

## 체외수정란 유래의 송아지 생산

한용만 · 이철상 · 이정호 · 김선정 · 신상태<sup>1</sup> · 김동훈<sup>2</sup> · 이훈택<sup>2</sup> · 정병현<sup>2</sup> · 정길생<sup>2</sup>  
김영수<sup>3</sup> · 김영훈<sup>3</sup> · 이근세<sup>3</sup> · 김교국<sup>3</sup> · 황윤식<sup>4</sup> · 이경광  
한국과학기술연구원 유전공학연구소

## Production of Normal Calves after Transfer of IVF-Derived Bovine Embryos

Han Y.M., C.S. Lee, J.H. Lee, S.J. Kim, S.T. Shin<sup>1</sup>, D.H. Kim<sup>2</sup>, H.T. Lee<sup>2</sup>  
B.H. Chung<sup>2</sup>, K.S. Chung<sup>2</sup>, Y.S. Kim<sup>3</sup>, Y.H. Kim<sup>3</sup>, K.S. Lee<sup>3</sup>, K.K. Kim<sup>3</sup>  
Y.S. Hwang<sup>4</sup> and K.K. Lee

Genetic Engineering Research Institute, KIST

### SUMMARY

To verify *in vivo* viability of IVF-derived bovine embryos, morula and blastocysts that developed from *in vitro* matured and fertilized ova were transferred to the uteri of recipient cows and normal calves were produced. To produce IVF-derived bovine morula or blastocysts, ova matured and fertilized *in vitro* were cultured in culture medium for 7~8 days at 39°C under the humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Two different culture systems, a co-culture system with TCM-199 and bovine epithelial cells (BOEC) and CRLaa without somatic cell support, were compared. Cleavage rates to 2~8 cell stage and developmental rates of IVF-derived bovine embryos to blastocyst stage were not different between co-culture system (51.3 and 14.0%) and CRLaa medium (60.4 and 22.1%), respectively. Embryos were classified into three grades by embryo quality and then one or two embryos in higher quality (A and B grades) were transferred to the uterus of recipients. In this study Korean Native calf was first born after transfer of IVF-derived embryos. Total four live calves were normally developed to term from IVF-derived bovine blastocysts and one female fetus was still-born approximately 8 months of gestation, but there was no pregnancy after transfer of morula. Therefore, normal calves could be produced after transfer of IVF-derived bovine embryos cultured in CRLaa medium without somatic cell support. In addition, our results suggest that in transfer of IVF-derived bovine embryos blastocyst stage is better than morula.

\* 본 연구는 과학기술처에서 시행한 선도기술 개발사업 (N80710과 N81030)의 일환으로 수행되었음.

<sup>1</sup> 충남대학교 수의학과 (College of Veterinary Medicine, Chungnam National University).

<sup>2</sup> 건국대학교 동물자원연구센터 (Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University).

<sup>3</sup> 두산농산(주) (Doosan Farmland Products Co., Ltd.).

<sup>4</sup> 두산기술원 (Doosan Technical Center).

## I. 서 론

미성숙 난포란의 체외성숙 (IVM), 수정 (IVF) 및 배양 (IVC) 기술을 통한 소 수정란의 대량생산은 초기 수정란의 발달, 수정란의 이식, 수정란의 절단, 핵 이식, 외래유전자 도입 등 동물 생명공학기술의 발전을 가속화시킬 수 있을 것으로 기대된다(Leibfried-Rutledge 등, 1989; Rexroad, 1989; Gagne 등, 1990). 체외수정 유래된 소 수정란을 자궁내 이식이 가능한 상설배기나 배반포기단계까지 발달시키기 위하여 그동안 여러가지 배양체계가 개발되어 왔다. 이들 배양체계는 SOF (synthetic oviduct fluid; Fukui 등, 1991)나 CRLaa (Rosenkrans 등, 1990; Rosenkrans와 First, 1991)와 같은 배양액에서 수정란을 배양하는 방법 (단순 배양법)과 소 난관상피세포 (bovine oviduct epithelial cells: Eyeston과 First, 1989; Fukui와 Ono, 1989), 난구세포 (cumulus cells: Goto 등, 1988; Fukuda 등, 1990), 과립막세포 (granulosa cells: Goto 등, 1992) 등과의 공동배양법으로 대별할 수 있다. 이 같은 방법을 통해 발달된 체외수정란을 대리모에 이식하여 임신 또는 시험관 송아지가 태어났다는 많은 보고가 있으나 (Goto 등, 1988; Eyestone과 First, 1989; Kajihara 등, 1990; Lu 등, 1990; Reichenbach 등, 1992; Xu 등, 1992; Suzuki 등, 송아지 생산에 관한 연구결과가 보고되었다 (황우석 등, 1993). 그러나 체외수정된 소 수정란을 발달단계별로 이식한 다음, 이에 따른 수태율을 비교 보고한 예는 별로 없다. 본 연구에서는 단순배양법과 공동배양체계에 따른 소 체외수정란의 체외발달을 비교 검토하였으며, 이들 수정란을 발달단계별로 이식하여 송아지 생산을 시도하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 회수 및 체외성숙

