

發情牛血清, 卵胞液 및 卵丘細胞의 添加가 牛卵胞卵의 體外成熟 및 受精에 미치는 影響에 관한 研究

金相根·李曉徽·金武剛·朴恒均*·韓邦根**

忠南大學校 農科大學

Studies on the Effects of Estrous Cow Serum, Follicular Fluids and Matured Cumulus Cells on *In Vitro* Maturation and Fertilization of Bovine Follicular Oocytes

Kim, S.K., M.H.Lee, M.K.Kim, H.K.Park* and B.K.Han**

Coll. of Agriculture, Chungnam National University

SUMMARY

These studies were carried out to investigate the effects of estrous cow serum(ECS), fetal calf serum(FCS), bovine follicular fluid(BFF) and matured cumulus cell(MCC) on *in vitro* maturation and fertilization of bovine follicular oocytes.

The ovaries were obtained from slaughtered Korean native cows. The follicular oocytes surrounded with cumulus cells were recovered by aspirating follicular fluid from the visible follicles of diameter 3~5mm.

The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormones, FCS, ECS, BFF and MCC for 24~48 hrs. in a incubator with 5% CO₂ in air at 38.5°C and then matured oocytes were again cultured for 18~20 hrs. with motile capacitated sperm in the TCF(Tyrode calcium-free) solution containing 200μg/ml of heparin.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. The oocytes classified as "A, B, C, D and Degenerative" depending morphological integrity and those were 61.4%, 12.1%, 19.2%, 4.2% and 3.0% of the total oocytes harvested, respectively. The maturation and fertilization rate of the A, B, C class follicular oocytes, cultured in the TCM-199 medium supplemented with 10% FCS were 89.1%, 78.0%, 52.6% and 78.1%, 33.3%, respectively.
2. The maturation and fertilization rate of the follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 5%~20% ECS and FCS were 74.0%~80.6%, 26.2%~30.0% and 71.7%~76.9%, 51.9%~58.0%, and those values were higher the supplement of ECS than FCS.
3. The maturation rate(68.0%~64.6%) and fertilization rate(59.6%~60.4%) of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 10% FCS and 20~30% BFF were

*本 研究는 1990年度 韓國科學財團研究費 支援에 의한 研究 結果의 일부임"

*慶北大學校 農科大學(Coll. of Agri., Kyungpook Natl. Univer.)

**全南大學校 獸醫科大學(Coll. of Vet. Med., Chonnam Natl. Univer.)

higher than those of follicular oocytes cultured TCM 199 medium supplemented with 10% FCS and 10% and 50% BFF.

4. The maturation rate(76.5%) and fertilization rate(61.7%) of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 10% FCS and 1×10^8 /ml cumulus cells were higher than those of follicular oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with 10% FCS and 1×10^4 - 10^5 /ml and 1×10^8 /ml cumulus cells.

I. 緒 論

家畜의 繁殖效率를 增進시키기 위한 方案으로서는 體外受精, 雙胎分娩, 遺傳子, 核移植 및 性判別등의 受精卵移植 分野의 產業的 利用을 위한 새로운 技術開發이 絶실히 要請된다. 이를 위해서는 大量의 受精卵을 簡便하게 生産할 수 있는 體外受精 技術의 確立이 必要하다고 하겠다.

近年에는 受精卵 移植分野의 產業的 利用이 가능해짐에 따라 體外受精 分野의 研究도 활발해져 體外에서 受精한 소 受精卵의 移植에 의한 송아지의 出産이 報告(Brackett 등, 1982; Sirard and Lambert, 1986) 되었다. 그러나 이러한 體外受精이 成功的으로 이루어지기 위해서는 卵자의 成熟, 精子의 受精能獲得과 尖體反應 및 卵管내 環境과 동일한 培養條件등의 技術이 必要하나, 現在로서는 完備한 體外受精의 技術이 確立되어 있지 못한 實情이다.

