

한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구

황우석 · 조충호 · 이병천 · 신태영 · 노상호 · 김성기 · 전병준 · 이강남* · 신언익** · 임홍순**

서울대학교 수의과대학

Birth of Calf Following Transfer of Bovine Embryos Produced by Maturation, Fertilization and Development *In Vitro* with Korean Native Cattle Semen

W.S. Hwang, C.H. Jo, B.C. Lee, T.Y. Shin, S.H. Roh, S.K. Kim, B.J. Chun,

K.N. Lee, O.I. Shin, and H.S. Yim

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

SUMMARY

The objective of this study was to produce calves derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. Oocytes aspirated from small antral follicles of ovaries obtained at a local slaughter house were matured and fertilized *in vitro*. At 18hrs after insemination with Korean native cattle semen, oocytes were co-cultured for 6~7 days by utilizing co-culture system with bovine oviduct epithelial cell. After co-culture, good or excellent quality late morulae or early blastocysts were selected by morphological criteria under stereo microscope. Selected embryos were transferred to recipients on day 6 or 7 (estrus = day 0). Recipients were monitored by observation for estrus and rectal palpation after 60 days from embryo transfer. One of them went to term with the birth of a calf. This case is the first production of calf derived from *in vitro* fertilization in Korea.

서 론

소 난자의 체외성숙 및 체외수정에 관한 다수의 성공예가 수행 보고된 이래(Parrish 등, 1986; Iritani 등, 1984; Ball 등, 1984; Brackett, 1983) 1981년 체외수정 유래 송아지의 생산예가 최초로 보고되었다(Brackett 등, 1982). 이후 다수의 체외수정 유래 송아지가 태어났으나(Brackett 등, 1984; Sirard 등, 1985) 모두 체내성숙난자를 이용, 체외에서 수정한 후 초기배를 수란우에 이식하였으

므로 난자의 회수와 수정란의 이식에 있어서 수란우의 난관까지 외과적인 방법으로 접근해야 했기 때문에 실제 임상에 적용하기에는 적합하지 못하였다.

체외수정에 있어 다수의 난자를 확보하기 위해서는 전술한 체내성숙난자 또는 도축우의 미성숙난자를 체외에서 성숙배양하여 사용하게 되는 데 후자를 이용하는 것이 더 용이하고 경제적이기 때문에 대부분의 체외수정연구에 있어서 체외성숙과정이 수반된다. 그러나, 체외성숙배양시 다정자침입, 이상분할 및 분할정지등 비정상발육이 나타나므로 핵

*이수의과병원(Dr. Lee's Veterinary Clinic)

**축협중앙회 한우개량사업소(Korean Native Cattle Improvement Center, National Livestock Cooperatives Federation)

과 세포질의 완전한 성숙을 위하여 hormone, 혈청, 각종 세포 및 여러 성장인자 등을 이용하여 연구해 왔다(Leibfried-Rutledge 등, 1986; Fukui와 Ono, 1989; Coskun 등, 1991).

체외수정 유래 수정란의 비외과적 이식을 위해서는 초기배의 체외배양에 관한 연구가 필수적으로 배양중 발생하는 8~16세포기의 cell-block을 극복하기 위해 토끼나 면양의 난관내에서 일시적으로 배양하거나(Boland, 1988), 난관상피세포(Eyestone과 First, 1989), 난구세포(Goto 등, 1988), 과립막세포(Fukui와 Ono, 1988), 영양막세포(Camous 등, 1984) 및 자궁내막세포(Voelkel 등, 1985) 등 각종 세포와의 co-culture를 통한 초기배의 배양에 관한 연구가 수행되어 왔다. 난관은 종특이성에 무관하게 수정란의 배양이 가능하므로 소수정란을 토끼난관내 가이식, 회수하여 후기배를 얻게 되는데 Sirard와 Lambert(1986)는 개복술에 의해 회수된 체내성숙 난자를 체외에서 수정하여 토끼난관내 배양후 외과적, 비외과적 자궁경관경유법을 사용, 수란우에 이식하였고, Hanada(1986)는 체외성숙, 체외수정 유래 수정란을 토끼난관내 배양한 후 비외과적인 방법으로 수란우의 자궁에 이식하여 임신에 성공하였다. 한편 Eyestone과 First(1989)는 난관상피세포 및 난관상피세포배양액으로 체외 배양한 수정란을 수란우에 이식하여 5마리의 건강한 송아지를 생산, 체외수정 유래의 수정란이 정상란과 같이 발육할 수 있음을 증명하였고, Fukui와 Ono(1988)는 과립막세포와의 co-culture를 이용, 체외수정 유래 수정란을 배양하여 1마리의 송아지를 생산하였다.