도축된 한우 또는 젖소로부터 직출한 난소들을 100 unit/ml penicillin G와 100 $\mu$ g/ml streptomycin sulfate (Sigma, USA)가 함유된 30~33 $^{\circ}$ C의 생리 식염수에 담아, 도축 후 3시간 이내에 실험실로 옮겼다. 생리식염수로 난소를 세정하고, 18 gauge 주사침

이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2~6 mm의 난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡입하였다. 이렇게 회수한 난포란 중 난구세포가 치밀하고 균질한 난세포질을 가진 난포란만을 실험현미경하에서 선별하여, 회수용 배지로 3회 배양용 배지로 1회 세정한 후 체외에서 성숙배양을 실시하였다. 회수용 배지는 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES (N'-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 50  $\mu$ g/ml gentamycin (Sigma, USA)이 포함된 TCM-199 (Gibco 400~1100, USA)에 불활성화 시킨 fetal bovine serum (FBS : Gibco, USA)을 2% 첨가한 것으로, 체외성숙뿐만 아니라 난관상피세포의 배양 및 수정란과의 공동배양에도 사용하였다.

배양용 배지 0.5 ml이 들어있는 4-well dish (Nunc, Denmark)를 2시간 이상 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 평형시킨 후, 각 well에 20~30개의 선별된 난포란을 옮기고 24시간 동안 배양을 실시하였다. 이때 0.01 unit/ml ovine LH (luteinizing hormone), 0.01 unit/ml ovine FSH (follicle stimulating hormone)와 1  $\mu$ g/ml 17 $\beta$ -estradiol (이상 Sigma, USA)을 각각 첨가하여 미성숙 난포란의 성숙을 유도하였다.

### 2. 정자의 세정 및 체외수정

한우 또는 젖소 동결정액 straw를 37 $^{\circ}$ C 온수에서 30초간 흔들며 용해하였다. 용해한 정액을 1 ml의 수정능 획득용 배양액이 들어있는 6 ml tube (Falcon, USA)의 바닥에 0.2 ml씩 넣고 1시간 동안 배양하므로써 정자의 swin-up을 유도하였다 (Parrish 등, 1986). 수정능 획득용 배양액은 5 mM HEPES, 1 mM Na-pyruvate, 12.5 mM glucose와 0.6% BSA가 함유된 Tyrode 배양액을 사용하였다. Swin-up이 끝난 후, 0.8 ml의 상층액을 15 ml conical tube (Falcon, USA)에 모아 약 1,500 rpm으로 10분간 원심처리하여 정자를 세정하였다. 5개 정도의 난포란을 함유하는 3  $\mu$ l의 세정용 배양액을 10  $\mu$ g/ml heparin (Sigma, USA)이 첨가된 43 $\mu$ l의 수정용 배양액에 난포란과 함께 주입하였다. 이 때 43 $\mu$ l의 수정용 배양액 소적 (drop)은 light mineral oil (Sigma, USA)로 피복하여 2시간 이상 전 배양을 실시한 후 사용하였다. 그리고서 4 $\mu$ l의 정자 용액을 최종농도가 2.

0×10<sup>6</sup> 정자/ml이 되도록 하여 체외수정을 실시하였다.

### 3. 체외수정된 수정란의 배양

체외수정을 실시한 난포란들은 수정 후 40~42시간 후에 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA) 용액에 5분간 처리하고, vortex를 실시하여 난구세포들을 제거하였다. 체외배양은 2세포기 이상 발달한 수정란만을 선별하여 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건과 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 8일간 실시하였다.

