

PVA, PVP 및 pFF를 첨가한 체외성숙 한정배지가 미성숙 돼지 난포란의 성숙과 배발달에 미치는 영향

김인덕 · 김세나 · 한숙기 · 석호봉[†]
단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

Effects of Development and Viability of Pig Oocytes Matured in Defined Medium Containing PVA, PVP and pFF

I. D. Kim, S. N. Kim, S. K. Han and H. B. Seok[†]

Department of Animal Science, College of Bio-Life Science, Dankook University

SUMMARY

This study was conducted to develop a serum-free, defined medium of IVM of pig oocytes. The TCM-199 with supplemented with polyvinylalcohol(PVA), polyvinylpyrrolidone(PVP) and porcine follicular fluid(pFF) were used as basal medium. The effects of the these additives on the rates of maturity and development under in-vitro fertilization and *in vitro* culture were examined and subsequently considered on the possibilities be substituted for the bovine serum albumin(BSA).

Maturation rate of pig oocytes in IVM media containing PVA(82.4%), pFF(89.4%) and BSA(90.0%) were significantly higher($P<0.05$) than that of PVP(78.6%). Cleavage rate after IVF of PVP(64%) was significantly lower($P<0.05$) than these of PVA(73%), pFF(77%) and BSA(73%) supplements. *In vitro* development rates to morulae and blastocyst on PVP(54%) were also significantly lower($P<0.05$) than these of the supplements of PVA(63%), pFF(69%) and BSA(65%). In comparison of maturation and fertilization rates of pig oocytes in each supplements, the maturity rates of PVA(82.4%), pFF(89.4%) and BSA(90.0%) were significantly lower($P<0.05$) than that of PVP(72.4%) and while, the fertilization rates of pFF(87.1%) and BSA(89.1%) were significantly higher($P<0.05$) than these of PVA(78.0%) and PVP(70.6%). It may be concluded that PVA and pFF can be substituted for BSA in medium for culturing pig oocytes; however, it may be considered that PVP were limited to for BSA in the *in vitro* culture of the embryos.

(Key words : pig oocytes, PVA, PVP, pFF, BSA, *in vitro* culture)

서 론

난포란의 체외성숙에 관한 연구는 Pincus와 Enzmann (1935)에 의해 난포에서 채취한 토끼 난포란을 체외에서 배양하면 성숙분열이 재개된다는

보고에서 비롯되었다. 그 이후, 실험동물과 대가축 동물 등에서 난포란의 체외성숙 수정에 대한 연구가 행해져 배이식에 의한 산자를 얻는 등 이미 소에서는 실용화 단계에 와 있다. 돼지에 있어서 미성숙 난포란의 체외성숙은 Edwards 등(1965)에 의

[†] Correspondence : E-mail : hobong@dankook.ac.kr

하여 체외에서 43~46시간 동안 체외배양함으로써 제2성숙분열 중기(metaphase II)에 도달한다는 것이 처음으로 보고된 이래 Moltik과 Fulka등(1974)이 체외성숙과 체외수정을 최초로 시도하여 Iritani 등(1978)이 성공하였으며, Mattiolo 등(1989)이 최초로 산자를 보고하였다.

돼지에서는 체외성숙, 수정에 의해 산자를 얻는 예는 타 동물 종에 비해 극히 적은데, 그 이유는 돼지의 체외수정에는 소에 비해 polyspermy가 빈번히 일어나고, 난자 내에서 정자의 응성정핵의 발달이 불완전하여 수정란의 체외 발육능 정지 현상인 4-cell block이 일어나고, 난분할도 정상으로 진행되지 않는다.