국내에서는 황 등이 수란우의 조건 및 동결란에 관한 연구(황우석과 조충호, 1988; 이 등, 1989a; 이 등, 1989b) 등 다수의 연구성과로 비외과적 자궁경관경유법에 의한 수정란의 이식기술을 확립하였고 이후 소난포란의 체외성숙시 혈청, HEPES, 및 과립막세포의 효과(허 등, 1990), 체외수정시 소정자의 수정능획득에 관한 연구(김 등, 1991) 및 체외수정 및 배양에 있어서 과립막세포의 효과(신 등, 1991) 등 소의 체외수정에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 이와 함께 수란우로의 비외과적 이식을 위해 필수적인 체외수정 유래의 후기배를 확보하기

위해 소 초기배의 체외배양에 관한 연구(황 등, 1990), 소 초기배의 난관상피세포와의 배양(박 등, 1992) 및 토끼 난관내 배양에 관한 연구(정 등, 1993) 등 체외수정 및 소초기배의 배양에 관한 국내 업적을 이루었으나 체외수정 유래 소수정란을 이식하여 송아지를 생산한 전례는 현재까지 보고된 예가 없는 실정이다.

필자 등은 그간의 연구결과를 바탕으로 상피성장인자(epidermal growth factor, 이하 EGF로 약함)의 첨가와 과립막세포와의 co-culture를 이용한 체외성숙, 한우동결정액을 사용한 체외수정 및 난관상피세포와의 co-culture를 이용한 체외배양을 통해 얻어진 후기상실배 및 초기배반포를 비외과적 자궁경관 경유법에 의해 수란우에 이식하여 산자를 얻기 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취

도축장에서 도살된 holstein종과 한우의 암소로부터 외과용 가위를 이용, 난소를 채취하여 100 IU/ml의 penicillin과 100 g/ml의 streptomycin이 첨가된 30~35℃의 생리식염수에 보존후 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 난소는 38℃의 멸균된 생리식염수로 1회 세정하였다. 난자는 18 gauge needle이 부착된 주사기로 5%의 fetal calf serum(Flow laboratories Inc, Australia, 이하 FCS로 약함)이 첨가된 38℃의 tissue culture medium 199(Gibco, USA, 이하 TCM199으로 약함)을 2 ml 정도 흡입한 후 직경 3~5 mm의 소난포로부터 채취하였다. 회수된 난포란은 Wiemer 등(1991)의 기준에 준해 난구세포가 치밀하게 부착된 것만을 선별하여 사용하였다.

2. 체외성숙

육안적으로 정상이라고 인정되는 직경 10~15 mm의 성숙난포로부터 채취된 과립막 세포를 5% FCS첨가 TCM199으로 3회 세정한 후 10% FCS첨가 TCM199이 분주되어 있는 4-well dish(Nunc, USA)에 5.0×10^6 cell/ml의 농도로 각각의 well에 첨가하고 10 ng/ml의 EGF(Boehringer Mann-

heim, Germany)를 첨가하여 전배양을 실시하였다. 선별된 난자는 각각의 well에 10~15개씩 첨가하여 39°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기내에서 23~24시간 성숙배양하였다.

3. 체외수정

1) 정자의 처리

정액은 straw당 5×10^7 개의 정자가 들어있는 한우의 동결정액(축협중앙회 한우개량사업소)을 사용하였으며 기본배양액은 TALP-medium(Parrish 등, 1988)을 사용하였다.