#### 1) 난관상피세포의 준비 및 공동 배양

소 난관상피세포는 Xu 등 (1992)의 방법에 따라 준비하였다. 즉, 황체에 있는 소의 난관을 얼음에 얹어 실험실로 운반하고, 이를 생리식염수로 세정한 다음, 난관내벽으로부터 난관상피세포 (BOEC; bovine epithelial cells)를 회수하였다. 3 ml 주사기로 수회 반복 흡입하여 잘게 부순 난관상피세포를 1 ml의 배양용 배지가 든 4-well dish에 옮겨 24시간 배양하였다. 배양 후, 소량의 난관상피세포를 mineral oil로 피복한 100 μl의 배양용 배지에 옮겨 24시간 배양하여, 이를 수정란과의 공동배양에 사용하였으며 48시간 간격으로 신선한 배지를 절반씩 교체하면서 8일간 공동배양을 실시하였다.

#### 2) CR1aa 배양액에서의 체외배양

CR1aa 배양액은 Rosenkrans와 First (1991)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, semi-chemically defined medium인 CR1에 MEM essential amino acid (Gibco, USA), MEM non-essential amino acid (Gibco, USA) 및 fatty acid free BSA를 첨가한 배양액 (CR1aa)을 제작하였으며, 2시간 이상 전배양을 실시한 50 μl의 CR1aa 배양액 소적에 체외수정된 2~4세포기 수정란을 소적당 10개씩 옮겨서 40~42시간 배양을 실시한 후, 다시 fatty acid free BSA 대신에 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액으로 옮겨서 체외배양을 실시하였다.

### 4. 수란우의 준비

수란우로는 생후 15개월 전후 (체중 약 320kg 정

도)의 미경산 Holstein 젖소를 사용하였다. 정상발정 주기를 반복하고 있으며 직장검사를 통해 기능적 황체를 가진 수란대상우들에게 PGF<sub>2α</sub>를 투여하여 발정동기화시켰다. 이들 중 뚜렷한 발정징후를 나타내었으며, 이식일 기준으로 성주기 (발정일=0일)가 7일±24시간 이내이고, 이식직전 직장검사 소견상 황체형성이 양호한 것만을 수란우로 사용하였다.

### 5. 이식용 수정란의 준비

체외수정 후 상실배기나 배반포기까지 발달한 소 수정란은 각각 A, B, C의 3등급으로 분류되었으며 (Linder과 Wright, 1983), 이들 중 양질의 수정란 (A와 B등급)만을 발정후 7일째 수란우의 자궁에 이식하였다. 수정란 이식용 배양액으로는 15% FBS가 함유된 PBS (phosphate buffered saline)를 사용하였으며, 수란우 한 마리당 한 개 또는 두 개의 수정란을 이식하였다.

### 6. 수정란의 이식

상실배기나 배반포기까지 발달한 체외수정란을 15% FBS가 함유된 PBS와 함께 0.25 ml straw (IVM, France)에 넣은 후, 약 30°C 상태로 유지하면서 실험실에서 이식 장소 (안면도 두산목장)까지 운반하였다. 수정란의 운반으로부터 수정란이식까지는 약 6 내지 8시간 정도 소요되었다. 수정란 이식을 위하여 먼저 황체가 확인된 수란우를 보정한 후 2% lidocaine으로 미추부 경막외마취 및 척추측 마취를 실시하였다. 마취가 확인되면 복벽을 10 cm 정도 절개하여 자궁광인대를 잡아당겨 자궁각을 절개부로 끌어내어 봉합침의 이각으로 자궁각 선단부를 천공한 다음 수정란 이식용 피펫에 미리 흡입하여 준비한 수정란을 자궁 선단부내로 주입하였다. 이식이 끝난 다음 절개 부위는 3중으로 봉합하였으며 항생제를 근육주사하였다.

### 7. 임신 여부의 진단

수정란을 이식한 다음 재발정이 오지 않은 수란우를 이식 후 60일경에 직장검사를하여 임신여부를 진단하였다. 임신이 확인된 수란우는 임신 말기에 분만 우사로 옮겨 분만할 때까지 특별관리하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 배양방법에 따른 소 체외수정란의 체외발달

소 체외수정란을 소 난관상피세포와의 공동배양 또는 CR1aa 배양액에서 배양하여 배반포기까지의 체외 발달을 비교하였다(Table 1).