돼지의 미성숙 난포란의 체외성숙용 배지는 실험실마다 다르게 사용되고 있는데, 일반적으로 modified TCM-199 성숙배지(Mattioli 등, 1989 ; Yoshida 등, 1990 ; Wang 등, 1991 ; Funahashi 등, 1994 a,b)와 BSA-free NCSU-23 성숙배지(Funahashi 등, 1996)가 많이 사용되고 있다. 그 외에 modified Waymouth MB 752/1 성숙배지(Kikuchi 등, 1998)가 사용되고 있고 수정배지로는 TCM-199 수정배지(Coy 등, 1993 ; 1999)와 mTBM 수정배지(Abeydeera와 Day, 1997)가 일반적으로 사용되고 있다. 초기 배발생 배지로는 BECM-6, BECM-7, NCSU-23, 그리고 NCSU-23aa(Long 등, 1999)등이 사용되고 있다.

이러한 성숙에 있어서 여러 가지 연구들이 이루어져 왔는데, 채취된 난구세포복합체의 난구세포의 유무(Fukui 와 Sakuma, 1980)와 구조(Lebfried 와 First, 1979 ; Dekel과 Phillips, 1979) 및 역할(Chen 등, 1993)에 대한 연구와 수많은 factor가 내재되어 있는 혈청의 첨가(Choi 등, 1997 ; Yamashita와 Hoshi, 1996)와 무첨가에 따른 효과 그리고 혈청의 비동화 여부(Pinyopummintr와 Bavister, 1994) 등에 의해 체외성숙을 유도하는 실험 등이 이미 보고되었다. 혈청은 수정란의 체외 발생에 필요한 각종 에너지원과 성장 촉진 인자(Saito 등, 1984 ; Ogawa 등, 1987)를 함유하고 있을 뿐만 아니라 체외조건에서 난자의 유착과 경화를 방지해주는 특성(Kane, 1987)을 보유하고 있다. 반면 혈청은 수정란의 발생억제 인자(Ogawa와 Marrs, 1987)와 기형유발인자(Chatot 등, 1984)도 아울러 함유

하고 있음이 보고되었다. 또한 채취 경위(개체, 발정기, 연령, 질병 유무 등)에 따라 성분 변화가 현격하므로 효율적으로 이용하기에 많은 어려움이 있으므로 보다 더 단순하고 일정한 자극 효과를 유도하는 BSA의 대체 물질인 polyvinylalcohol(PVA, Biggers 등, 1997 ; Lee와 Funkui, 1996)와 polyvinylpyrrolidone (PVP, Cholewa와 Whitten, 1970)가 이용되어 그 역할이 인정된 바 있다.

본 연구는 성숙배양매지에 PVA, PVP, pFF의 첨가 효과와 BSA의 이용 효과를 비교함으로써 무혈청 첨가 상태에서의 돼지 미성숙 난포란의 성숙과 배발달에 미치는 영향을 파악하여 BSA 대체 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 미성숙 난포란자의 회수

난소는 도살직후 돼지에서 회수하여 35~37℃의 생리식염수가 담긴 보온병에 침지하여 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 생리 식염수로 난소 주위의 이물질과 혈액을 세척한 다음 난포액은 18-gauge로 장착된 10ml 주사기로 직경 2~6mm의 포상난포들로부터 흡입 회수한 후 15ml 원심분리관에 분주하여 10분간 정치시켰다. 원심분리관 하단의 침전물을 채취하여 TCM-199(Sigma-Aldrich Co., USA)배양액에서 난포구가 균일한 난포란만을 선택하여 다시 TCM-199로 3회 세척한 후 체외성숙배양에 이용하였다.

2. 난자의 체외성숙

체란된 난자는 형태학적으로 균일하고 세포질이 정상인 것만을 선택하여 체외성숙에 이용하였다. 성숙 배양액은 TCM-199(Sigma-Aldrich Co., USA)에 pyruvic acid(Sigma Chemical. Co., USA), gentamycin(Sigma Chemical. Co., USA), L-cysteine(Sigma-Aldrich Co., USA), β -estradiol(Sigma Chemical. Co., USA), FSH 그리고 여기에 ① 10% pFF (porcine follicular fluid), ② 0.1% PVA (polyvinylalcohol), ③ 0.1% PVP (polyvinylpyrrolidone)을 각각 첨가하였고, 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 40시간 동안 성숙배양을 실시하였다.

