), 75.0 μg/ml penicillin G sodium, 50.0 μg/ml streptomycin sulfate가 함유된 mTBM 수정배지를 이용하여 체외수정 하였다. 상기의 체외수정 배지는 pH 7.8, 삼투압 290~300 mOsmol로 조정하여 사용하였다.

각각의 성숙배지에서 체외배양 시킨 난포란들은 0.1% hyaluronidase가 포함된 수정배지에 노출시켜 cumulus cells를 제거한 뒤, 0.1% hyaluronidase가 함유되지 않은 수정배지에 세 번 washing 하였다. 그리고 4-well polystyrene culture dish에 수정배지를 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 2~3시간동안 38.5℃, 5% CO_2, 95% 공기 및 100% 습도로 조절된 CO_2 배양기내에서 평형시킨 수정배지에 well당 30~40개의 성숙 난포란을 적하하고 수정 전 약 30분간 CO_2 배양기에서 평형시켰다.

체외수정을 위한 정자는 BTS 보존액에 2×10^8/ml의 정자농도로 17℃에서 5일간 보존시킨 30 ml 액상정액을 이용하였다. 우선 액상정액을 잘 흔들어 섞어 2 ml를 취하고 mTLP-PVA로 1500 rpm에서 5분간 두 번 washing 한 후 최종적으로 수정배지 5 ml를 가하여 희석하였다. 그리고 성숙배지별 난포란이 침지되어 있는 수정배지에 정자농도가 2×10^6/ml가 되도록 주입하고 CO_2 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 배양배지 (Wang 등, 1997)에 세 번 washing하고 4-well polystyrene culture dish에 NCSU-23 배양배지를 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 2~3시간동안 38.5℃, 5% CO_2, 95% 공기 및 100% 습도로 조절된 CO_2 배양기내에서 평형시킨 배지에 수정란들을 옮겼다. 그리고 체외배양 6시간 즉 체외수정 후 12시간 성숙배지별 난포란에 대한 정자침입율, 다정자 침투율, 웅성전핵 형성율을 조사하였고, 수정 후 48시간 배양하여 난할율을 조사하였다.

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 고정한 후 1% acetic-orcein으로 염색하여 위상차 현미경 ×200 그리고 ×400에서 성숙배지별 성숙난포란의 정자침입율, 다정자침투율, 웅성전핵 형성율을 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. 결과 및 고찰

1. 성숙배지 종류별 미성숙 난포란의 성숙효과

서로 다른 성숙배지별 미성숙 돼지 난포란의 성숙효과는 Table 1에 나타난바와 같이 mTCM-199, mWaymouth MB 752/1 그리고 NCSU-23의 성숙배지간에 GVBD 발생율과 MⅡ까지의 성숙율에 있어서 차이가 없었다. mTCM-199 배지로 87~92%, mWaymouth MB 752/1 배지로 89~94% (Yoshida 등, 1990, 1992a, 1993; Wang 등, 1997) 그리고 NCSU-23 배지로 93% (Wang 등, 1997)의 MⅡ까지의 성숙율을 나타내었다는 보고와 본 실험의 결과와는 비슷한 경향을 나타내었다.

2. 미성숙 난포란의 액상정액을 이용한 체외수정시 성숙 및 수정배지의 효과

미성숙 난포란의 액상정액을 이용한 체외수정시 서로 다른 성숙 및 수정배지의 효과는 Table 2에 나타난 바와 같다. NCSU-23 성숙배지와 mTBM 수정배지를 이용하였을 때 웅성전핵형성율이 48.0%로써 mTCM-199 성숙배지와 수정배지 또는 mWaymouth MB 752/1 성숙배지와 mTCM-199 수정배지를 이용하였을 때보다 웅성전핵형성율이 높았다. 그러나 정자침입율과 다정자침입율은 NCSU-23 성숙배지와 mTBM 수정배지에서 각각 79.5%와 19.1%로 다른 성숙 및 수정배지에 비하여 통계적 유의성은 없었으나 좋은 결과를 나타내었다.

