

牛 卵胞卵의 體外成熟에 關한 研究 III. 體外成熟 牛卵胞卵의 體外受精과 發達

朴世必 · 朴泰均 · 尹山鉉 · 高大煥* · 鄭吉生
建國大學校 畜産大學 *尙志大學併設專門大學

Studies on *In Vitro* Maturation of Bovine Follicular Oocytes III. *In Vitro* Fertilization and Development of *In Vitro* Matured Bovine Follicular Oocytes

Park, S.P., T.G. Park, S.H. Yoon, D.H. Ko* and K.S. Chung
College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University *Sang-Ji Junior College

SUMMARY

These experiments were carried out to obtain the basic information for *in vitro* fertilization and development of bovine follicular oocytes matured *in vitro*. The bovine ovaries were obtained at a slaughter house and the follicular oocytes surrounded by cumulus cells were collected by puncturing follicles with 2-6 mm of diameter.

Bovine oocytes were matured *in vitro* for 24-26 hours in a CO₂ incubator with 5% CO₂ in air at 39° C. The medium used for maturation was TCM 199 supplemented with hormones, pyruvate, FBS and antibiotics. Epididymal spermatozoa were capacitated by *in vitro* culture for 2-3 hours in BO solution containing bovine serum albumin (5 mg/ml) and caffeine (2.5 mM). Insemination was made by introducing about 10-15 matured oocytes into the suspension of capacitated spermatozoa. Six hour after insemination the eggs were transferred to TCM 199 supplemented with FBS (10%) for *in vitro* development. The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. The maturation rate of oocytes following incubation for 24-26 hours was 78.4% (228/291).
2. Of total 250 oocytes, 172 embryos extruded 2nd polar body following *in vitro* culture with spermatozoa for 20 hours, and the rates of embryos developed to 2-, 4-, 8-, 16-cells and morula or early blastocyst were 64.0, 39.2, 22.0, 15.2 and 11.2%, respectively.
3. The time needed for development to 2-, 4-, 8-, 16-cell stage and morula was 42.5±5.4, 58.0±9.2, 74.4±11.5, 96.1±13.4 and 119.0±18.2 hours, respectively.

I. 緒 論

牛卵胞卵의 體外受精은 Iritani 와 Niwa(1977)에 의해 처음으로 成功되었으며, Brackett 등(1982)은 體外受精 牛卵胞卵을 移植하여 犏牛를 生産하는데

최초로 成功하였다. 그후 體外에서 受精된 牛卵胞卵을 移植하여 妊娠이나 産子生産에 成功한 事例가 다수 報告되었다(Brackett 등, 1984; Sirard 와 Lambert, 1985, 1986; Lambert 등, 1986; Sirard 등, 1986; Crister 등, 1986; First 와 Parrish,

1987; Xu 등, 1987; Hanada 등, 1987; Sirard 등, 1988; Goto 등, 1988).

그러나 이들 報告의 대부분은 排卵直前の 成熟 牛 卵胞卵을 採取하여 體外에서 受精시킨 것이며, 未成熟 牛 卵胞卵을 體外에서 成熟, 受精시켜 産子를 生産한 報告는 적다(Crister 등, 1986; Xu 등, 1987; Hanada 등, 1987; Sirard 등, 1988; Goto 등, 1988). 더구나 이들 報告도 Goto 등(1988)의 경우를 除外하고는, 成熟과 受精은 體外에서 誘導했으나 受精後의 胚發生은 면양이나 토끼 또는 受卵牛의 卵管을 利用하여 誘導하였다. 따라서 未成熟 牛 卵胞卵을 純粹하게 體外에서 成熟과 受精 및 發生을 誘導한 다음 受卵牛에게 移植하여 産子를 生産한 事例는 Goto 등(1988)의 報告 뿐이다.

이와 같이 牛 卵胞卵의 體外發生 成績이 實驗動物에 비하여 低調한 것은 體外에 있어서 牛 精子의 受精能獲得方法이 確立되어 있지 않으며(Iritani 등, 1984), 良質의 卵胞卵을 얻기가 어렵고(Sirard 등, 1988), 體外培養의 最適條件이 確立되어 있지 않기 때문이다(Goto 등, 1988).

이에 本 研究에서는 未成熟 牛 卵胞卵의 體外受精과 發生을 誘導하는데에 必要한 基礎知識을 獲得할 目的으로 體外에서 成熟이 이루어진 牛 卵胞卵의 體外受精과 體外發生에 關한 試驗을 實施하여 약간의 成績을 얻었으므로 그 結果를 報告한다.