3. 체외성숙 난자의 핵 분열상 평가

체외성숙 40시간 후 핵상의 관찰은 0.1% hyaluronidase 용액에 난포란을 침지하여 glass pipette로 난구세포를 제거한 후 세포막이 생존한 난자만 고정하여 핵 분열상을 평가하였다. 고정은 10 μ g/ml의 Hoechst 33342 염색액이 첨가된 2.5% paraformaldehyde에 30분간 고정 후 slide에 정치시켜 형광 현미경 하에서 핵상을 관찰하였다. 핵의 형태에 따라 핵막이 뚜렷이 존재하는 것을 GV로 확인하였으며, chromosome이 적도판에 배열하거나 동시에 극체가 확인된 난자를 M I~M II로 판단하여 비교하였다(Fig. 1).

4. 정자의 준비 및 체외수정

성숙 배지에서 체외 배양시킨 난포란들은 0.1% hyaluronidase가 포함된 NaCl 113.1mM, KCl 3.0 mM, CaCl₂ 10.0mM, Tris 20.0mM, glucose 11.0 mM, Na-pyruvate 5.0mM, gentamycin 50 μ g/ml, 0.4% BSA (fatty acid free, Sigma), caffeine 5mM이 함유된 mTBM (modified Tris-buffered medium)에 노출시켜 cumulus cell을 제거한 뒤, 다시 mTBM 배지에 세 번 세척하여 준비하였다. 그리고 4-well cultured dish에 mTBM 배지를 0.5 ml씩 분주하고

mineral oil로 피복하여 수정 하루 전 충분히 평형시킨 수정 배지에 well당 40~50개의 난포란을 적하하고 수정 전 약 30분간 CO₂배양기에서 평형시켰다. 체외수정을 위한 정자는 동결정액을 percoll 처리를 한 후에 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유기시킨 정자 부유액을 성숙 난포란에 주입하여 6시간 수정시켰다.

5. 체외배양 및 우수 배아 선발

수정 후 cumulus cell을 0.1% hyaluronidase액을 이용해서 완전히 제거하고 pH 7.4, 280~300 mOsmol로 조정된 glucose-free NCSU 23 media에 3 회 세척하여 4 well culture dish에 glucose-free NCSU 23 media를 0.5 ml씩 분주하였다. Mineral oil로 피복하여 2~3시간 동안 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 조절된 배양기에서 평형시킨 배지를 준비하고, 수정란을 1일 동안 배양하여 할구의 분할된 상태로 각각의 전체 수정율을 비교하였으며, 그 후 5일 동안 배양시켜 육안으로 검정하였다. 최종 확인은 Hoechst 33342로 염색하여 정자의 침입, 자·응성전핵 형성, cell cleavage, morulae와 blastocyst 등의 수정과 배발달 여부를 각각 확인하였다(Fig. 2).

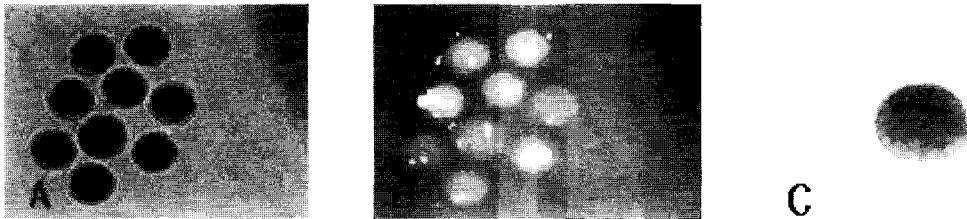


Fig. 1. Micrograms of pig oocytes matured (A) stained by Hoechst (B) and polarization of the oocytes (C).