Wang 등 (1991)은 동결-융해 정자로 mTCM-199 성숙배지에서 성숙된 난포란을 mTBM 수정배지에서 최종정자농도가 $20\sim50\times10^6$/ml 되도록 하여 체외수정한 결과 정자침투율은 85~89%, 다정자침입율은 62~67%, 그리고 웅성전핵 및 자성전핵 형성율은 5~24%였다고 보고하였다. Abeydeera와 Day (1997)는 BF5 희석액을 이용한 동결정액 (Pursel과 Johnson, 1975)으로 NCSU-23 성숙배지에서 성숙된 난포란을 mTBM 수정배지에서 최종정자농도가 1×10^5, 5×10^5 그리고 1×10^6/ml 되도록 12시간 공배양한 결과 정자침입율이 각각 39.9, 83.5 그리고 86.9%, 다정자침입율이 각각 16.2, 57.2 그리고 64.4%, 그리고 웅성전핵형성율이 91.9, 88.5 그리고 92.9%라고 보고하였다. Coy 등 (1999)은 BTS 희석액을 이용한 액상정액으로 mTCM-199 성

Table 1. Effect of different maturation media during IVM of pig oocytes

Maturation medium	No. of oocytes	No. of oocytes			GVBD (%)[1]	MⅡ (%)[1]
		GV[2]	GVBD~MⅠ[2]	MⅡ[2]		
mTCM-199	184	8	6	170	95.6±1.7	92.5±2.2
mWaymouth MB 752/1	190	11	8	171	94.1±1.8	90.1±2.4
NCSU-23	181	9	7	165	94.9±2.0	91.1±2.5

[1] Mean±SE. Experiments were repeated three times.

[2] GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MⅠ: metaphase Ⅰ and MⅡ: metaphase Ⅱ.

Table 2. Effect of different maturation media on fertilization parameters of pig oocytes inseminated in mTCM-199 and mTBM

Maturation medium	Fertilization medium	No. of oocytes inseminated	% of		
			Penetrated[1]	Polyspermic[1]	Male pronucleus[1]
mTCM-199	mTCM-199	149	62.2±11.4	22.7± 9.7	27.8±4.0[b]
mWaymouth MB 752/1	mTCM-199	149	67.1±12.4	26.2±12.8	36.6±8.9[ab]
NCSU-23	mTBM	130	79.5± 6.2	19.1± 8.9	48.0±3.7[a]

[1] Mean±SE. Experiments were repeated three times.

[ab] *Values in the same column with different superscripts differ significantly* ($P<0.05$).

숙배지에서 성숙한 난포란을 mTCM-199 수정배지에서 수정한 결과 정자침입율과 다정자침입율은 종모돈, 난포란의 체외성숙 방법, 정자농도, 정액의 처리방법에 따라 다르며, 웅성전핵 형성율은 종모돈과 난포란의 체외성숙 방법에 따라 다를 수 있다고 보고한 바, 본 시험의 결과와 잘 일치하고 있다.

3. 미성숙 난포란의 액상정액을 이용한 체외수정 시 성숙, 수정 및 배양배지가 배발달에 미치는 영향

체외성숙 난포란의 액상정액을 이용한 체외수정 후 48시간 체외배양한 효과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 2~4세포기까지의 난할율은 NCSU-23 성숙배지, mTBM 수정배지 및 NCSU-23 배양배지를 이용한 것이 71.2%로 mTCM-199 성숙, 수정 및 배양배지를 이용한 24.1%나 mWaymouth MB 752/1 성숙배지, mTCM-199 수정 및 배양배지를 이용한 43.6%보다 우수한 것으로 나타났다.

이와 같은 결과는 NCSU-37 성숙배지에서 성숙한 난포란을 mTLP-PVA 수정배지에서 수정 후 BECM-6, BECM-7, NCSU-23 그리고 NCSU-23aa에서 배양하였을 때 배양된 난포란의 난할율이 44.9%라는 Long 등 (1999)의 보고와 비교하여 볼 때 NCSU-23 성숙배지, mTBM 수정배지 그리고 NCSU-23 배양배지를 이용한 조합이 우수한 성적을 나타내었다.