공동배양방법과 CR1aa 배양액간에 체외수정된 소 수정란의 난할율에는 뚜렷한 차이가 없었다. 또한 배반포기까지의 체외발달율에 있어서 CR1aa 배양군이 약간 좋은 성적을 나타내고 있으나, 공동배양과의 비교에 있어서 유의성이 인정되지는 않았다. 이러한 결과는 SOF 배양액과 과일막 세포와의 공동배양방법을 비교하였을 때, 소 체외수정란의 난할율과 배반포기까지의 체외 발달율에 차이가 없었다는 Han 등 (1994)의 보고와 유사하였다. 난관상피세포와의 공동배양방법은 새로운 난관으로부터 매회 난관상피세포를 준비하여야만 하는 번거로움이 있다 (Xu 등, 1992). 따라서 CR1aa 배양액이 제조하기 쉽고, 수정란의 배발달에 있어서 다른 배양체계와 대차가 없으므로 유사한 연구에서 보다 폭넓게 활용될 수 있으리라고 본다.

#### 2. 소 체외수정란의 이식 후 송아지 생산

체외수정 후 상실배기나 배반포기까지 체외 발달한 소 수정란을 외과적으로 이식하여 5마리의 송아지를 얻었다(Table 2).

Table 2에서 보는 바와 같이 상실배기 수정란은 이식 후 임신되지 않았으나, 11개의 배반포기 수정란을 8마리 수란우에 외과적 방법으로 이식하였을 때 4마리가 임신하여 50%의 수태율을 나타냈다. 이렇게 태어난 5마리 송아지의 외형적 표현형은 한우가 1마리, 교잡종 (Holstein 난자 × 한우 정자)이 3마리, Holstein이 1마리이었다. 특히, 체외수정란 유래의 한우 송아지 생산은 국내외적으로 아직 보고된 바 없다 (Fig. 1). 그리고 2개의 배반포기 수정란이 이식된 한마리의 수란우는 쌍태를 임신하였는데, 정상 분만일이 지연되었기 때문에 제왕절개수술로 한마리의 정상적인 송아지와 임신 8개월경에 죽은 것으로 추정되는 한마리의 송아지를 동시에 분만시켰다. 사산(still-born)된 것 이외에 4마리 송아지는 외형적으로 이상이 없었으며, 정상적인 발육상태를 보여주고 있다. 전체적인 수태율은 28.6%(4마리 송아지 / 14마리 수란우)로

**Table 1. *In vitro* development of IVF-derived bovine embryos cultured in different culture systems**

Culture system	No. ova cultured	No. ova cleaved (%) <sup>a</sup>	No. embryos developed to blastocyst (%) <sup>b</sup>
Co-culture with BOEC	265	136(51.3)	37(14.0)
CR1aa	298	180(60.4)	66(22.1)

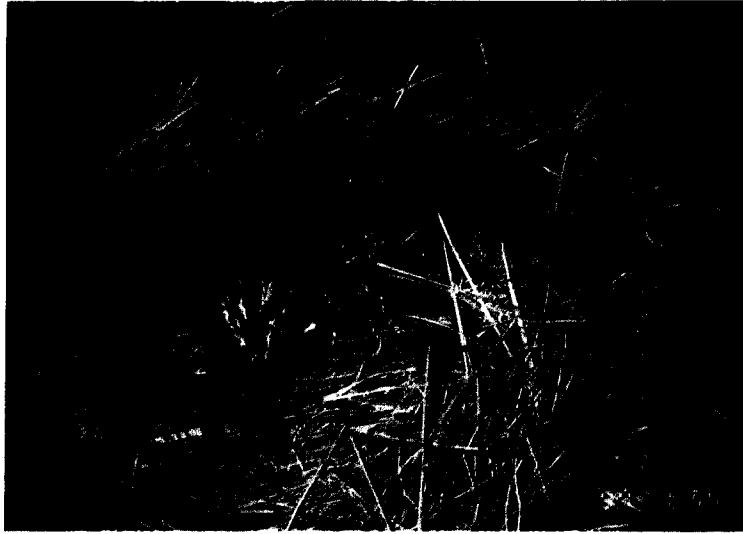
(%)<sup>a</sup>: No. ova cleaved / No. ova cultured × 100