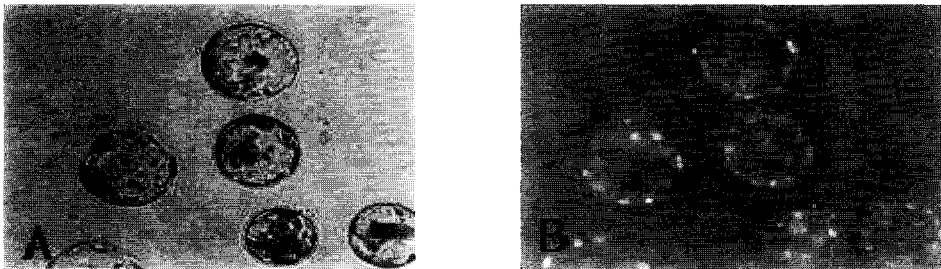


Fig. 2. Micrograms of blastocysts in IVC for five days (A) and stained by Hoechst (B).

6. 통계처리

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

결 과

1. 성숙배양액에 따른 난포란의 체외성숙

돼지 미성숙 난포란을 TCM-199 배양액에 각각의 PVA, PVP 그리고 pFF supplement를 첨가하여 5% CO₂ 조건하에서 40시간 동안 체외성숙을 유지한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 40시간 배양 후 PVA, PVP, pFF 그리고 BSA의 전체 핵 분할율은 각각 82.4%, 78.6%, 89.4%, 90.0%로 나타났으며, GV, M I~M II율은 PVA 첨가시 각각 15.1%, 84.9%, PVP 첨가시 각각 26.5%, 73.5%, pFF 첨가시는 각각 11.8%, 88.2% 그리고 BSA 첨가시는 각각 11.1%, 88.9%로 PVA, pFF, BSA 첨가시에는 모두 유사한 결과를 보였으나 PVP 첨가시에는 유의적으로 낮게 나타내었다($P < 0.05$). Fig. 3에서 pFF와 BSA 배양배지는 40시간 성숙된 미성숙 난포란이

Table 1. Maturation rate of pig oocyte in IVM media containing PVA, PVP, pFF and BSA

IVM medium	No. of oocytes examine	No of oocytes (%)		
		Cleaved	GV	M I~M II
PVA	193	159±8.8 (82.4)	24 (15.1)	135 (84.9) ^a
PVP	192	151±12.3 (78.6)	40 (26.5)	111 (73.5) ^b
pFF	170	152±5.3 (89.4)	18 (11.8)	134 (88.2) ^a
BSA (Control)	190	171±6.5 (90.0)	19 (11.1)	152 (88.9) ^a

^{a,b} Values with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

* Mean±standard error. Experiments were repeated nine times.

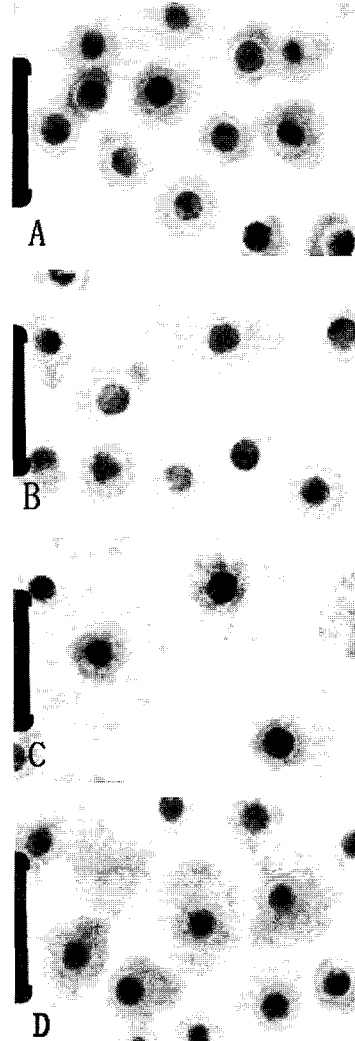


Fig. 3. Compared to porcine oocytes after three different IVM media maturation ; PVA(A), PVP(B), pFF(C) and BSA(D).

다른 처리군보다 높은 난구세포복합체(COC)의 발달 상태를 보였고, 반면에 PVA는 비교적 낮은 COC 상태를 나타내었다.