Ⅳ. 요 약

본 연구는 지금까지 돼지 난포란 성숙을 위해서 많이 사용하고 있는 mTCM-199, mWaymouth MB 752/1 그리고 NCSU-23 성숙배지를 비교하고 액상정액을 이용한 체외수정 방법을 개발하고자 실시하였다. 미성숙 난포란은 0.5 ml의 성숙배지에 각 well 당 30~40개씩 적하하였고, 38.5℃, 5% CO_2,

Table 3. Developmental ability of pig oocytes matured, inseminated and cultured in different media[1]

Maturation medium	Fertilization medium	Culture medium	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved (%)[2]
				2~4 cell stage
mTCM-199	mTCM-199	mTCM-199	53	13 (24.1±7.6[c])
mWaymouth MB 752/1	mTCM-199	mTCM-199	59	28 (43.6±9.4[b])
NCSU-23	mTBM	NCSU-23	46	32 (71.2±3.4[a])

[1] Embryos were matured for 44 h, inseminated for 6 h after maturation and cultured for 48 h after insemination.

[2] Mean±SE. Experiments were repeated three times.

[abc] Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

95% 공기로 조절된 CO_2 배양기에서 44시간 성숙시켰다. 미성숙 난포란을 mTCM-199, mWaymouth MB 752/1 그리고 NCSU-23 성숙배지에서 44시간 배양한 결과 GVBD 발생율은 각각 95.6, 94.1 그리고 94.9%였으며, MⅡ단계까지의 성숙율은 각각 92.5, 90.1 그리고 91.1%였다. 성숙배지별, GVBD 발생율과 MⅡ까지의 성숙율간에 유의성은 인정되지 않았다. 액상정액의 제조용 정액은 90% 이상의 운동성을 가진 농후정자부분을 사용하였으며 정액 채취후 2시간 동안에 22~24℃의 실온까지 냉각시켰다. 실온까지 냉각한 정액은 BTS 희석액으로 2 $\times 10^8$/ml 정자농도로 조정하여 100 ml 플라스틱병에 30 ml씩 주입하여 17℃에서 5일간 보관하였다. 5일 보관 후 운동성이 70% 이상인 정자를 체외수정에 이용하였다. 성숙 후 cumulus cell들이 제거된 성숙난포란은 0.5 ml의 mTCM-199 또는 mTBM 수정배지에 30~40개씩 적하하고, 최종정자농도를 2 $\times 10^6$/ml 되도록하여 6시간 동안 수정시켰다. 체외수정시킨 수정란들은 0.5 ml의 NCSU-23 배양배지에서 수정 후 6시간 배양하여 정자침입율, 다정자침입율 그리고 웅성전핵형성율을 조사하였고, 수정 후 48시간 배양하여 난할율을 조사하였다. NCSU-23 성숙배지와 mTBM 수정배지를 이용하였을 때 웅성전핵형성율이 48.0%로써 mTCM-199 성숙배지와 수정배지 또는 mWaymouth MB 752/1 성숙배지와 mTCM-199 수정배지를 이용하였을 때보다 웅성전핵형성율이 높았다. 2~4세포기까지의 난할율은 mTCM-199 성숙, 수정 및 배양배지에서 24.1%, mWaymouth 752/1 성숙배지, mTCM-199 수정 및 배양배지에서 43.6%, 그리고 NCSU-23 성숙배지, mTBM 수정배지 및 NCSU-23 배양배지를 이용한 것이 71.2%였다.

이상의 결과를 종합하면 BTS 희석액으로 17℃에서 5일 보존한 액상정액으로 체외수정이 가능함을 입증하였고, NCSU-23 성숙배지, mTBM 수정배지 및 NCSU-223 배지가 미성숙 난포란의 성숙, 수정 및 배양에 우수한 배지임을 입증하였다.

Ⅴ. 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. Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Prather, R. S. and Day, B. N. 1998. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol. Reprod. 58:1316-1320.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. SAS/STAT. 1996. SAS user guide. release 6.12 edition, SAS Inst. Inc., Cary NC.
12. 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.
13. 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.
14. Yoshida, M. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. Jpn. J. Vet. Sci. 49: 711~718.
15. 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.
16. 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.
17. Yoshida, M., Ishizaki, Y. and Pursel, V. G. 1992a. Effects of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 31:68-71.
18. Yoshida, M., Ishizaki, Y., Kawagishi, H., Bamba, K. and Kojima, Y. 1992b. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig ooytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 95:481-488.
19. 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.
20. 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.)