

## 돼지 미성숙 난자의 체외 성숙 시간이 배 발생과 부화에 미치는 영향

김재영<sup>1</sup> · 박향<sup>1</sup> · 김재명<sup>2,†</sup> · 이정형<sup>2</sup> · 박용수<sup>3</sup> · 광동석 · 박흠대  
대구대학교 공과대학 생명공학과

### Effect of *In Vitro* Maturation Time of Porcine Immature Oocytes on the Subsequent Development and Hatching after *In Vitro* Fertilization

J. Y. Kim<sup>1</sup>, H. Park<sup>1</sup>, J. M. Kim<sup>2,†</sup>, J. H. Lee<sup>2</sup>, Y. S. Park<sup>3</sup>,  
D. S. Kwak and H. D. Park

Department of Biotechnology, Daegu University, Kyongbuk, Republic of Korea

#### SUMMARY

This study was conducted to investigate the effect of *in vitro* maturation (IVM) duration of porcine follicular oocytes on maturation rate, polyspermic rate, and subsequent embryo development. The nuclear maturation rates of oocytes matured for 36, 38, 40, 42 and 44 hr were similar between 68.0, 78.0, 79.5, 73.8 and 81.8% respectively. There was no significant difference in the rates of polyspermy after *in vitro* fertilization (IVF). The cleavage rate in the group of 36 hr was significantly higher in than that of 40, 44 hr ( $p < 0.05$ ) but not to 38 and 42 hr. The development rate to blastocyst stage was significantly higher in the group of 38 hr (23.1%) than that in the group of 44 hr (15.6%) ( $p < 0.05$ ) but not to 36, 40 and 42 hr. These results suggest that the aged oocytes for 44 hr is not required for the production of blastocysts derived from porcine IVF embryos.

(Key words : pig, IVM duration, IVF, embryo development)

#### 서 론

돼지에서 미성숙 난자의 체외 성숙에 관한 연구는 Edwards(1965)에 의해 최초로 보고된 후 여러 연구자들이 난소의 형태(Byun와 Lee, 1992; Motlik 등, 1984), 난포의 크기(Leibfried 등, 1986), 성숙 배양 시간(Wang 등, 1992), 각종 배양액(Wang 등, 1997; Funahashi 등, 1994), 성선 자극 호르몬과 단

백질원으로 혈청 및 BSA의 첨가 배양(Natio와 Toyoda 등, 1988), 각종 성장 인자의 첨가 배양(Ding과 Foxcroft, 1994; Downs, 1989) 및 체세포와의 공동배양(한, 1996) 등을 보고하였다. 그러나 돼지 미성숙 난자는 다른 포유 동물에 비하여 체외 성숙 시간이 길고, gap junction의 감소로 인한 물질 이동 장애, 세포내 소기관들의 불완전한 재배치, 다정자 수정, 응성전핵 형성을 감소 및 체외 발생

<sup>1</sup> 차병원 여성의학연구소 불임의학연구소(Infertility Medical Center of CHA General Hospital)

<sup>2</sup> 포천중분과대학교(College of Medicine, Pochon CHA University)

<sup>3</sup> 경상북도 축산기술연구소(Kyongbuk Livestock Research Institute)

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail: dangi2359@hanmail.net

능 정지 현상 등의 원인으로 체외 수정란의 이용성이 제한적이었다(Schoenback 등, 1992; Jarrell 등, 1991; Yoshida, 1989; Motlik 등, 1984). 특히 미성숙 난자의 체외 배양 시간이 길어지면 수정된 난자에서 chromatin decondensation과 sperm aster 형성이 지연되고(Long 등, 1994), 난자의 노화 가능성을 초래하여 배 발생에 유해하게 작용하며(Hunter와 Greve, 1997), 양질의 배반포를 생산할 수 없었다(Husiman, 1994; Dokras 등, 1993). 그러나 돼지 수정란의 체외 생산에 관한 연구는 대부분이 체외 배양 단계에 관한 연구로서 체외 성숙 체계에 관련 보고는 소수였다.

돼지의 체외 배반포는 외견상으로 할구의 파괴나 변형이 없을지라도 발육 능력과 대사가 현저히 낮고(Massip 등, 1993), 이러한 배반포를 이식하였을 경우에 착상은 성공할 수 있으나 유산율이 높았다(Overstr, 1996). 이와 같은 원인으로 돼지의 배반포는 대리모에 이식하여 산자를 생산하는 것이 다른 가축에 비해 아주 어렵다. 따라서 이식 후 산자 생산까지 보장할 수 있는 고품질 배반포를 생산할 수 있는 체계의 확립이 필요하며, 특히 단순한 배 발생뿐만 아니라 배반포 부화율의 조사도 필요하다.