2. 성숙배양액에 따른 돼지 수정란의 배발달을
체외 성숙배양액의 첨가물에 따른 배발달율에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 전체 발달율은 PVA가 73%, PVP는 64%, pFF가 77% 그리고 BSA가 73%로 PVA, pFF는 BSA와 유사하게 나타났으나, PVP는 그 발달율이 다른 처리군들과 비교

Table 2. Cleavage rate of pig oocytes in IVF media containing PVA, PVP, pFF and BSA

IVM medium	No. of oocytes examine	No. of oocytes cleaved (%)	No. of IVF embryos developed to (%)				Morulae plus blastocysts (%)
			2~4	8~16	Morulae	Blastocysts	
PVA	300	219±5.4 (73) ^a	56 (26)	26 (12)	126 (58)	11 (5)	137 (63) ^a
PVP	320	205±13.2 (64) ^b	64 (31)	30 (15)	105 (51)	6 (3)	111 (54) ^b
pFF	311	240±3.1 (77) ^a	56 (23)	17 (7)	150 (63)	17 (7)	165 (69) ^a
BSA	304	222±8.8 (73) ^a	44 (20)	33 (14)	130 (59)	15 (7)	145 (65) ^a

^{a,b} Values with different superscripts were significantly different ($p<0.05$).

* Mean± standard error. Experiments were repeated nine times.

하여 유의적($P<0.05$)으로 낮은 결과를 보였다. 또한 각 처리구간에서 morulae와 blastocyst의 발달율을 비교해 보면 체외성숙 첨가물 중 PVA, pFF, BSA첨가시 각각 63%, 69%, 65%로 유사한 결과를 나타내었으나 PVP는 54%로 다른 두 가지 첨가물들과 비교하여 유의적으로 낮은 결과를 나타내었다 ($P<0.05$).

3. 성숙배지 첨가물에 의한 전체 성숙율과 수정율의 비교

체외 성숙배지 첨가물에 따른 전체 성숙율과 수정율을 비교해 본 결과 성숙율은 PVA, pFF 그리고 BSA 첨가시 각각 82.3%, 89.4%, 90%인 반면 PVP 첨가시는 72.4%로 유의적으로($P<0.05$) 낮은 결과를 보였다. 또한 수정율은 PVA, PVP, pFF, BSA 첨가시 각각 78.0%, 70.6%, 87.1%, 89.1%로 관찰되었는데, pFF가 BSA와 비슷한 결과를 보이며 다른 처리구에 비해 유의적인($P<0.05$) 차이를 나타내었다(Fig. 4).

고 찰

포유동물의 미성숙난자가 체외의 적당한 환경에서 감수분열을 재개한다는 사실이 밝혀진 이후 많은 연구자들이 배양조건을 개선하여 체내와 비슷한 수준으로 수정란을 생산하고자 노력하였음에

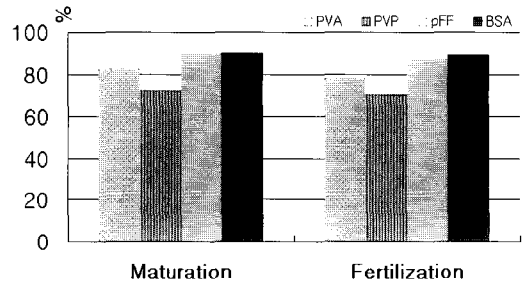


Fig. 4. Comparison of maturation and fertilization rate of pig oocytes in IVM containing PVA, PVP and pFF.

도 미성숙난자들이 배반포기까지 발달되는 비율은 아직 1/3정도에 불과하다고 보고하였다(Brackett와 Zuelke, 1993). 불완전한 세포질과 핵 성숙은 수정란 발달의 지연과 다정자 수정의 원인이 되고, 많은 연구에서 이러한 난자의 IVM을 개량하기 위해서 많은 실험을 수행하였다.

