

## 토끼 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과

노규진 · 이효종 · 송상현\* · 윤희준\*\* · 박충생\*

경상대학교 수의학과

### Effect of Culture Media and Co-culture with Bovine and Rabbit Oviductal Epithelial Cells on *In Vitro* Development of Rabbit Embryos

Rho, G. J., H. J. Lee, S. H. Song\*, H. J. Yun\*\* and C. S. Park\*

Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

#### SUMMARY

This experiment was carried out to develop an *in vitro* culture system for rabbit embryos. The zygotes or 2-cell embryos were collected from the oviducts of the superovulated and mated does with D-PBS /10% FCS at 24 hours after hCG injection. The *in vitro* developmental rate of blastocyst formation and the number of nuclei in the embryos were examined under the following treatments; 1) TCM-199 with 10% FCS, 2) EBSS with 10% FCS, 3) rabbit vitreous humor (VH), 4) TCM-199 with 10% FCS + BOEC, 5) TCM-199 with 10% FCS + ROEC, 6) EBSS with 10% FCS + BOEC and 7) EBSS with 10% FCS + ROEC.

For a comparative study of *in vivo* and *in vitro* development, the fresh blastocysts, which were developed *in vivo* for 96 hours after hCG injection, were collected from the uterus and their numbers of nuclei were counted.

1. The zygotes or 2-cell embryos developed to the blastocyst stage in TCM-199, EBSS and VH at the rates of 93, 92 and 89%, respectively.
2. The higher developmental rates 95~98% of blastocyst formation was achieved when the embryos were co-cultured with a monolayer of bovine or rabbit oviductal epithelial cells in TCM-199 or EBSS. No significant difference in developmental rates was shown between bovine and rabbit oviductal epithelial cells.
3. In a comparative study of *in vivo* and *in vitro* development, the total numbers of nuclei were significantly less in the *in vitro* cultured embryos(104~224) than the *in vivo* developed embryos(1,009) at 96 hours after hCG injection.
4. The mean cell cycle numbers in the embryos cultured for 72 hours in TCM-199 with 10% FCS, EBSS with 10% FCS, TCM-199 with 10% FCS + BOEC, TCM-199 with 10% FCS + ROEC, EBSS with 10% FCS + BOEC and *in vivo* was 7.38, 6.63, 7.76, 7.69, 7.01 and 9.92, respectively.

\* 경상대학교 농과대학 축산학과(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

\*\* 경상대학교 축산진흥연구소(Institute for Development of Livestock Production)

\*\*\* 이 연구는 1992년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초 연구사업비로 연구되었음(KOSEF :92-24-00-10).

From these results, it can be suggested the optimal culture system for *in vitro* culture of rabbit embryos is a co-culture system with bovine or rabbit oviductal epithelial cells in TCM-199 with 10% FCS. Considering the significant reduction in total numbers of nuclei in the *in vitro* cultured embryos, the advanced research on development of *in vitro* culture system for rabbit embryos is expected.

Key words : oviductal epithelial cell, co-culture, embryo, rabbit

## I. 서 론

Auerbarch와 Brinster(1968)는 대부분의 포유동물 초기배를 체외배양시킬 경우 특정 세포 발달단계에서 발달 중지 현상(block)이 있다고 보고하였다. 이런 현상은 배의 발달이 모성유전자조절기작에서 태아유전자조절기작으로 전이됨이 그 원인이라고 하였으며(Telford 등, 1990), 많은 연구자들이 block현상을 극복하고 배의 발생능을 향상시키기 위해서 초기배를 난관에 이식하여 배양하는 방법(Whittingham과 Bigger, 1967; Bigger 등, 1962), 여러 종류의 체세포와 공배양하는 방법(Ellington 등, 1990; White 등, 1989; Eyestone과 First, 1989; Rexroad와 Powell, 1988; Gandolfi와 Moor, 1987) 그리고 배양액에 EDTA를 첨가하거나(Abramczuk 등, 1977), 삼투압을 조절하는(Lawitts와 Biggers, 1991) 등 최적의 배양액 조성과 배양액에 자궁세척액을 첨가하는 방법(Fischer 등, 1990) 등을 이용하여 발생능을 향상시켜 왔으나, 난관상피세포나 과립막세포의 공배양방법이 체취와 배양이 용이하며 block현상의 극복 뿐만 아니라 발생능의 향상 효과도 높아 많이 이용되고 있는 실정이다(Ellington 등, 1990; Eyestone과 First, 1989; Gandolfi 등, 1989; Fischer, 1987).