II. 材料 및 方法

1. 供試材料

1) 供試培養液

基礎培養液으로는 TCM 199(Gibco, CAT. NO.400-1100)을 使用하였으며, 卵巢로부터 卵胞卵을 回收할 때에는 25 mM HEPES-TCM 199 培養液을 使用하였다. 이 培養液의 pH는 7.2~7.4, 滲透壓은 290±10 mOsm으로 調整하였고, 使用直前에 0.45 μm의 millipore filter(German Science Inc., U.S.A.)로 濾過하여 滅菌하였다. 卵胞卵의 體外受精을 誘導하기 위해서는 基礎培養液에 여러 가지를 添加했는데 添加한 호르몬은 1 μg/ml의 FSH, 2 IU/ml의 HCG, 1 μg/ml의 Oestradiol-17β이었으며 이외에도 0.1 mM의 Pyruvate와 10%의 Fetal Bovine Serum(FBS)을 添加하였다.

精子處理用 基礎培養液으로는 BO液(Brackett &

Oliphant, 1975)을 使用하였는데 이 培養液의 pH는 7.2~7.4, 滲透壓은 280±10 mOsm으로 調整하였다.

2) 卵胞卵의 回收

Holstein 成牝牛의 卵巢를 屠殺直後에 切取하여 100 IU/ml의 Penicillin G와 100 μg/ml의 Streptomycin sulfate를 含有한 38~39°C의 生理的 食鹽水가 들어있는 保温瓶으로 옮겨 2時間 以內에 實驗室까지 운반하였다. 이어 20 gauge의 注射針이 附着된 10 ml 注射器를 使用하여 2~6 mm의 可視 卵胞로부터 卵丘細胞가 密集된 卵胞卵을 回收하였다.

3) 精巢上體尾部 精子의 回收

屠畜場에서 入手한 精巢를 前記의 生理食鹽水로 洗滌한 다음, 精巢上體尾部만을 잘라내어 3 ml의 注射器에 附着된 22 gauge의 注射針을 精巢上體管 內腔에 挿入한 다음, BSA 非含有, 5 mM Caffein-BO液을 注入하여 精子를 灌流하였다(Lenz 등, 1983). 受精能獲得에 對한 個體差를 없애기 위하여 2~3頭의 相異한 個體로부터 얻어진 精液을 混合하여 供試하였다.

2. 試驗方法

1) 卵胞卵의 生死鑑別

卵丘細胞로 둘러싸여 있는 卵胞卵의 生存與否를 判別하기 위하여 同卵胞卵을 0.4% Trypan blue液(Gibco, U.S.A.)과 TCM 199 培養液을 1:1로 混合한 溶液內에서 15分間 培養한 다음, 卵丘細胞의 50%以上이 染色되었거나 細胞質의 凝縮 또는 破片化가 일어난 卵胞卵은 除去하고 形態가 正常的인 卵胞卵만을 回收하여 培養에 供試하였다.

2) 卵胞卵의 體外培養 및 成熟度判定

前述한 體外成熟用 培養液 100 μl 小滴을 流動 paraffin oil로 被覆한 다음, 5% CO₂, 95% air, 39°C의 CO₂培養器內에서 5~6時間 平衡시킨 후, 이 培養液 小滴에 回收된 卵胞卵을 沈漬하여 24~26時間 培養하였다. 培養이 끝난 卵子는 0.1% aceto-orcein(1 mg/ml orcein in 45% acetic acid)으로 染色을 實施하여 卵胞卵의 核成熟도를 判別하였다(Toyoda & Chang, 1974). 卵胞卵成熟의 正常與否는 第1極體의 形成與否와 細胞質內의 核狀을 基準으로 判定하였는데 第1極體가 形成되었어도 細胞質內의 核이 不定位置에 있거나 또는 消失된 것은

異狀成熟으로 判定하였다(Yanagimachi, 1974 ; Yoon 등, 1989)

3) 精子的 受精能獲得

精巢上體尾部로부터 採取된 精자를 遠心分離 (1,000 rpm×5 min)에 의하여 BSA 非含有, 5 mM Caffein-BO 液으로 2~3 回 洗滌하였다. 이때 最終 遠心分離에 의하여 上層液을 除去한 다음, 2.5 mM Caffein 과 5 mg/ml BSA 를 含有한 培養液을 添加하여 20 分 동안 CO₂ 培養器內에서 培養함으로써 精子浮遊를 誘導하였다. Petridish(Falcon Plastic# 1006)내에 100 μ l(15×10⁶cells/ml)의 精子浮遊液 小滴을 製作한 다음, 流動 paraffin oil 로 被覆하여 37°C, 5% CO₂, 95% 空氣條件의 CO₂培養器內에서 2~3 時間 前培養을 實施함으로써 受精能을 獲得시켰다(Goto 등, 1988).