본 연구는 돼지 체외 수정란의 생산에 있어 고품질 배반포 생산에 필요한 배양 체계를 확립하기 위하여 체외 성숙 시간이 돼지 미성숙 난자의 핵 성숙, 배 발생 및 배반포의 부화에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 배 지

본 실험에 사용된 기초 배지로서 난소로부터 미성숙 난자 회수용 배지는 25 mM HEPES와 3 mg/ml bovine serum albumin(BSA, Sigma, A6003)가 첨가된 TALP, 체외 성숙용 배지는 0.57 mM cysteine(Sigma, C7352), 10% porcine follicular fluid(pFF), 2.5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10ng/ml epidermal growth factor(EGF), 10 IU/ml human chorionic gonadotropin(hCG), 10 IU/ml pregnant mare serum gonadotropin(PMSG)을 첨가한 BSA-free NCSU23(North

Carolina State University 23)이다. 체외 수정용 배지는 1 mg/ml BSA와 2.5 mM caffeine sodium benzoate를 첨가한 modified tris-buffered medium(mTBM)이다. 한편 체외 배양용 배지는 0.3% BSA(Sigma, A6003)를 첨가한 PZM3(Porcine Zygotes Medium)이다.

### 2. 미성숙 난자의 회수

도축 돼지의 난소를 회수하여 25  $\mu$ g/ml gentamycin(Sigma, G3632)이 함유된 25~30°C의 생리 식염수가 담긴 보온병에 담아서 2~3시간 내에 실험실로 운반하였다. 난소의 표면을 생리 식염수로 2~3회 세척한 다음, 18-gauge가 부착된 10 ml 주사기로 직경 3~6 mm 난포로부터 미성숙 난자를 채취하였다. 난구 세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 미성숙 난자를 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

### 3. 체외 성숙

선별된 미성숙 난자를 TALP 용액으로 2~3회 세척하였다. 체외성숙용 배지가 500  $\mu$ l씩 분주된 4-well dish(Nunc, Denmark)에 50개의 미성숙 난자를 넣고, 22시간 동안 배양시킨 후 PMSG와 hCG가 첨가되지 않은 체외 성숙 배지에서 다시 22시간 동안 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양함으로써 체외 성숙을 유도하였다.

### 4. 체외 수정

#### 1) 정자의 준비

본 실험에 사용된 돼지 정액은 다비 A·I 센터에서 제조한 희석 정액을 사용하였으며, 17°C에 보관되어 5일 동안에 사용하였다. 정액을 2 ml 90% percoll 및 2 ml 45% percoll이 담겨져 있는 15 ml 원심 분리관(Falcon, 2097)의 상층에 조심스럽게 넣고 500×g에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하였다. 회수한 정자괴를 1 mg/ml BSA(Sigma A6003), 100  $\mu$ g/ml penicillin(Sigma, P3032) 및 75  $\mu$ g/ml streptomycin(Sigma, S9137)이 함유된 D-PBS(Gibco, Cat. No. 14287-080)에서 500×g로 5분간 원심분리를 2회하여 세척하였다. 세척 후

상층액을 제거하고 회수한 정자괴를 mTBM 용액으로 최종 농도가  $3 \times 10^6$  spermatozoa/ml이 되도록 희석하였다.

## 2) 체외 수정

체외 성숙 36시간, 38시간, 40시간, 42시간 및 44시간 동안 체외 성숙된 돼지 미성숙 난자를 0.1% hyaluronidase가 함유된 TALP 용액에 넣어 연속적으로 피펫팅을 하여 난구 세포를 제거하고, mTBM 배양액으로 3회 세정한 후 수정에 제공하였다. 체외 수정까지 미성숙 난자는 35 mm petri dish에 mineral oil로 피복된 48  $\mu$ l의 mTBM 용액 소적에 25~30개씩을 넣고 배양하였다. 미세 소적에 상기에서 준비한 정자 2  $\mu$ l(최종  $1.2 \times 10^5$  spermatozoa/ml)씩을 넣고 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6시간 동안 배양함으로써 체외 수정을 유도하였다.