체외수정란의 배양액에는 주로 소의 혈청을 많이 사용하는데 이는 수정란의 저해하는 물질이 있으며(Gardner, 1994), 혈청의 대체 물질로 polyvinylpyrrolidone (PVP), polyvinylalcohol (PVA), transefrin, collagen, insulin 등을 사용하였으나 수정란의 발달에는 효과적이 못하였다(Takagi 등, 1991 ; Shamsuddin 등, 1994 ; Abeydeera 등, 2000 ; Kim 등, 2004 ; Hong 등, 2004). 한편, 배란 전 난자에 환경인 난포액(follicular fluid, FF)은 미성숙 난자

의 성숙을 억제했다는 보고도 있지만(Ayoub 와 Hunter, 1993), 그 억제 기능은 난포벽의 과립막세포에 의한 것이었다는 사실도 보고되어 있다(Sirard 와 Bilodeau, 1990 ; Romero와 Seidel, 1994).

Marchal 등(2001)의 연구에서는 돼지난포액(porcine follicular fluid, pFF)이 핵성숙에 자극적인 효과를 지니고 있으나, 난자의 정자침투율과 난할을 저하시키고 배반포 팽창률과 수정란의 발달능력을 감소시킨다고 보고하였다. 이러한 부정적인 연구 결과에도 불구하고 Vatzias 등(1999)의 연구에서는 pFF가 난자 성숙능력과 핵성숙을 개선을 위해 이용되었으며, 난자의 체외성숙에서는 cumulus 팽창을 체외수정에서는 응성전핵 형성을 활성화시켜 주는데, 이는 각각의 수정 능력과 발달능력 증진에 관계되어 있다고 하였다.

체외성숙 조건에 있어서, PVA 등의 고분자물질은 초기 mouse의 수정란에서 질소 고정과 단백질 합성을 위한 매개체로서 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, PVA는 defined media의 조성을 조절하거나 특정 물질에 의한 mechanism의 구멍을 위해 사용될 수 있으며, 초기배 수정란에서 요구되는 고정된 질소의 재료이며, 영양소로서의 기능을 가지고 있는 BSA의 대체효과를 지니고 있다고 하였다(Choi 등, 1999).

Eckert 등(1995)은 TCM-199를 기초 배지로 하여 FCS, BSA 혹은 PVA를 첨가물로 하여 소의 난포란을 체외성숙 배양한 후에 핵 성숙이나 세포질 성숙 그리고 난구세포복합체에 있어서 서로 유의적인 차이를 보이지 않았으나, PVA가 serum-free 첨가물로서 BSA와 FCS를 대체할 수 있다고 보고하였다.

Kim 등(1996)은 10%, 30% pFF 포함된 성숙배지가 0.3% PVP를 첨가한 배지와 유사한 배반포 발달율을 보였으며, 60% pFF에서는 오히려 0.3% PVP가 발달율이 높게 나타났다고 하였다. 이와 같이 PVA와 PVP가 BSA의 고분자 대체물질로서 이용되었으나, Ashwood-Smith 등(1971)과 Domoulin 등(1994)에 의해 PVP 성숙배지에서 포유류의 난포란을 배양시킨 결과 착상 전 수정란들의 독성이 확인되면서부터 PVA가 우선시 되어왔다.

본 실험에서도 혈청이 포함되지 않은 3가지의

다른 성숙배지인 PVA, PVP, pFF를 첨가물로서 이용하였는데, PVA, pFF, BSA 첨가 배지가 난포란의 핵 분할율(82.3%, 89.4%, 90.0%), MI~MII 분할율(84.9%, 88.2%, 88.9%) 그리고 상실배와 배반포의 형성율(63%, 69%, 65%)에 있어서 모두 유사한 결과를 나타낸 반면에 PVP (54%)는 유의적($P<0.05$)으로 낮은 성적을 보였다. 수정율의 경우는 pFF가 87.1%로 PVA, PVP (78.0%, 70.6%)보다 비교적 높은 결과를 나타내었다. 따라서 PVA와 pFF는 BSA의 대체 첨가물로서 이용이 가능할 것으로 생각되나, PVP의 경우 상기의 연구에서 보고된 독성 문제와 본 연구결과 등을 고려해 볼 때 대체물로서의 미흡한 점이 많아 이용에 제한이 따를 것이라 사료된다.