4) 體外受精

前記한 方法에 의하여 體外成熟이 이루어진 卵胞卵을 5 mg/ml 의 BSA 를 含有한 BO 液으로 2 回 洗滌한 다음, 受精能을 獲得한 精자가 含有된 精子浮遊液 小滴(10~15 개/drop)으로 옮겨 體外受精을 誘導하였다. 培養 6 時間째에는 胚發生用 培養液인 10% 의 FBS 를 含有한 TCM 199 培養液으로 옮겨, 體外受精의 與否는 第 2 極體의 放出, 細胞質內에 侵入한 精子頭部의 膨化와 尾部의 觀察 및 雌雄前核의 確認 등을 基準으로 判定하였다(Toyoda & Chang, 1974).

5) 體外培養

受精된 卵胞卵은 10% 의 FBS 가 含有한 TCM 199 培養液으로 옮겨 39°C, 5% CO₂, 95% 空氣條件의 CO₂培養器內에서 培養하였다. 培養 24 時間째마다 新鮮한 培養液으로 交替했으며, 12 時間 間隔으

로 位相差顯微鏡下에서 形態學的 特性을 調査하였다.

III. 結果 및 考察

1. 牛卵胞卵의 體外成熟

直徑 2~6 mm 의 牛卵胞로부터 採取한 卵核胞期(Germinal vesicle ; GV)의 卵胞卵을 1 μ g/ml 의 FSH, 2 IU/ml 의 HCG, 1 μ g/ml 의 Oestradiol-17 β 및 10% Fetal Bovine Serum 을 添加한 TCM 199 培養液에서 24~26 時間 培養하면서 體外成熟을 誘導하였을 때의 結果는 表 1 에서 보는 바와 같다. 總 291 個의 供試卵胞卵中에서 正常的인 成熟을 보인 卵胞卵은 65.0% 인 189 個였으며 非正常的인 成熟을 보인 卵胞卵은 13.4% 에 해당하는 39 個로서 總成熟率은 78.4% 였다. 이러한 成績은 Lu 등(1987)이 報告한 體外成熟率 90.0% 에 비해서는 低調한 것이었지만 Lenz 등(1983)과 Goto 등(1988)이 報告한 75.0% 와 82.9% 와는 大差가 없는 것이었다.

2. 體外成熟 卵胞卵의 體外受精과 發達

體外成熟이 이루어진 250 個의 卵胞卵을 2.5 mM 의 Caffein 과 5 mg/ml 의 BSA 가 含有된 BO 培養液內에서 受精能이 獲得된 精巢上體尾部 精자와 結合시켜 體外受精을 誘導하였을 때의 成績은 表 2 에서 보는 바와 같다. 이 表에 의하여 알 수 있는 바와 같이 第 2 極體가 放出되어 受精이 確認된 卵胞卵은 172 個로서 體外受精率은 68.8% 였다. 이러한 成績은 같은 條件에서 體外受精을 誘導한 Goto 등(1988)의 63.0% 와 大差가 없는 것이었다.

Table 1. *In vitro* maturation of bovine follicular oocytes

Exp. No.	No. of oocytes examined	No. of oocytes extruded 1st polar body(%)		
		Matured normally	Matured abnormally	Total
I	58	28(48.3)	10(17.2)	38(65.5)
II	61	37(60.7)	7(11.5)	44(72.1)
III	53	37(69.8)	8(15.1)	45(84.9)
IV	59	42(71.2)	6(10.2)	48(81.4)
V	60	45(75.0)	8(13.3)	53(88.3)
Total(%)	291	189(65.0)	39(13.3)	228(78.4)

Table 2. *In vitro* development of bovine follicular oocytes following *in vitro* fertilization