이러한 난관상피세포의 체외배양에 있어서 배발달에 도움을 주는 작용기전은 정확히 알려져 있지 않지만, 여러가지 가설이 있다. 특히 난관상피세포에서 분비되는 단백질은 혈청알부민, 면역글로부린을 다량 함유하고 있으며, 이러한 단백질이 배란된 난자의 투명대에 결합하여 위관강내로 전이되어 배의 정상적인 발달과 trophic factor로 작용하는 것으로 알려져 있다(Kapur과 Johnson, 1986; Brown과 Cheng, 1986; Kane, 1985).

토끼 초기배의 체외성숙에 있어서는 공배양을 하지

않아도 block현상이 없이 1-세포기에서 배반포기배까지 발달은 할 수 있지만 체내보다는 발생능이 저조하다. 발생능 향상을 위해서 다양한 배양액을 이용하여 체외배양한 결과 발달율에는 체내와 유사한 성적을 보였지만 핵의 수에 있어서는 많은 차이가 있다. Carney 등(1990)은 토끼의 초기배를 난관상피세포와 공배양시 좋은 성적을 보고하였다. 이는 토끼 초기배는 난관-배의 상호작용이 있다는 증거이며, 난관상피세포에서 분비되는 sulphated glycoprotein이 토끼에만 특이적으로 존재하는 mucin coat를 형성한다. 그러나 이러한 mucin coat는 포배형성에 영향을 미치는지 혹은 착상에 효과적인 기능이 있는지는 확실하지 않지만(Greenwald, 1962), 토끼 난관에서 분비되는 non-serum macromolecular component는 배가 난관에 머무르는 시기와 배의 착상 8~9 일 사이에 나타나며 이런 component는 성장을 촉진하는 인자라고 한다(Kille와 Hamner, 1973).

다른 종(species)의 난관 상피세포와의 공배양 효과를 규명하기 위한 많은 연구에서도(Bavister, 1988; Minami 등, 1988; Eyestone 등, 1985) 발달율과 blastocyst expansion에 좋은 효과를 나타낸다고 보고하고 있다.

상기한 바와 같이 배의 체외배양에 관한 많은 연구자들의 보고가 있지만 토끼 배의 체외배양에 대한 종합적인 검토가 요구되고 있는 실정이다. 특히, 동종 또는 이종 동물의 난관상피세포와의 공배양 효과 조사와 배반포 형성 후 할구수 조사는 명확한 배양체계의 개선에 유익할 것으로 보이며, 나아가서 배이식시 수란 축과 배의 진정한 동기화를 이루는데 매우 유익한 정보가 될 것으로 사료되어 본 실험에 착수하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서, 암컷은 생후 4~8 개월령의 체중 2.5~3.0 kg인 것을, 수컷은 생후 6~8 개월령의 체중 3.0~4.0 kg인 것을 공시하였고, 토끼용 펠렛사료와 물을 자유로이 급식하였다.