동결정액은 38°C 수조에 30초간 침지하여 진탕용해시킨다. Sperm-TALP(이하 sp-TALP로 약함)가 1 ml씩 분주되어 있는 11 × 55 mm의 plastic tube에 용해된 정액을 pasteur pipette을 이용하여 0.2 ml씩 분주한 후 1시간 동안 CO₂ 배양기내에서 swim-up 과정을 실시하였다. 각 시험관의 상층액 약 0.8 ml를 micropipette으로 흡입하여 정자를 하나의 원심관에 모아 원심분리 하여(700 g, 5분) 생존성 있는 활력정자를 선별하였다. 원심분리 후 상층액을 제거한 다음 새로운 sp-TALP를 2~3 ml 보충해주는 방법으로 3회 세정을 실시하여 동결보호제 및 희석액을 제거하였다. 정자는 농도를 1.0×10^8 /ml로 조정 한 후 수정능획득을 위해 동량의 heparin(200 µg/ml)을 첨가하여 39°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기에 15분간 정치하였다.

2) 난자의 준비

정자를 swim-up시키는 동안 IVF-TALP 배지로 35 mm petri dish(Costar, USA)에 40 µl의 미소적을 작성한 후 light white oil(Mineral oil, Sigma, USA)을 도포하였으며 성숙난자는 세정하여 팽대된 난구세포를 정도 조심스럽게 벗겨 5 µl의 배지로 5개씩 각 미소적에 첨가하였다.

3) 체외수정

정자는 heparin 처리후 동량의 sp-TALP를 혼합하여 준비된 난자의 미소적에 5 µl씩 첨가하여 최종 농도가 2.5×10^6 /ml가 되도록 하여 18시간 동안 39°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기 내에서 배양하여 체외수정을 실시하였다.

4. 체외배양

난관상피세포는 난소표면에 출혈체를 보이거나 2 g 미만의 황체조직을 나타내는 초기황체기의 난관에서 관류법에 의해 채취하여 5% FCS첨가 TCM199으로 3회 원심분리(500 g, 5분)하였다. 난관상피세포는 10% FCS첨가 TCM199이 0.5 ml씩 분주되어 있는 24-well plate에 36~48시간 동안 배양하여 난관상피세포의 monolayer를 형성시켜 수정란과 함께 배양하기 3시간 이전에 배지를 교환하여 monolayer가 불완전한 세포를 제거하고 배양액을 평형시켰다. 수정란은 3회 세정후 배양중인 난관상피세포와 co-culture를 실시하였고 수정으로부터 120시간후의 후기배를 분류하여 144~168시간후에 이식에 공여하였다.

5. 체외 수정란의 이식

1) 수란우의 준비

수란우로는 본 실험실에서 보유하고 있는 경기도 화성군 양감면 신왕리 소재 큰재은 목장에서 사육하고 있는 Holstein유우를 이용하였다. 수란우로 사용한 Holstein유우(이하 수란우)는 공히 생후 18개월 이상이며, 임상적 소견과 임상병리학적 검사에 의하여 건강하다고 인정되고, 처치전까지 3회 이상의 정상적인 발정주기를 보인 미경산우 및 경산우로서 발정 7일째에 최종 이식할 수란우를 선발할 목적으로 직장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치(좌 또는 우)와 형태를 확인하였다. 황체의 크기가 정상(15~25 mm)이고 좋은 형태의 crown을 지닌 것을 1등급으로, 정상크기이나 crown이 없는 것을 2등급으로 하여 이식에 사용하며, 2등급 미만의 황체를 지닌 소는 수란우에서 제외시켰다.

2) 수정란의 준비

상실배 또는 배반포기까지 체외배양시킨 수정란을 20% FCS가 함유된 phosphate buffered saline(Gibco laboratories, USA)로 수정란을 0.25 ml french straw에 흡인하여 봉한 후, 보온병에 넣어 이식장소(양감면 큰재은목장)까지 1시간 이내에 운반하여 수란우에의 이식에 공여하였다(Fig. 1).

3) 수정란의 이식

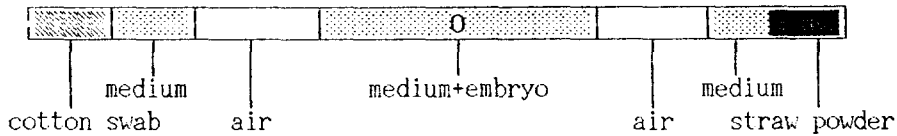


Fig. 1. Preparation of straw for transfer.