Exp. No.	No. of oocytes subjected to fertilization	No. of oocytes fertilized (%)	No. of embryos developed to				
			2-cell (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	16-cell (%)	morula to blast* (%)
I	50	33(66.0)	29(58.0)	14(28.0)	6(12.0)	4(8.0)	1(2.0)
II	49	30(61.2)	28(57.1)	13(26.5)	7(14.3)	4(8.2)	2(4.1)
III	45	35(77.8)	33(73.3)	25(55.6)	12(26.7)	8(17.2)	7(15.6)
IV	46	29(63.0)	27(58.7)	18(39.1)	13(28.3)	9(19.6)	7(15.2)
V	60	45(75.0)	43(71.7)	28(46.7)	17(28.3)	13(21.7)	11(18.3)
Total (%)	250	172(68.8)	160(64.0)	98(39.2)	55(22.0)	38(15.2)	28(11.2)

*Blast : blastocyst

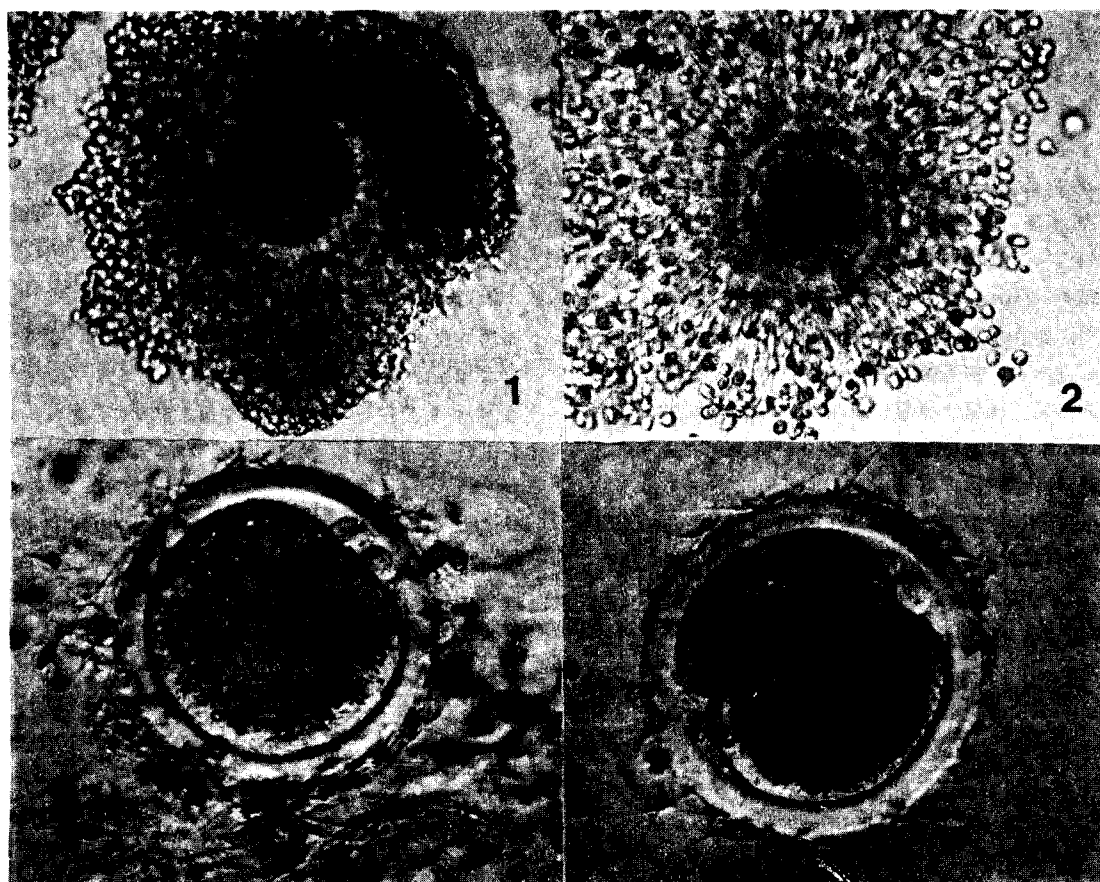


Plate 1. *In vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes.

Fig. 1 Bovine oocyte with compact cumulus cells ($\times 200$).

Fig. 2 Bovine oocyte embedded in expanded cumulus cells ($\times 200$).

Fig. 3 Bovine oocyte with 2 polar bodies after *in vitro* insemination ($\times 400$).