1965년 Edward에 의해 소 卵胞卵의 體外成熟이 報告된 이후, 이 분야에 관한 많은 研究들이 遂行되었는데, 이들의 研究들을 살펴보면, 體外에서 受精能獲得을 시킨 精子와의 體外受精(Fulka 등, 1982; Ball 등, 1983; Lenz 등, 1983; Leibfried-Rutledge 등, 1985; Hensleigh and Hunter, 1985; Fukushima and Fukui, 1985; Parrish 등, 1986)과 體 내에서 受精能獲得을 시킨 精子와의 體外受精(Iritani and Niwa, 1977; Iritani 등, 1984) 및 體外에서 成熟시킨 卵자의 生殖器道내 移植에 의한 體外受精(Fulka 등, 1982; Dooley, 1984)등으로 구분할 수가 있다.

그러나 소 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에는 卵자의 形態, 培養方法 및 培養條件에 따라 차이(Shalgi 등, 1979; Leibfried and First, 1980; Ball 등, 1981; Fukui 등, 1982; Dooley, 1984; 金 등, 1988; 金과 朴, 1988; 尹 등, 1989; 金 등, 1990)가 있다.

遺傳形質이 우수한 소의 卵胞卵을 채취하여 體外培養을 통해 成熟시킨 후 體外受精에 의해 대량으로 受精卵을 生産할 수 있다면, 이의 移植에 의한 급속한 家畜의 改良은 물론, 種雄畜의 受精能의 評價와 特定品種의 生産, 多胎生産과 品種 및 系統保存에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 細胞分離에 의한 卵性 複數子(雙子, 四子)의 生産, 核移植에 의한 clone 動物의 生産, chimera 動物의 作出, 遺傳子 移植에 의한 新品種 作出등의 研究와 技術開發에 크게 寄與할 수 있을 것으로 期待된다.

이에, 本 研究은 소 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 미치는 要因 즉 卵胞卵의 形態, 血清, 卵胞液 및 卵丘細胞의 添加등에 따른 體外成熟 및 體外受精率을 究明하고자 遂行하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 卵胞卵의 回收

正常生殖器를 가진 屠殺直後의 雌畜 韓牛(體重 270~500kg)의 卵巢를 摘出하여, 100IU/ml의 penicillin G 와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 添加한 38°C의 生理的 食鹽水에 浸漬하여 2時間이내에 實驗室로 옮겨, 精巢표면을 洗滌하고 濾過紙로 卵巢표면의 습기를 제거한 다음 18gauge 注射器로 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40 \times)하에서 卵胞卵을 回收하여 培養液으로 3회 洗滌하였다.

2) 發情牛 血清의 分離

發情徵候를 나타낸 雌畜 成牛의 頸靜脈으로부터 채혈한 血液을 3,000rpm으로 10분간 2회 遠心分離한 후, 上層液을 回收하여 0.2 μ m millipore filter로 濾過한 다음, 56°C에서 30분간 非動化 처리후에 -20°C에 보관

하면서 이용하였다.

3) 卵胞液의 準備

直徑 10mm 이상의 정상적인 卵胞를 供試하여 卵胞液을 채취한 후 2,000rpm으로 10분간 遠心分離하여 上層液을 濾過 및 非動化 처리후 -20°C 에 보관하면서 이용하였다.

4) 卵丘細胞의 準備

肉眼的으로 투명한 직경 5~10mm의 卵胞를 摘出하여 實體顯微鏡하에서 微細 pincette을 이용하여 卵胞 주변의 間質組織을 제거한 후 卵丘細胞를 回收하였다. 回收한 卵丘層 細胞는 시험관에 채취하여 500rpm으로 5분간 遠心分離하여 上層液을 제거한 후 10% FCS를 添加한 TCM-199를 2~3ml 添加하여 2회에 걸쳐 1,700rpm으로 5분간 遠心分離하여 上層液을 버리고 細胞數를 계산하여 培養液에 添加하였다.

5) 培養液

卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精을 위한 基本培養液은 TCM-199(Whittaker, M.A., Bioproducts Co. USA)로 10%(v/v)의 FCS와 $1\mu\text{g/ml}$ 의 FSH(Sigma, USA), 2IU/ml의 HCG, $1\mu\text{g/ml}$ 의 β -estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 $100\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin sulfate가 添加된 培養液을 이용하였으며, 사용전 $0.2\mu\text{m}$ millipore filter로 濾過 滅菌후 사용하였다.