모든 수란우는 이식 12시간 전부터 절식시키고, 이식을 용이하게 하기 위해 이식직전에 2% lidocaine액 5 ml로 척추경막외마취를 실시하였다. 주사후 꼬리를 묶어 앞으로 고정시킨 후 외음부 주위를 소독액 및 멸균생리식염수로 세정하고 멸균된 tissue paper로 물기를 제거하였다. 이식방법은 Rowe 등(1980)의 방법에 준하여 straw가 장착된 수정란이식기를 이용, 비외과적 자궁경관경유법에 의해 자궁각 선단부의 자궁난관 접합부 5 cm 부위에 수정란을 이식하였다.

4) 수태율 판정

이식한 후 60일경에 직장검사법에 의한 태막 및 태아 촉진법으로 수태 여부를 판정하고 이후 매 2개월마다 태아의 정상발육 여부를 검정하였다.

결과 및 고찰

과립막세포와의 co-culture와 EGF를 이용한 체외성숙, 한우동결정액을 이용한 체외수정 및 난관상피세포와의 co-culture를 통해 배양한 후기상실배 및 초기배반포의 수정란을 난의 발육단계와 발정주기가 일치하는 Holstein종 수란우에 이식하여 소의 체외수정유래 산자를 생산하였다.

면양에서 Dauzier와 Thibault(1959)가 배란된 난자를 이용하여 체외수정에 성공한 이래 소와 돼지(Edwards, 1962)를 비롯한 여러 종에서 체외성숙 및 체외수정에 관한 연구가 진행되어 왔다. 동물에서의 체외수정은 사람에서와 달리 불임의 치료, 희귀동물의 보존 및 생산성 향상의 여러가지 측면에서 연구가 이루어져 왔으며 그중 소에서의 체외수정은 확률만 높다면 과배란치리에 비하여 다수의 난자를 값싸게 획득, 이식에 공여할 수 있다는 점에서 임상적으로나 기초번식생리연구에 있어서 가치가 있는 분야로 최근까지 많은 연구가 진행되어오고 있다.

체외성숙, 체외수정 및 체외배양한 수정란은 체외배양시 8~16세포기에서 발육이 정지되는 *in vitro* block현상(Bavister, 1988)과 체내 발육란에 비하여 내세포의 세포수가 감소되는 등(Iwasaki 등, 1990) 이식 가능한 수준까지의 배양과 이식후 정상적인 발육률이 낮아서 수란우로의 이식을 통한 산자생산은 용이하지 않은 실정이다. 소의 체외수정유래 산자의 대부분은 초기에 체내성숙 난자를 회수, 체외수정하여 외과적 방법으로 발정동기화된 수란우에 이식하거나(Brackett 등, 1982) 수정란을 면양, 토끼 등의 난관에서 일정기간 배양한 후 외과적, 비외과적 방법으로 이식하는 방법(Sirard 등, 1985)으로 태어났다. 그러나, Critser 등(1986)과 Hanada(1986)는 체외성숙, 체외수정 유래 수정란을 면양, 토끼등의 난관에서 배양한 후 최종적으로 수란우에 이식하여 임신에 성공하였다. 이후 체세포와의 체외배양 및 수정란동결기술의 발달로 Fukui와 Ono(1988)는 과립막세포와의 co-culture를 이용, 체외수정 유래 수정란을 배양하여 1마리의 송아지를 생산하였고, Lu 등(1990)은 소수정란의 체외성숙, 체외수정 및 과립막세포 및 난관상피세포와의 co-culture를 통해 얻은 후기배를 직접, 또는 동결융해후 비외과적 방법을 통해 수란우에 이식하여 임신을 확인하는 과정까지 이르게 되었다.

본 연구에 사용된 난자는 도축장 유래 난소에서 회수한 미성숙 난자로 과립막세포와의 co-culture 및 EGF의 첨가를 통한 체외성숙, 한우동결정액을 이용한 체외수정, 난관상피세포와의 co-culture에 의한 체외배양 등을 통하여 후기배생산의 전과정을 체외에서 행하였다. 선별된 난자가 체외성숙과 체외수정과정을 거쳐 분할에 이른 비율은 67.9% (Table 1)로 Fukui와 Ono(1989)의 42.5~59.1% 및 수정율을 조사한 Goto 등(1988)의 63% 와 유사하거나 약간 높은 비율이었으나 Sirard 등(1988)의 69~88% 보다는 약간 낮은 비율이었다. 체외배양