## 5. 체외 배양

체외 수정된 수정란(배양 0일)은 TALP 용액으로 3회 세척하였고, PZM3 배양액으로 2~3회 다시 세척한 후 미리 준비한 50  $\mu$ l의 PZM3 배양액에 25~30개씩 넣어 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

## 6. 핵 성숙을 조사

체외 성숙 36, 38, 40, 42 및 44 시간째에 미성숙 난자를 회수하여 acetic acid : ethanol = 1: 3으로 혼합한 용액에 10 min 처리한 후 sodium azide 2.5 mg/ml 및 2.5  $\mu$ g/ml hoechst 33342가 첨가된 PBS 용액을 첨가하였다. Glycerol과 3:1로 혼합하여 형광현미경에서 미성숙 난자의 핵상을 검토하였다.

## 7. 정자 침투를 조사

체외 수정 후 10~12 시간이 지난 난자는 acetic acid와 ethanol을 1:3으로 혼합한 용액에 48시간 이상 고정시킨 후 1% orcein과 45% acetic acid로 염색한 후 위상차현미경하에서 정자의 침입 및 응성 전핵의 형성을 조사하였다.

## 8. 통계처리

실험 결과에 대한 통계학적 분석은  $\chi^2$ -test를 이

용하여 실시하였다. 유의차는  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 핵성숙을

돼지 미성숙 난자의 체외 성숙 시간에 따른 핵성숙율은 Table 1과 같다. 제 2감수 분열 중기(M-II) 도달율이 68.0~81.8%로서 체외 성숙 시간에 따른 차이가 없었다. 돼지 난포란의 체외 성숙 시간이 36시간(Wang 등, 1994), 40시간(Funahashi 등, 1994), 44~46시간(Mattioli 등, 1988) 및 48시간(Naito 등, 1988)으로 다양하게 보고되었다. 특히 Ka 등(1997)은 돼지 난포란의 핵성숙율이 체외성숙 36 및 44 시간째에 각각 90 및 98%로서 본 연구(Table 1) 및 Zhu 등(2002)에 비하여 높은 경향이였다. 본 연구 및 이전의 보고에서 핵성숙이 체외 성숙 38시간 이전에 대부분이 완료되었고, 38시간 이후의 핵성숙 완료율이 38시간 이전보다 낮았다. 따라서 체외 성숙 시간이 길어지면 세포질 노화(Kim 등, 1996) 및 배반포의 세포수와 임신율 저하(Park 등, 2005)의 가능성이 증가되므로, 핵성숙을 기준으로 체외 성숙 시간은 44시간보다 짧은 38시간이 효과적일 것이다.

### 2. 다정자 침입을

돼지 미성숙 난자의 체외 성숙 시간에 따른 다정자 침입율을 검토한 결과는 Table 2와 같다. 각각의 처리군에서의 다정자 침입율은 31.8~48.7%,

Table 1. Effect of the duration of *in vitro* maturation on nuclear maturation of porcine oocytes

Duration (hr)	No.	No. (%) of oocytes at	
		Metaphase I	Metaphase II
36	25	6 (24.0)	17 (68.0)
38	41	7 (24.4)	32 (78.0)
40	39	7 (17.9)	31 (79.5)
42	42	9 (21.4)	31 (73.8)
44	55	8 (14.5)	45 (81.8)

수정율은 48.8~57.7%로서 각 군간에 유사한 경향이였다. 돼지 난자의 노화 현상은 배란과 정자의 난자 침입이 일어나는 6~8 시간 동안에 난자 내에 정자가 침입한 후 불완전한 표층 과립 반응과 비정상적으로 많은 수의 정자가 부착되는데 기인(Hunter, 1991)하여 다정자 침입의 위험성이 증가함으로 인해 난자의 분절(fragmentation)이 생성된다고 보고하였다(Kim 등, 1996). 또한 제 2감수 분열 중기의 방추사의 노화로 인해 방추사가 파괴되고 그에 따른 염색체의 손실도 발생한다고 보고하였다(Austin, 1967). 따라서 본 연구 결과에서는 체외 성숙 시간에 따른 다정자 침입율과 수정율의 차이가 나타나지 않았다. 그러므로 체외 성숙 시간을 36시간까지 단축하더라도 문제가 없을 것으로 사료된다.

### 3. 체외 성숙 시간에 따른 분할율과 배반포, 부화 배반포율

돼지 미성숙 난자의 체외 성숙 시간에 따른 배 발생과 배반포 부화율을 검토한 결과는 Table 3과 같다. 2세포기 발달율을 기준으로 수정 능력을 판단하였을 때 체외 성숙 36시간군이 77.3%로서 가장 높았고, 이것은 체외 성숙 40 및 44시간의 70.6 및 70.3%와는 유의차가 인정되었다( $p<0.05$ ). 배반포 발달율은 38시간군의 23.1%가 체외성숙 44시간군의 15.6%보다 유의하게 높았다( $p<0.05$ ). 배반포의 부화율은 체외성숙 38시간군이 16.7%로서 높은 경향이였으나 유의차는 없었다.