Fig. 4 Two-cell bovine embryo, 38 h after *in vitro* insemination ($\times 400$).

한편 受精된 이황 卵胞卵을 10%의 FBS가 含有된 TCM 199 培養液에서 培養한 結果 2-細胞期까지 發達한 것은 64.0%에 해당하며 4-, 8-, 16- 및 桑實胚 以上の 段階에 까지 發達한 것은 各各 98(39.2%), 55(22.0%), 38(15.2%) 및 28個(11.2%)였다(그림 1). 이러한 成績은 體外受精이 確認된 1-細胞期의 卵子를 受卵牛의 卵管에 移植하여 6일째에 回收한 結果 桑實胚나 胚盤胞로 發達한 胚의 比率이 38%였다고 報告한 Xu 등(1987)의 成績이나, 受精卵을 緬羊의 卵管에 移植한 結果 桑實胚 以上の로 發達한 胚가 28%였다고 한 Sirard 등(1988)의 成績보다 낮은 것이었다. 또 受精後 14일째인 卵子로부터 回收한 營養膜細胞를 1-細胞期

의 受精卵과 共同培養했을 때에 얻어진 42% (Camous 등, 1984)보다 높은 것이었다.

이상에서 소개한 本 研究의 結果와 여러 報告들을 綜合하여 考察할 때 受精卵을 *in vitro*에서 桑實胚나 胚盤胞로 發達시키기 위해서는 假親의 卵管을 利用하거나 아니면 여러 종류 의 細胞 중, 營養膜細胞 (Camous 등, 1984), 顆粒細胞(Xu 등, 1987) 혹은 卵丘細胞(Goto 등, 1988) 등과 함께 卵子를 共同培養하는 것이 바람직하다고 생각된다.

表 3은 受精이 이루어진 卵胞卵을 10%의 FBS가 含有된 TCM 199 培養液에서 繼續하여 培養하면서 形態學的 特性을 12時間 間隔으로 位相差顯微鏡下에서 觀察한 結果로서, 體外受精後 2-細胞期까지 發