Table 1. Development of *in-vitro* fertilized bovine embryos

No. of matured	No. (%) of cleaved	No. (%) of embryos			
		≤16cells	morulae	blastocysts	morulae≤ /cleaved
280	190(67.9)	122(64.2)	35(18.4)	33(17.4)	68 /190(35.8)

* *In-vitro* fertilized embryos cultured in TCM199 with BOEC(bovine oviductal epithelial cell monolayer)

* Embryos were examined 168hrs post-insemination

에 의해 생산된 후기배의 비율(morula, blastocyst; 35.8%)은 같은 난관상피세포와의 co-culture를 이용한 Eyestone과 First(1989)의 43% 보다는 낮은 수준이었으나 난구세포와의 co-culture를 이용한 Goto 등(1988)과는 비슷한 수준이었다. 수정란이식을 실시한 후 직장검사에 의해 임신이 확인된 수란우를 분만시까지 관찰하여 체외수정 유래의 송아지의 생산에 성공하였다. 또한 인공수정후 체외수정란을 이식시 수태가능성을 알아보기 위해 먼저 인공수정을 실시한 후 제 7일째에 체외수정 유래 배반포를 이식하여 임신을 확인, 분만을 기다리는 중에 있다(1993년 10월 현재).

체외수정 자체만을 이용한 산자의 생산은 산업적인 측면에서 아직까지 그 효율이나 경제성 등 재고해야 할 사항이 많으나 우수한 품종의 불임우를 보존한다거나 도축우의 난소를 이용할 수 있다는 점은 체외수정 및 배양의 큰 장점이 될 것이다. 그러나, 앞서 언급한 대부분의 보문의 경우 hormone측정과 초음파진단 등을 통해 임신 여부를 확인하여 태아로의 발생을 확인하는 것만으로 실험을 마치거나 단지 분만결과만을 간단히 언급한 경우가 많아 체외수정 유래 산자에 관한 자세한 정보는 접할 수 없었다. 한편 분만에 성공한 경우도 정상적인 송아지와 차이가 없음을 강조하여 서술한 경우가 많으며 후대검정이 명확히 이루어지지 않아 정상산자와 비교하여 체외수정 유래의 송아지에 어떠한 소인이 있는가를 알기 위해서는 이후 더욱 심도 깊은 연구가 요구될 것으로 사료된다. 나아가 전 과정을 체외에서 행하여 이식에까지 이르는 본 실험과 같은 연구가 진척되어 보편화된다면 이전까지 연구되었던 cell-block의 극복, 각종 성장인자의 영향 등 수정란의 발육단계별 소인에 관한 연구에서의 기여뿐만 아니라 동물에서의 불임치료 및 회귀종의 보존 등에 기여할 수 있으며 한단계 더 응용하여 소의 핵이

식, 유전자주입을 통한 형질전환동물 생산 등에 있어 체외배양 및 수정란이식 등의 뒷받침을 통해 실제 산자를 생산하는 데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

결론

필자 등이 한우동결정액을 사용하여 체외수정유래 송아지를 생산하기 위해 실험을 실시하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 체외성숙, 체외수정과정을 거쳐 얻은 수정란의 분할률은 67.9%였다.
2. 분할된 초기배와 난관상피세포의 co-culture를 통해 배양한 상실배 및 초기배반포의 체외배양 비율은 35.8%였다.
3. 후기배의 일부를 이용, 수정란이식을 실시하여 체외수정유래 송아지를 생산하였다.

필자 등은 국내 최초로 한우동결정액을 사용하여 체외수정유래 송아지의 생산에 성공하였다. 그 과정에서 과립막세포 및 EGF를 이용한 체외성숙, 난관상피세포와의 co-culture를 통한 체외배양등은 체외수정 유래 송아지 생산에 있어서 효율적인 방법으로 생각된다. 특히 실제적인 산자생산을 통하여 향후 핵이식, 유전자주입 및 동결-융해후 수정란의 체외발육등 수정란의 체외조작과 관련된 다양한 연구에 있어 최종적인 목표인 우량종 내지는 특이한 성상을 지닌 산업동물의 생산에 있어서 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

참고문헌

Ball GD, Leibfried ML, Ax RL and First NL. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. J. Dairy Sci., 67:2775-2785.