한편, 培養液에 血清, 卵胞液 및 顆粒膜細胞등의 添加에 따른 體外成熟 및 體外受精率에 미치는 영향을 구명하고자, 基本培養液에 5%, 10%, 15% 및 20%(v/v)의 FCS 및 發情牛血清과 10%, 20%, 30 및 50%(v/v)의 牛 卵胞液과 $1 \times 10^4/\text{ml}$, $1 \times 10^5/\text{ml}$, 1×10^6 및 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 의 卵丘細胞를 添加하여 시험에 사용하였다.

2. 方法

1) 卵胞卵의 體外成熟

卵胞卵의 體外培養은 體外成熟用 培養液 $50\mu\text{l}$ 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 培養 2~3時間前에 CO_2 배양기내(5% CO_2 , 95% air, 38.5°C)에서 5~6시간 平衡시킨 후 小滴當 5개의 卵胞卵을 浸漬하여 24時間 培養하였다.

2) 精子的 受精能獲得

凍結精液을 38°C 의 恒溫水槽에 약 1分간 浸漬하여 解한 후, 受精能獲得 培養液 TCF(Tyrode calcium free) 1ml에 融解한 精液 0.2ml를 遠心分離用 試驗管내에서 잘 혼합한 후 CO_2 배양기에서 swim-up 처리하였다.

Swim up 처리한 上層液을 受精用 培養液으로 2,000rpm, 10분간 2회 遠心分離하여 세정하고 精子塊를 同량의 $200\mu\text{g/ml}$ 의 heparin(Sigma, USA)과 稀釋하여 15분간 CO_2 培養器에서 受精能獲得을 誘起하였다.

3) 體外受精

體外受精은 成熟培養한 卵胞卵을 受精用 培養液으로 3회 세정 후, 주위의 卵丘細胞를 pipetting에 의하여 일부 제거한 다음 mineral oil로 피복한 $45\mu\text{l}$ 의 受精用 培養液 小滴에 5개의 卵胞卵을 주입한 후, 受精能獲得을 誘起시킨 精子淨遊液 $2\mu\text{l}$ ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$)로 媒精하였다.

4) 成熟 및 受精의 判定

卵胞卵의 成熟 및 受精의 判定은, 回收한 卵胞卵을 24時間 培養후 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)에 의해 卵丘細胞를 제거한 후 slide glass에 滴下하여 25% acetic acid에 24~48時間 固定한 다음 1% acetic-orcein으로 染色하여 Shea 등(1976)과 Ball 등(1984)의 判定基準에 준하여 成熟도와 受精與否를 判定하였다.

III. 結果 및 考察

1. 卵胞卵의 形態的 分類 및 體外成熟率과 受精率

소의 卵巢卵胞로부터 채취한 卵胞卵의 形態的 分類를 실시한 후, TCM-199 培養液에서 배양했을 때의 體外成熟率 및 體外受精率은 Table 1 및 2에 나타난 바와 같다.

卵胞卵의 形態的 分類는 透明帶에 부착한 卵丘細胞層의 有無와 成長에 따라 분류하는 花田(1985)의 방법에 준하여 분류하였을 때, 總 採取卵 1,256卵 중 A型卵은 61.5%, B型卵은 12.1%, C型卵은 19.2% 및 D型卵은 4.2%였다. 이러한 결과는 A, B, C 및 D型卵의 비율이 각각 57.2%, 9.6%, 25.7% 및 7.5%였다고 보고한 花田(1985)의 結果와 대체로 유사한 결과였다.

Table 1. Morphological classification of bovine follicular oocytes recovered from an ovarian follicle

No. of oocytes examined(%)	Morphological classification				Degenerative
	A	B	C	D	
1256 (100)	772 (61.4)	152 (12.1)	241 (19.2)	53 (4.2)	38 (3.0)

Table 2. In vitro maturation and fertilization rate of bovine oocytes calssified by cumulus cells

Grade of oocytes	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%) *	No. of oocytes fertilized(%)**
A	64	57(89.1)	50(78.1)
B	59	46(78.0)	39(66.1)
C	57	30(52.6)	19(33.3)

*The number of oocytes matured to the second metaphase

**The number of oocytes fertilized

A : Oocytes with compact, dense cumulus cells

B : Partially naked oocytes with thin cumulus layer or small remnants of cumulus cells

C : Naked oocytes

또한, 形態의 分類에 의해 분류된 A, B, C 型卵을 培養液에 培養했을 때, 體外成熟率은 각각 89.1%, 78.0%, 52.6%였으며, 體外受精시의 受精率은 각각 78.1%, 66.1%, 33.3%로 나타났다. 이로 미루어 볼 때, 未熟卵卵은 形態의 分類를 통해 선별한 후 培養

하는 것이 우수한 體外成熟率 및 體外受精率을 얻을 수 있는 것으로 思料된다.