(%)<sup>b</sup>: No. blastocysts / No. ova cultured × 100

**Table 2. Transfer of IVF-derived bovine embryos by a surgical method**

Embryo stage	No. blastocysts transferred	No. pregnant / No. recipients (%) <sup>a</sup>	Calves
Morula	9	0/6	0
Blastocyst	11	4/8(50%)	5 (1두 쌍태)
Total	20	4/14(28.6)	5

(%)<sup>a</sup>: No. pregnant / No. recipients × 100



**Fig. 1. Korean Native calf born from after transfer of an IVF-derived bovine embryo (1994. 1. 30)**

Xu 등 (1992)이 보고한 63% 수태율보다는 현저히 저조하였다. 그러나 그들은 임신의 여부를 수정란 이식 후 43일째에 초음파(echography)에 의해서 진단하였기 때문에 본 실험에서 얻은 분만 후 결과와 직접적으로 비교할 수는 없다. 그리고 이들 5마리 송아지의 성(sex)은 각각 암컷이 2마리, 수컷이 3마리였다. 이와 관련하여 Reichenbach 등(1992)도 체외수정란 이식 후 태어난 산자 중 수컷의 비율이 56%라고 보고하였다. 즉, 체외에서 성숙되고 수정된 수정란도 수컷이나 암컷의 한쪽으로 치우치지 않음을 알 수 있었다.

체외수정된 소 수정란을 이식하여 착상을 유도하기 위해서는 체세포와의 공동 배양이 필요하다는 보고(Goto 등, 1988; Fukuda 등, 1990; Xu 등, 1992)도

있으나 최근에는 체세포와의 공동배양없이 단순배양법(SOF 배양액)에서 발달시킨 수정란으로부터도 송아지를 얻을 수 있었다(Pugh 등, 1993). 본 연구에서도 태어난 5마리의 송아지를 한마리는 송아지 중 한마리는 체세포와의 공동배양이 아닌 CR1aa 배양액에서 발달한 배반포기 수정란(Holstein 남자 × Holstein 여자)으로부터 유래된 것이었다. 따라서 체외수정된 소 수정란으로부터 송아지를 얻기 위해서 반드시 체세포와 공동배양이 필요한 것이 아니라는 사실을 확인하였다고 본다.

### 3. 수정란의 발달단계가 수태율에 미치는 영향

Table 2에서 나타난 결과를 배반포기 발달단계에

**Table 3. Pregnancy rate of IVF-derived bovine blastocysts according to developmental stages**

Developmental stage of blastocysts	No. blastocysts transferred	No. pregnant / No. recipients (%) <sup>a</sup>	Calves
Early	5	0 / 3	0
Mid	3	1 / 2 (50)	1
Expanded	6	3 / 3 (100)	4 (1두 쌍태)

(%)<sup>a</sup> : No. pregnant / No. recipients × 100

다른 수태율로 세분하여 살펴보았다(Table 3).

초기 (early) 배반포기 수정란을 이식하였을 때는 임신되지 않았으나 중기 (mid)나 확장 (expanded) 배반포기 수정란을 이식하였을 경우 각각 50%와 100%의 높은 수태율을 나타내었다. 이러한 결과는 확장 배반포기로 발달한 체외수정란의 상태나 초기나 중기단계보다도 양호하여 체내 발달에 지속적으로 영향을 미치는 것으로 생각된다. Han 등 (1994)의 보고에 의하면, 체외수정된 배반포기 수정란을 동결 융해하였을 경우 부화 (hatching) 배반포기까지의 생존율은 확장, 중기, 초기 배반포기 순으로 높았다. 이러한 결과는 배반포기 발달단계가 늦으면 늦을수록 양질 (A와 B등급)의 수정란이 많기 때문인 것으로 나타났다. 결론적으로 체외수정된 수정란의 이식에 있어서 상실배기나 초기배반포기 수정란보다는 중기나 확장배반포기 단계에서 이식하는 것이 바람직하다고 생각된다.