적 요

본 연구는 체외 성숙액인 TCM-199 배지를 기초로 무혈청첨가물인 PVA, PVP 및 pFF의 한정배지를 이용하여 돼지 미성숙난자의 체외성숙, 수정 및 배양 후 난자의 수정율과 배발달에 미치는 영향과 나아가 BSA 대체물로서의 이용 가능성을 알아보았다.

1. 무혈청 첨가물을 이용하여 난포란의 체외 성숙을 유기한 결과 PVA, PVP, pFF, BSA의 전체 분할율은 각각 82.4%, 78.6%, 89.4%, 90.0%로 나타났으며, GV, MI~MII율은 PVA 첨가시 각각 15.1%, 84.9%, PVP는 각각 26.5%, 73.5%, pFF는 각각 11.8%, 88.2%, BSA는 각각 11.1%, 88.9%로 PVA 혹은 pFF 첨가시에는 모두 BSA와 유사한 결과를 보였으나 PVP와는 유의적인 차이를 나타내었다($P<0.05$).
2. 체외 성숙된 난자를 수정시킨 후의 배발달율을 확인한 결과 전체 난할율은 PVA가 73%, PVP는 64.1% , pFF가 77.2%, BSA가 73%로 PVA와 pFF는 BSA와 유사하게 나타났으나, PVP는 그 발달율이 다른 처리군들과 비교하여 유의적($P<0.05$)으로 낮은 결과를 보였다.
3. 각 처리구간의 morulae와 blastocyst의 함을

비교한 결과 체외성숙 첨가물 중 PVA와 pFF는 각각 63%, 69%로 BSA(65%)와 유사한 결과를 나타내었으나 PVP는 54%로 유의적으로 낮은 결과를 나타내었다($P < 0.05$).

4. 전체 성숙율과 수정율을 비교해 본 결과 성숙율은 PVA, pFF, BSA가 82.4%, 89.4%, 90.0%인 반면 PVP는 72.4%로 유의적으로($P < 0.05$) 낮은 결과를 보였고, 수정율은 pFF, BSA가 각각 87.1%, 89.1%로 PVA, PVP의 78.0%, 70.6%에 비해 각각 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

이상의 연구결과 돼지 난자의 체외성숙 및 배양 매지에 있어 PVA, pFF 첨가는 BSA 대체물질로서 이용이 가능하나 PVP는 그 이용에 제한이 따를 것으로 판단된다.

참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 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.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN, Prather and Day BN. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*, 54:787-797.
- Ashwood-Smith MJ and Warby C. 1971. Studies on the molecular weight and cryoprotective properties of polyvinylpyrrolidone and dextran with bacteria and erythrocytes. *Cryobiology*, 8:453-464.
- Ayoub MA and Hunter AG. 1993. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *J. Dairy Sci.*, 76:95-100.
- Biggers JD, Summers MC and McGinnis LK. 1997. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. *Human Reprod. Update* 3(2):125-135.
- Brackett B and Zuelke K. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39:43-64.
- Chatot CS, Klein NW, Clapper ML, Resor SR, Singer WD, Russman BS, Holmes GL, Mattson RH and Cramer JA. 1984. Human serum teratogenicity studied by rat embryo culture: epilept, anticonvulsant drugs and nutrition. *Epilepsia*, 25:205.
- Chen L, Russel PT and Larsen WJ. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory syntheses of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:87-93.
- Choi SH, Ryu IS, Kim IH, Park SB, Yeon SH, Jin HJ, Suh SW, Lee CS and Son DS. 1999. Effects of *in vitro* maturation condition on bovine IVF embryos development. *Korean J. Emb. Trans.*, 14:113-119.
- Choi SH, Yang BC, Kim IH, Son DS, Lee HJ, Lee KW, Park MK, Kim KN and Chung YC. 1997. Effects of serum on *in vitro* maturation of Korean native cattle oocytes. *Theriogenology*, 47(1):187.
- Cholewa JA and Whitten WK. 1970. Development of two-cell mouse embryos in the absence of a fixed-nitrogen source. *J. Reprod. Fert.*, 22:553-555.
- Coy P, Martinez E, Ruiz S, Vazquez JM, Roca J, and Matas C. 1993. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pig. *Theriogenology*, 40:539-546.
- 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.
- Dekel N and Phillips DM. 1979. Maturation of the rat cumulus oophorus : a scanning microscopic study. *Biol. Reprod.*, 21:9-18.