2. 發情牛血清 및 牛胎兒血清의 添加效果

소 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 있어서 發情牛血清과 牛胎兒血清을 각각 첨가한 TCM-199 培養液에서

Table 3. Effects of a various concentration of estrous cow serum(ECS) and fetal calf serum (FCS) added to culture media on in vitro maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes

Concentration of serum	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%) *	No. of oocytes fertilized(%)**
5% ECS	47	35(74.5)	26(55.3)
10% ECS	52	40(76.9)	27(51.9)
15% ECS	50	38(76.0)	29(58.0)
20% ECS	45	32(71.7)	26(57.8)
5% FCS	45	35(77.8)	13(28.9)
10% FCS	42	33(78.6)	11(26.2)
15% FCS	47	38(80.6)	14(29.8)
20% FCS	50	37(74.0)	15(30.0)

*The number of oocytes matured to the second metaphase

**The number of oocytes fertilized

배양했을 때의 體外成熟率 및 受精率은 Table 3에서 보는 바와 같다.

5%의 發情牛血清을 培養液에 첨가했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 각각 74.5%와 55.3%를 나타냈으며, 10%의 發情牛血清 첨가시의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.9%와 51.9%를 나타냈다. 또한 15% 및 20%를 첨가했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.0%와 58.0%, 71.7%와 57.8%였다.

한편, 5%의 牛胎兒血清을 TCM-199 培養液에 첨가하여 배양했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 각각 77.8%와 28.9%였으며, 10%이 牛胎兒血清을 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 78.6%와 26.2%를 나타냈다. 또한 15% 및 20%의 牛胎兒血清을 첨가했을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 80.6%와 29.8%, 74.0%와 30.0%로서 대체적으로 높은 體外成熟率과 受精率을 나타냈다.

이러한 결과는, 發情牛血清이 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 있어서 우수한 결과를 나타냈다고 한 Sanbuissho와 Threlfall(1985), Xu 등(1987), Lu 등(1987)의 報告와 일치하였으나, 牛胎兒血清이 發情牛血清에 비해 成熟率과 受精率에 있어 다소 높은 성적을 얻었다고 한 Fukui와 Ono(1989)의 보고와는 相異한 결과였다. 그러나, 發情牛血清과 牛胎兒血清간에는 體外成熟率에 있어서는 큰 차이가 없으나, 혈청을 첨가한 培養液에 FSH와 HCG 등의 호르몬의 첨가에 의한 卵丘細胞의 膨化로 精子의 受精能獲得과 受精率의 증진을 가져온다는 Ball 등(1983)의 報告와 일치하는 것으로 思料된다.

3. 卵胞液의 添加效果

排卵直前の 卵胞에서 채취한 卵胞液을 첨가한 培養液

에서 體外培養한 소 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 Table 4에서 보는 바와 같다.

10%의 卵胞液을 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 67.9%와 54.7%였으며, 20%의 卵胞液을 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 68.0%와 59.6%를 나타냈다. 卵胞液을 30% 및 50%를 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 64.6%와 60.4%, 58.8%와 54.9%를 나타냈다.

本 試驗에서 卵胞液을 첨가한 培養液에서 卵胞卵을 培養한 결과, 卵胞卵의 정상적인 成熟率이 증가하였는데, 이러한 결과는 卵胞가 성숙함에 따라 卵胞液의 抑制效果가 감소한다고 한 Stone 등(1982)의 報告와 卵胞가 크기 및 顆粒膜細胞의 成熟度에 따라 卵胞液의 組成이 변화된다고 한 Tsafriri 등(1982)의 報告와 일치하는 것으로 判斷된다.

4. 卵丘細胞의 添加效果

10%의 牛胎兒血清과 成熟 卵丘細胞를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 Table 5에 나타난 바와 같다.