#### IV. 적 요

소 체외수정란의 체내 생존율을 입증하기 위하여, 체외에서 성숙되고 수정된 난자로부터 발달한 상실배기 또는 배반포기 소 수정란을 수란우의 자궁에 이식하여 정상적인 송아지를 생산하였다. 체외수정된 상실배기나 배반포기 수정란을 얻기 위하여 체외수정된 난자들을 39°C, 습도가 포화된 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 8일간 배양하였다. 본 연구에서는 소 난관상피세포와의 공동배양방법과 체세포와의 공동배양이 없는 CRlaa 배양액간의 체외수정란의 체외발달율은 비교하였다. 체외 수정란의 분할율 및 배반포기까지의 체외발달율은 공동배양방법 (51.3와 14.0%)과 CRlaa 배양액 (60.4와 22.1%)간에 차이가 없었다.

체외 수정란으로부터 발달한 상실배기나 배반포기 소 수정란은 수정란의 상태(질)에 의해서 3등급으로 분류되었고, 양질 (A와 B등급)의 수정란을 수란우 당한 개 또는 두 개씩 자궁에 이식하였다. 상실배기 수정란을 이식하였을 때에는 임신이 되지 않았으나, 배반포기 수정란을 이식하여 5마리의 송아지를 생산하였다. 특히, 체외수정란 유래의 한우 송아지생산은 아직 국내외적으로 보고된 바 없다. 결론적으로 본 연구에서는 난관상피세포와의 공동배양이 아닌 CRlaa 배양액에서 배양된 체외수정란으로부터도 송아지를 생산

할 수 있었으며, 체외수정란 이식에 있어서 상실배기 보다는 배반포기 단계에서 이식하는 것이 바람직하다고 생각된다.

#### V. 인용문헌

1. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
2. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 42:114-119.
3. Fukui, Y., L.T. McGowan, R.W. James, P. A. Pugh and H.R. Tervit. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 92:125-131.
4. Fukui, Y. and H. Ono. 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.
5. Gagne, M., F. Pothier and M.A. Sirard. 1990. Developmental potential of early bovine zygotes submitted to centrifugation and microinjection following *in vitro* maturation of oocytes. Theriogenology, 33:278 abstr.
6. Goto, K., N. Iwai, Y. Takuma and Y. Nakanishi. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. J. Anim. Sci., 70:1149-1153.
7. Goto, K., Y. Kajihara, M. Koga, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 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.
8. Han, Y.M., H. Yamashina, Nokoyama, K.K., Lee and Y. Fudui. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. Theriogenology, in press.
  9. Kajihara, Y., N. Kometani, S. Kobayashi, Y. Shitanaka, Y. Koshiba, K. Hishiyama, K. Shiraiwa and K. Goto. 1990. Pregnancy rates and birth after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. Theriogenology, 33:264 abstr.
  10. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser, J.J. Parrish and N.L. First. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology, 31:61-74.
  11. Linder, G.M. and R.W. Wright Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology, 20:407-416.
  12. Lu, K.H., H.S. Jiang, W.L. Wang and I. Cordon. 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 *in vitro*. Theriogenology, 33:278 abstr.
  13. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and M.L. Leibfried-Rutledge. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 25:591-600.
  14. Pugh, P.A., J.G. Thompson, L.T. McGowan, W.H. McMillan and H.R. Tervit. 1993. Survival after transfer of fresh or frozen bovine embryos produced *in vitro* in a cell- and serum-free medium. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. 25:No. 86 abstr.
  15. Reichenbach, H.D., J. Liebrich, U. Berg and G. Brem. 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. J. Reprod. Fert., 95:363-370.
  16. Rexroad, C.E. Jr. 1989. Co-culture animal embryos. Theriogenology, 31:105-114.
  17. Rosenkrans, C.F.Jr., G.Z. Zeng, P.K. Schoff and N.L. First. 1990. A simple medium for *in vitro* development of bovine embryos. J. Anim. Sci. 68 (Suppl):430 abstr.
  18. Rosenkans, C.F.Jr. and N.L. First. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acid and vitamins. Theriogenology, 35:266 abstr.
  19. Suzuki, T., M. Takagi, M. Yamamoto, A. Boediono, S. Saha, H. Sakakibara and M. Oe. 1993. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. Theriogenology, 40:651-659.
  20. Xu, K.P., B.R. Yadav, R.W. Rorie, L. Planete, K.F. Betteridge and W.A. King. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. J. Reprod. Fert., 94:33-43.
  21. 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 8(2):143-149.