Yoshida 등(1993) 및 Marchal 등(2001)이 각각 돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정 및 배양한 수정란을 이식하여 산자를 생산하였다. 그러

Table 2. Effect of the duration of *in vitro* maturation on the rates of sperm penetration of porcine oocytes

Time (hr)	No.	Oocytes penetrated (%)	Oocytes polyspermic <sup>1)</sup> (%)	No. of penetrated sperm/oocyte	Efficiency of fertilization <sup>2)</sup> (%)
36	41	39 (95.1)	19 (48.7)	64 (1.6)	20 (48.8)
38	29	25 (86.2)	9 (36.0)	36 (1.4)	16 (55.2)
40	19	18 (94.7)	8 (44.4)	30 (1.7)	10 (52.6)
42	21	18 (85.7)	7 (38.9)	27 (1.5)	11 (52.3)
44	26	22 (84.6)	7 (31.8)	32 (1.5)	15 (57.7)

<sup>1)</sup> Percentage of the number of polyspermic oocytes/total of penetrated oocytes.

<sup>2)</sup> Percentage of the number of monospermic oocytes/total number of inseminated oocytes.

Table 3. Effect of the duration of *in vitro* maturation on the development and hatching of porcine embryos

Time (hr)	No.	No. (%) of embryo developed to		
		≥ 2-cell	Blastocysts	Hatched blastocysts
36	339	262 (77.3) <sup>b</sup>	61 (18.0) <sup>ab</sup>	8 (13.1)
38	338	255 (75.4) <sup>ab</sup>	78 (23.1) <sup>b</sup>	13 (16.7)
40	343	242 (70.6) <sup>a</sup>	64 (18.7) <sup>ab</sup>	9 (14.1)
42	332	240 (72.3) <sup>ab</sup>	60 (18.1) <sup>ab</sup>	7 (11.7)
44	340	239 (70.3) <sup>a</sup>	53 (15.6) <sup>a</sup>	6 (11.3)

<sup>a,b</sup> Within same columns, values with different superscripts differ at  $p<0.05$ .

나 돼지 미성숙 난포란의 체외 성숙에 있어서 핵 성숙이나 세포질 성숙의 불충분 등은 체외 발달을 저해하는 요인으로 작용하기 때문에 미성숙 난포란의 핵 및 세포질 성숙을 개선시키기 위해 많은 연구자들이 다양한 시도를 해왔다(Leibfried 등, 1986; Motlik 등, 1984). 돼지 미성숙 난포란의 성숙을 위한 배지는 일반적으로 TCM-199(Funahashi 등, 1994)와 Waymouth medium(Wang 등, 1997)과 같은 조성이 복잡한 배양액을 사용하였지만, 최근에는 NCSU(North Carolina State University)-37 또는 NCSU-23과 같은 조성이 단순한 배양액이 개발되었다(Petters와 Wells, 1993). 또한 체외 배양시 형성되는 free radical을 제거하기 위한 방법으로 체외 성숙 배양액에 혈청(Fukui 등, 1982), 난구 세포(Hensleigh와 Hunter, 1985)의 첨가로 체외 성숙율이 증가하였으나, Funahashi와 Day(1993)는 호르몬의 미첨가가 효과적이었다. 그러나 위와 같은 연구에도 불구하고 돼지 미성숙 난자의 체외 발달에 관한 연구 결과는 만족할 수준에 이르지 못하고 있다. 따라서 돼지 미성숙 난자로부터 돼지 수정란의 체외 생산은 생산 효율과 결과의 재현성을 고려할 때 체외 수정 및 체외 배양법의 개발보다는 체외 성숙 체계의 확립이 선행되어야 할 것이다. 따라서 본 연구의 결과에서 44시간 동안의 체외 성숙은 돼지 미성숙 난자의 배반포 형성율에 비효과적인 것으로 사료된다.