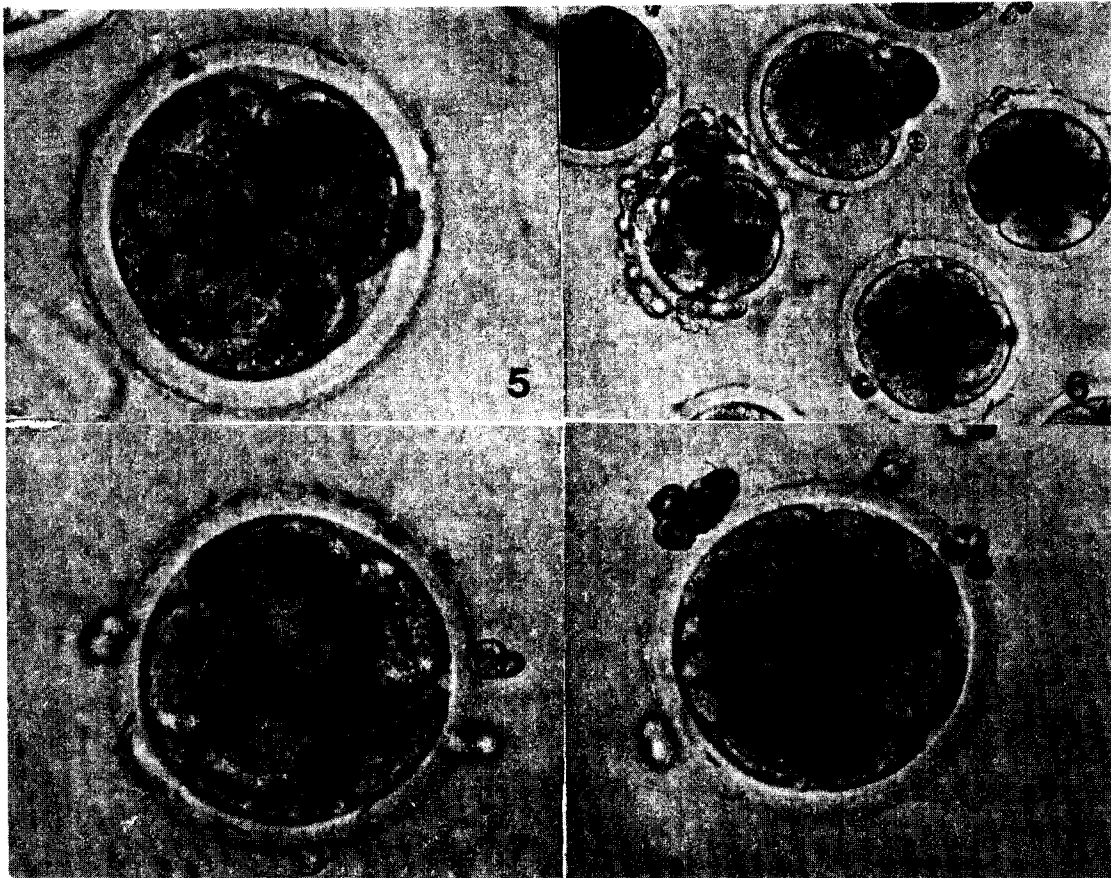


Fig. 5 Four-cell bovine embryo, 49 h after *in vitro* insemination($\times 400$).

Fig. 6 Four-to seven-cell bovine embryos, 62 h after *in vitro* insemination($\times 200$).

Fig. 7 Eight-cell bovine embryo, 69 h after *in vitro* insemination($\times 400$).

Fig. 8 Bovine morula(about 20 cells), 114 h after *in vitro* insemination($\times 400$).

Table 3. Speed of cleavage of *in vitro* fertilized embryos

No. of embryos	Developmental stages	Hour after insemination (mean \pm SD)	Time between divisions(h)
160	2-cell	42.5 \pm 5.4	—
98	4-cell	58.0 \pm 9.2	15.5
55	8-cell	74.4 \pm 11.5	16.4
38	16-cell	96.1 \pm 13.4	21.7
28	morula	119.0 \pm 18.2	22.9

달하는데에 소요되는 시간은 42.5 \pm 5.4(h)였으며 4-, 8-, 16-세포期 및 桑實胚期까지 발달하는데 소요된 시간은 각각 58.0 \pm 9.2, 74.4 \pm 11.5, 96.1 \pm 13.4 및 119.0 \pm 18.2(h)였다. 이와 같은 발달段階別 소요시간은 實驗群이나 個體差에 따라 多小의 差異는 認定되었으나 牛의 生體內에서 소요되는 所要時間과 대체적으로 一致하는 것이었다.

한편 2-細胞期에서 4-細胞期로 발달하는데 소요되는 시간은 15.5 시간이었고, 4-細胞期에서 8-細胞期까지는 16.4 시간, 8-細胞期에서 16-細胞期까지는 21.7 시간, 16-細胞期에서 桑實胚期까지는 22.9 시간이었다. 따라서 胚의 發達이 進行될수록 細胞分裂에 소요되는 시간이 延長된다고 할 수 있다.

IV. 摘 要

本 研究는 未成熟 牛卵胞卵의 體外發生을 위한 基礎知識을 確立하기 위하여 體外에서 成熟이 이루어진 卵胞卵에 體外受精을 實施하여 胚發生을 誘導하고자 하였다. 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 總 291 個의 卵胞卵을 供試하여 體外成熟을 誘導한 結果 Metaphase II 段階까지 正常的인 成熟을 나타낸 卵胞卵은 65.0% 인 189 個였으며 非正常的인 成熟을 나타낸 卵胞卵은 13.4% 인 39 個로서 總成熟率은 78.4% 였다.

2. 體外成熟이 이루어진 250 個의 卵包卵에 對해 體外受精을 實施한 結果 第 2 極體가 放出되어 受精이 確認된 卵胞卵은 172 個로서 體外受精率은 68.8% 였다.

3. 受精된 이들 卵胞卵을 10% 의 FBS 가 含有된 TCM 199 培養液에서 培養한 結果 2-細胞期까지 發達한 것은 64.0% 인 160 個였으며 4-, 8-, 16-細胞期 및 桑實胚期 以後의 段階까지 發達한 胚는 各

各 98(39.2%), 55(22.0%), 38(15.2%) 및 28(11.2%)였다.

4. 體外受精後 1-細胞期에서 2-細胞期로, 4-細胞期로, 8-細胞期로, 16-細胞期로, 桑實胚로 發達하는데에 소요되는 시간은 각각 42.5 \pm 5.4, 58.0 \pm 9.2, 74.4 \pm 11.5, 96.1 \pm 13.4 및 119.0 \pm 18.2 시간 이었다. 또 2-細胞期에서 4-細胞期까지 發達하는데 소요되는 시간은 15.5 시간 이었으며, 4-細胞期에서 8-細胞期까지, 8-細胞期에서 16-細胞期까지, 16-細胞期에서 桑實胚期까지 所要되는 時間은 各各 16.4, 21.7 및 22.9 시간 이었다.