- Bavister BD. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 29:143-154.
- Boland MP. 1988. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*, 21:126-137.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27:147-158.
- Brackett BG, Keffer LL, Troop LG, Donawick WJ and Bennett KA. 1984. Bovine twins resulting from *in vitro* fertilization. *Theriogenology Abst.*, 21:224.
- Brackett BG. 1983. A review of bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, 19:1-5.
- Camous S, Heymen Y, Méziou W and Ménézo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:479-485.
- Coskun S, Sanbuissho A, Lin YC and Rikihisa Y. 1991. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology*, 36:485-494.
- Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northy DL and First NL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology Abst.*, 25:150.
- Dauzier L and Thibault C. 1959. Donnees nouvelles fur lar fécondation *in vitro* de l'œuf de la Lapine et de la Brebis. *Acad. Sci.*, 248:2655-2656.
- Edwards RG. 1962. Meiosis in ovarian oocytes in adult mammals. *Nature Lond.*, 196:446
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 86:501-506.
- Fukui Y and Ono H. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Rec.*, 122:282.
- Goto K, Kajihara S, Kosaka M, Koba Y, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83:753-758.
- Hanada A. 1986. *In vitro* fertilization of bovine oocytes. *Consultant for Animal Science*, 258:10-15 (in Japanese).
- Iritani A, Kasai M, Niwa K and Song HB. 1984. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 70:487-492.
- Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S and Nakahara T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fert.*, 90:279-284.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES and First NL. 1986. Effects 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.
- Lu KH, Jiang HS, Wang WL and Gordon I. 1990. Pregnancies established in cattle by transfer of fresh and frozen embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of oocytes and their subsequent culture. *Theriogenology Abst.*, 33:278.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and

- First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38:1171-1180.
- Rowe RF, Del Campo MR, Crister JK and Ginther OJ. 1980. Embryo transfer in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 41:1024-1028.
- Sirard MA, Lambert RD, Ménard DP and Bedoya M. 1985. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. *J. Reprod. Fert.*, 75:551-556.
- Sirard MA and Lambert RD. 1986. Birth of calves after *in vitro* fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet. Rec.*, 119:167-169.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.*, 39:546-552.
- Voelkel GF, Amborski GF, Hill KG and Godke RA. 1985. Use of a uterine cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. *Theriogenology*, 24:271-281.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod.* 18:139-148.
- 김계성, 조충호, 황우석. 1991. 배양액중의 Calcium 이온 농도 및 Caffeine, Ca-ionophore A23187 처리가 소정자의 수정능 획득에 미치는 영향. *대한수의학회지*, 31:123-130.
- 박종임, 황우석, 조충호, 이병천. 1992. 소 난관상피 세포배양액이 체외수정 유래 분할란의 발육에 미치는 영향. *한국임상수의학회지*, 9:63-72.
- 신태영, 조충호, 황광남, 황우석. 1991. 과립막세포와의 co-culture가 소 난포란의 체외수정과 분할에 미치는 영향. *한국수정란이식연구회지*, 6:25-32.
- 이병천, 조충호, 황우석. 1989a. 수란우의 혈장 progesterone, estradiol-17 α 및 혈청화학치가 수태율에 미치는 영향. *대한수의학회지*, 29:589-599.
- 이은송, 조충호, 황우석. 1989b. 젖소 동결수정란의 비외과적 이식에 있어서 수정란의 상태 및 수태율에 미치는 영향. *대한수의학회지*, 29:361-371.
- 정혜옥, 황우석, 조충호, 이병천. 1993. 체외성숙 및 체외수정유래 소 수정란의 토끼난관내 배양에 관한 연구. *대한수의학회지*, 33:179-188.
- 허준희, 조충호, 황우석. 1990. 배지에 첨가한 혈청, HEPES 및 과립막세포가 난포외 소난자의 체외 성숙에 미치는 영향. *한국임상수의학회지*, 7:49-57.
- 황우석, 권오경, 조충호. 1990. Studies on the *in vitro* culture of early bovine embryos. *한국임상수의학회지*, 7:147-149.
- 황우석, 조충호. 1988. 소의 비외과적 수정란이식에 있어서 수태율에 영향을 미치는 요인. *한국임상수의학회지*, 5:1-8.