- Dumoulin JC, Bergers-Janssen JM, Pieters MH, Enginsu ME, Geraedts JP and Evers JL. 1994. The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertil Steril.*, 62:793-798.
- Eckert J and Niemann. 1995. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. 43:1211-1225.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
- Fukui Y and Sakuma Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* : relation to ovarian activity. follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 22: 669-673.
- Funahashi H, Stumpf TT, Terlouw SL, Cantley T, Rieke A and Day BN. 1994a. Developmental ability of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1425-1433.
- Funahashi H, Cantley T, Stumpf TT, Terlouw SL, Rieke A, and Day BN. 1994b. *In vitro* development of *in vitro*-matured pig oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.*, 50:1072-1077.
- Funahashi H, Kim NH, Stumpf TT, Cantley T and Day BN. 1996. presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Biol. Reprod.*, 54: 1412-1419.
- Gardner DK. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Int.*, 18:1163-1179.
- Hong JY, Yong HY, Lee BC, Hwang JM and Lee ES. 2004. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media., 62:1473-1482.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:379-383.
- Kane MJ. 1987. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 37:775-778.
- 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.
- Kim HS, Lee GS, Hyun SH, Lee SH, Nam DH, Jeong YW, Kim S, Kang SK, Lee BC and Hwang WS. 2004. Improved *in vitro* development of porcine embryos with different energy substrates and serum. 61:1381-1393.
- Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K and Utsumi K. 1996. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. 45:787-799.
- Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanin and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro*-produced bovine morulae and blastocyst. *Biol. Reprod.*, 55(6):1383-1389.
- Leibfried ML and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to matured *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
- Long CR, Dobrinsky JR and Johnson LA. 1999. *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. *Theriogenology*, 51: 1375-1390.
- Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi M, Terqui M and Mermillod P. 2001. Meiotic and development competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*, 56:17-29.
- Mattioli M, Ealeati ML and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocyte maturation fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31: 1201-1207.
- Motlik J and Fulka J. 1974. Fertilization of pig

- follicular oocytes cultivated *in vitro*. J. Reprod. Fert., 36:235-237.
- Ogawa T, Ono T and Marrss RP. 1987. The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos *in vitro*. J. Vitro Fertil. Embryo Transfer, 4:153-158.
- Pincus G and Enzmann EV. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. J. Exp. Med., 62:655-657.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of surum, timing of its inclusion and heat inactivation. Theriogenology, 41:1241-1249.
- Romero A and Seidel GE Jr. 1994. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. Theriogenology, 41:383-394.
- Saito H, Berger T, Mishell DR Jr and Marrs RP. 1984. The effect of serum fractions on embryo growth. Fertil. Steril., 41:761-765.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustaffsson H and Todriguez-Martinez H. 1994. A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. Theriogenology, 41: 1033-1043.
- Sirard MA and Bilodeau S. 1990. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. Biol. Reprod., 43:777-783.
- SAS/STAT. 1996. SAS user guide. release 6.12 edition, SAS Inst. inc., Cary NC., USA.
- Takagi Y, Mori K, Tomizawa M, Takahashi T, Sugawara S and Masaki J. 1991. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. Theriogenology, 35:1197-1207.
- Yamashita S and Hoshi H. 1996. Bovine blastocyst formation from IVM/IVF produced zygotes in serum and serum free medium. Theriogenology, 46(1):197 abstract.
- 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.
- Vatzias G, Hagen DR. 1999. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. Biol Reprod., 60:42-48.
- Wang WH, 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.

(접수일: 2004. 7. 7 / 채택일: 2004. 9. 21)