10% 牛胎兒血清과 1×10^4 /ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 75.0%와 47.9%였으며, 10%의 牛胎兒血清과 1×10^5 /ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 71.4%와 55.1%였다. 또한 10%의 牛胎兒血清과 1×10^6 /ml 및 1×10^8 /ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.5%와 61.7%, 73.0%와 61.5%였다.

이러한 결과는, 培養液에 成熟 卵丘細胞를 첨가했을 때 體外成熟率 및 受精率이 향상된다고 한 Ball 등(1983) 및 Crister 등(1986)의 報告와 일치하였다. 그

Table 4. Effects of a various concentration of bovine follicular fluids(BFF) added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes

Concentration of BFF	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized(%)**
10%	53	36(67.9)	29(54.7)
20%	47	32(68.0)	28(59.6)
30%	48	31(64.6)	29(60.4)
50%	51	30(58.8)	28(54.9)

*The number of oocytes matured to the second metaphase

**The number of oocytes fertilized

Table 5. Effects of a various concentration of cumulus cell added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes

	No. of cumulus cell	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured (%)*	No. of oocytes fertilized (%)**
10%FCS	1×10 ⁴ /ml	48	36 (75.0)	23 (47.9)
10%FCS	1×10 ⁵ /ml	49	35 (71.4)	27 (55.1)
10%FCS	1×10 ⁶ /ml	47	36 (76.5)	29 (61.7)
10%FCS	1×10 ⁸ /ml	52	38 (73.0)	32 (61.5)

*The number of oocytes matured to the second metaphase

**The number of oocytes fertilized

러나, Tsafiri 등(1976)과 Hillensjo 등(1976, 1981)은 卵胞液내에는 卵胞卵의 成熟 抑制物質이 있어 卵胞卵의 성숙을 억제한다고 報告하였으나, Nekola와 Smith(1974) 및 Jagiello 등(1977)은 卵丘細胞와 共培養했을 때 卵胞卵의 成熟을 억제하지 않는다고 報告하였다.

IV. 摘要

본 研究는 소의 未熟卵胞卵을 채취하여 形態的 分類를 통해 우수한 卵을 供試한 후 血清, 卵胞液, 成熟 卵丘細胞등을 첨가한 TCM-199培養液에서 培養하면서 體外成熟率과 體外受精率을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 소 卵胞卵을 채취하여 培養을 통해 形態的 分類를 했을 때 A型卵은 61.4%, B型卵은 12.1%, C型卵은 19.2%, D型卵은 4.2%였으며 發生中止 또는 退化卵은 3.0%였다. 또한 A, B, C型卵을 培養液에 배양했을 때 卵胞卵의 體外成熟率은 각각 89.1%, 78.0%, 52.6%였으며, 受精率은 각각 78.1%, 66.1%, 33.3%였다.
2. 發情牛血清 5%~20%를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 體外成熟率은 71.7%~76.9%, 受精率은 51.9%~58.0%였으며, 牛胎兒血清 5%~20%를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率은 74.0%~80.6%, 受精率은 26.2%~30.0%로서, 體外受精率에 있어서는 發情牛血清의 첨가가 牛胎兒血清의 첨가에 비해 높았다.
3. 排卵직전의 卵胞에서 채취한 卵胞液 20%~30%를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 卵胞卵의 體外成

熟率은 각각 68.0%와 64.6%, 受精率은 각각 59.6%와 60.4%로서 卵胞液 10%, 50%를 첨가한 培養液에서 배양시의 成熟率과 受精率에 비해 높았다.

4. 1×10⁶/ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가한 培養液에서 배양했을 때의 卵胞卵의 體外成熟率과 受精率은 각각 76.5%와 61.7%로서 FCS 10%와 1×10⁴-10⁵/ml와 1×10⁸/ml의 成熟 卵丘細胞를 첨가한 培養液에서 배양시의 體外成熟率과 受精率에 비해 높았다.