## ·적 요

본 연구는 돼지 체외 수정란의 생산에 있어서 체외성숙 시간이 핵성숙, 다정자 침입율 및 배 발생과 배반포의 부화율 배반포의 부화에 미치는 효과를 검토하였다. 돼지 난포란의 핵성숙율이 체외 성숙 36, 38, 40, 42 및 44 시간제에 각각 68.0, 78.0, 79.5, 73.8 및 81.8%로서 각 구간에 유사한 경향이었으며, 체외 수정 후 다정자 침입율도 각각 48.7, 36.0, 44.4, 38.9 및 31.8%로서 차이가 없었다. 체외 성숙 시간에 따른 2세포기 발달율은 체외 성숙 36시간군이 77.3%로서 가장 높았고, 체외 성숙 40 및 44시간의 70.6 및 70.3%와는 유의차가 인정되었다( $p < 0.05$ ). 배반포 발달율은 38시간군의

23.1%가 체외 성숙 44시간군의 15.6%보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 따라서 돼지 난포란의 44시간 체외 성숙이 배 발생에 비효과적이었다.

## 참고문헌

- Austin CR. 1967. Chromosome deterioration in aging eggs of the rabbit. *Nature*, 213:1018-1019.
- Byun TH and Lee SH. 1992. Morphological and cellular criteria ovaries, follicles and oocytes for *in vitro* maturation in the pig. *Korean J. Emb. Trans.*, 7:97-110.
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:30-40.
- Dokras A, Sargent IL and Barlow DH. 1993. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum. Reprod.*, 8:2119-2127.
- Downs SM. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocytes and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 41:371-379.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
- Fukui Y, Terawaki Y and Ono H. 1982. Effect of gonadotropins and steroids and culture on bovine oocytes maturation. *Theriogenology*, 18:161-175.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 98:179-185.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL and Day BN. 1994. Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.*, 51: 633-639.
- Hensleigh MA and Hunter AG. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus-enclosed primary

- oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. *J. Dairy. Sci.*, 68:1456-1462.
- Hunter RHF. 1991. Oviductal function in pigs with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:385-391.
- Hunter RHF and Greve T. 1997. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod. Dom. Anim.*, 32:137-141.
- Husiman W. 1994. Quality system in the medical laboratory: the role of a quality manual. *Ann. Biol. Clin.*, 52:457-461.
- Jarrell VI, Day BN and Prather RS. 1991. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pigs, *Sus crofa*: Quantitative aspects of protein synthesis. *Biol. Reprod.*, 44:62-68.
- Ka HH, Sawai K, Wang WH, Im KS and Niwa K. 1997. Amino acids 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.
- 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.*, 107:79-86.
- Kim NH, Moon SJ, Prather RS and Day BN. 1996. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:513-518.
- Leibfried-Rutledge ML, Crister ES and First NL. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus oocyte complexes. *Biol. Reprod.*, 35:850-857.
- Long CR, Damiani P, Pinto-Correira C, Maclean RA, Duby RT and Robi JM. 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured *in vitro* under various conditions of fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 102:361-369.
- Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M and Mermillod P. 2001. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*, 56:17-29.
- Massip A, Mermillod P, Wils C and Dwssy F. 1993. Effect of dilution procedure and culture condition after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 97:65-69.
- 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.
- Motlik J, Grozet N and Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from antral follicles. *J. Reprod. Fertil.*, 72:323-328.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete Res.*, 21:289-295.
- Overstr MEW. 1996. *In vitro* assessment of embryo viability. *Theriogenology*, 45:3-16.
- Park YS, Kim SS, Kim JM, Park HD and Byun MD. 2005. The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology*, 64:123-134.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 48:61-73.
- Schoenback RA, Peters MS, Rickords LF, Stumpf TT and Prather RS. 1992. Characterization of deoxyribonucleic acid synthesis and the transition from maternal to embryonic control in the 4-cell porcine embryos. *Biol. Reprod.*, 47:1118-1125.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC and Day BN. 1997. Effects of oocytes maturation media on development of pig embryos or produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 111:101-108.

- Wang WH, Abeydeera LR, Okuda K and Niwa K. 1994. Penetration of porcine oocytes during maturation *in vitro* by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. Biol. Reprod., 50:510-515.
- Yoshida M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vivo*. J. Anim. Reprod., 35:34-37.
- 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.
- Zhu J, Telfer EE, Fletcher J, Springbett A, Dobrinsky JR, Desousa PA and Wilmot L. 2002. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. Biol. Reprod., 66:635-641.
- 한만희. 1996. 체세포와의 공배양이 돼지 체외수정란의 배발달에 미치는 영향. 충남대학교 석사학위논문.
- 
- (접수일: 2006. 6. 8 / 채택일: 2006. 6. 20)