V. 引用文獻

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R. L. Ax and N.L. First, (1983 b). Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. Theriogenology 19, 112.
2. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R. L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First, (1983). Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28, 717-725.
3. Bondioli, K.R. and R.W. Wright, (1983). *In vitro* fertilization of bovine oocyte by spermatozoa capacitation *in vitro*. J. Anim. Sci. 57, 1001-1002.
4. Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A. Dressel, (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27, 147-158.
5. Crister, E.C.S., M.L. Leibfried-Rutledge,

- W.H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First, (1986). Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 25, 150. Abstract.
6. Chang, M.C. (1955). The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *J. Exp. Zool.* 128, 379–406.
 7. Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono, (1983). Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 226, 137–142.
 8. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa, (1988) Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* maturation follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 83, 753–758.
 9. Hensleigh, H.C. and A.G. Hunter, (1985). *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. *J. Dairy Sci.* 68, 1456–1462.
 10. Iritani, A. and K. Niwa, (1977). Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.* 50, 119–121.
 11. Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa and H.B. Song, (1984). Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.* 70, 487–492.
 12. Kajihara, Y., K. Goto, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa, (1987). *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33, 173–180.
 13. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Crister and N.L. First, (1985). Fertilization potential if follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology* 23, 753–759.
 14. Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K., Lohse, N.L. First and R.L. Ax, (1983). Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 28, 683–690.
 15. Lenz, R.W., G.D. Ball, M.L. Leibfried, R.L. Ax and N.L. First, (1982). *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. *Biol. Reprod.* 29, 173–179.
 16. Lu, K.H., M.P. Boland, T.F. Crosby and I. Gordon, (1987). *In vitro* fertilization and cattle oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 27, 251. (abstract).
 17. Moltik, J. and J. Fulka, (1984). Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 36, 235–237.
 18. Newcomb, R., W.B. Christie and L.E.A. Rowson, (1978). Birth of calves after *in vivo* fertilization of oocytes removed from follicles and matured *in vitro*. *Vet. Rec.* 102, 461.
 19. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Crister, W.H. Eyestone, and N.L. First, (1986). Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591–600.
 20. Parrish, J.J., J. Susko-Parrish, M.A. Winer, and N.L. First, (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171–1180.
 21. Pincus, G. and E.U. Enzman, (1935). The comparative behavior of mammalian eggs *in vitro*. 1. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* 62, 665–675.
 22. Sanbuissho, A. and W.R. Threfall, (1985). The effects of estrus cow serum on the maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte *in vivo*. *Theriogenology* 23, 226.
 23. Sirard, M.A., R.O. Lambert, d.P. Menard

- and M. Bedoya, (1985). *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. Biol. Reprod. 33, 487-494.
24. Sirard, M.A., R.D. Lambert, D.P. Menard and M. Bedoya, (1985). Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviducts and their transfer to the cow uterus. J. Reprod. 75, 551.
 25. Sirard, M.A., J.J. Parrish, C.B. Ware, M. L. Leibfried-Rutledge, and N.L. First, (1988). The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. Biol. Reprod. 39, 546-552.
 26. Toyoda, Y. and M.C. Chang, (1974). Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. J. Reprod. Fert. 36, 9-22.
 27. Xu, K.P., T. Greve, H. Callssen and P. Hyttel, (1987). Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert. 81, 501-504.
 28. Yanagimachi, R., (1974). Maturation and fertilization *in vitro* of guinea pig ovarian oocytes. J. Reprod. 38, 485-488.
 29. 김창근, 정영채, 박재원, 송해범. 1988. 소난포란의 체외성숙과 수정능력에 관한 연구. 한축지 : 30(4) 224-232.
 30. 윤산현, 고대환, 박세필, 박태균, 정길생. 1989. 우난포란의 체외성숙에 관한 연구 I. 난포란의 회수 및 체외배양. 한축지 : 31(4) 201-209.
 31. 정구민, 임경순. 1988. 소의 품종, 배양액의 첨가제 및 발정주기가 난포란의 체외성숙, 수정 및 발생에 미치는 영향. 한축지 : 30(2) 79-89.