V. 引用文獻

1. Ball, G.D., M.E.Bellin, R.L.Ax and N.L. First. 1981. Glycosaminoglycans in individual preovulatory and cystic bovine ovarian follicles. J. Anim. Sci., 53(Suppl. 1) : 285.
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. 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.
4. 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).
5. Dooley, V.D. 1984. Follicular oocytes maturation for use in bovine exogenous and *in vitro*. Metabolism, 26: 413.
 6. Edwards, R.G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human oocytes. Nature, 208: 349-351.
 7. Fukui, Y. and H. Ono. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. Vet. Rec., 122: 282.
 8. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells and added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J.Reprod. Fert., 86: 501-506.
 9. Fukushima, M. and Y.Fukui. 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes cultured *in vitro*. Anim. Reprod. Sci., 9: 232-242.
 10. Fulka, J.Jr, J.A.Pavlok and J.Fulka. 1982. *In vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert., 64: 495-499.
 11. 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: 1456-1562.
 12. Hillensjo, T., S.Bauminger and K.Ahren. 1976. Effect of LH on pattern of steroid production by preovulatory follicles of PMS-injected immature rats. Endocrinology, 99: 996-1002.
 13. Hillensjo, T., S. Chari, C.Magnusson, E. Duame and G.Sterm. 1981. Inhibitory effects of low molecular weight fractions of human follicular fluid upon rat granulosa cells and oocytes *in vitro*. Excerpta. Media. In press.
 14. 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.
 15. 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. Fertil., 70: 487-492.
 16. Jagiello, G., J.Graffeo, M.Ducayen and R.Prosser. 1977. Further studies of inhibitors of *in vitro* mammalian oocyte maturation. Fert. Steril., 28: 476-481.
 17. Leibfried-Ruledge, M.L., E.S.Crister and N.L.First. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. Theriogenology, 23: 753-759.
 18. Leibfried, L. and N.L.First. 1980. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. Biol. Reprod., 23: 705.
 19. Lenz, R.W., G.D. Ball, M.L.Leibfried, R.L.Ax and N.L.First. 1983. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. Biol. Reprod., 29: 173-179.
 20. Lu, K.H., M.P.Boland, T.F.Crosby and I.Gordon. 1987. *In vitro* fertilization of cattle oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 27: 251 (abstract).
 21. Nekola, M.V. and D.M.Smith. 1974. Oocyte maturation and follicle cell viability *in vitro*. Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol. Suppl., 4: 125-131.
 22. 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: 591-560.
 23. Sanbuissho, A. and W.R. Threlfall. 1985. The effects of estrous cow serum on the maturation and fertilization of the bovine

- follicular oocyte *in vitro*. Theriogenology, 23 : 226(abstract).
24. Shalgi, R., N.Dekel and P.F.Kraicer. 1979. The effects of LH on the fertilizability and subsequent developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert., 55 : 429-435.
 25. Sirard, M.A. and R.D.Lambert. 1986. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. Vet.Rec., 119 : 167-169.
 26. Stone, S.I., S.H. Pomerantz, A.Schwartz-Krippner and C.P.Channing. 1978. Inhibition of oocytes maturation from a porcine follicular fluid; further purification and evidence for reversible action. Biol. Reprod., 19 : 585-592.
 27. Tsafiriri, A., S.H.Pomerantz and C.P. Channing. 1976. Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluidipartical characterization of the inhibitor. Biol. Reprod., 14 : 511-516.
 28. Tsafiriri, A., N.Dekel and S.Bar-ami. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. J.Reprod. Fert., 541-551.
 29. Xu, K.P., T.Greve, H.Callensen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocyte matured and fertilized *in vitro*. J.Reprod. Fert., 81 : 501-504.
 30. 花田 章. 1985. 牛卵胞内 未熟卵子からの受精卵生産. 臨床獣醫, 3(9) : 71-75.
 31. 金相根, 朴恒均. 1988. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 12(2) : 112-119.
 32. 金相根, 李晚徽, 李明憲, 申溶浩. 1990. 돼지 卵胞卵의 體外成熟 및 受精에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 14(1) : 23-30.
 33. 金昌根, 鄭英彩, 朴在元, 宋海範. 1988. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精能力에 관한 研究. 韓國畜産學會誌, 30(4) : 224-232.
 34. 尹山鉉, 朴世必, 朴泰均, 高大煥, 鄭吉生. 1989. 牛 卵胞卵의 體外成熟에 관한 研究. II. 發情牛血清, 牛卵胞液 및 卵丘細胞가 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精에 미치는 影響. 韓國酪農學會誌, 11(3) : 139-146.