## 2. 과배란유기 및 수정란의 채란

과배란유기는 성숙한 암토끼에 PMSG(Sigma Chem. Co.) 100 IU를 근육주사한 후 72 시간에 자연 교배를 2 회 이상 반복 실시함과 동시에 hCG(Sigma Chem. Co.) 100 IU를 근육주사하여 배란을 유기하였다. hCG 투여 24 시간 후 암토끼에 chlorpromazine HCl(삼성제약) 1 ml/kg을 근육주사하여 전마취를 실시하고, ketamine HCl(유한양행) 0.5 ml/kg을 이정맥주사하여 전신마취 시킨 다음 개복 수술을 실시하였다. 난관누두부에 외경 1 mm의 polyvinyl catheter를 삽입하고 자궁난관접합부에서 주사기를 삽입하여 FCS가 10% 함유된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)를 역관류시켜 1-세포기에서 2-세포기배를 회수하여 도립현미경 하에서 형태적으로 정상인 것만 선별하여 본 실험에 사용하였으며, *in vivo*의 배반포기배는 교미 후 96 시간에 자궁에서 D-PBS를 관류시킴으로서 회수하였다.

## 3. 수정란의 체외배양

토끼 배의 관류·세척에는 기본배양액인 D-PBS를 사용하였고, 배양액은 56°C 수온에서 30 분간 비동화 처리된 FCS가 10% 첨가된 TCM-199, Earle's balanced salt solution(EBSS)를 pH 7.2~7.4로, 삼투압은 290 mOsm/kg으로 조정하였고, Vitreous humor(VH)의 준비는 안락사 시킨 암토끼의 눈에 2l

G needle을 천자하여 채취하였고 한 눈당 약 1.0 ml 정도 취할 수 있으며 이들 각각의 배양액은 0.2  $\mu$ m의 Millipore filter(Gelman Science Co.)로 여과하여 사용하였다. 토끼 난관상피세포와 소 난관상피세포의 준비는 안락사 시킨 토끼 난관과 도축장에서 수집한 소 난관을 항생제가 함유된 생리식염수로 세척하여 멸균포로 난관 표면을 깨끗이 닦고 결합조직을 철저히 제거한 다음 생리식염수로 세척하여 오염 가능성이 있는 양 끝 부분을 절단한 후에 난관협부에서 누두부쪽으로 10 ml 주사기에 1 ml의 D-PBS를 관류시켜 채취하고 500  $\times$ g에서 5 분간 원심분리시켜 상층액은 제거하고 pellet부분을 2~3  $\times$  10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 조정하여 위의 배양액에서 48 시간 배양시켜 monolayer cells의 형성을 유도하였다. 각각의 배양액에서 초기배를 회수후 72 시간 배양하여 발달율을 조사하였다.

## 4. 핵의 수 조사

각 처리구의 체외배양란은 체외배양 72 시간에, 대조구의 체내배양란은 hCG 투여 후 96 시간만에 채란하여 Hoechst 33342(Sigma Chem. Co.)를 이용하여 Pursel 등 (1985)의 방법에 준하여 핵수를 조사하였다.

## 5. 통계학적 분석

통계학적 분석은 체외배양에 의한 배발달율은  $\chi^2$ -test를 실시하였고, 핵의 수는 T-test를 실시하였다.

# III. 결과 및 고찰

## 1. 배양액간의 체외발달율

**Table 1. Development in vitro of zygote or two-cell stage rabbit embryos cultured in different media for 72 hours**

Media	No. of zygotes or 2-cells cultured	No. (%) of embryos developed to		
		Morula	Blastocyst	Degenerated
TCM-199/FCS	46	2	43(93.5) <sup>a</sup>	1
EBSS/FCS	39	1	36(92.3) <sup>a</sup>	2
Vitreous humor	36	2	32(88.9) <sup>a</sup>	2

<sup>a</sup>There was no significant difference in blastocyst formation between the media.

hCG 투여 후 24 시간에 회수한 토끼 1-, 2-세포기배를 72 시간 배양시켜 그 발달을 조사한 결과는 Table 1에 나타나는 바와 같이 TCM-199에서 93.5%, EBSS에서 92.3% 및 VH에서 88.9%의 배반포 형성율을 보였다.

TCM-199, EBSS와 체액인 VH의 각기 다른 배양액간의 배발달율에서는 순서대로 높은 발달율을 나타내었으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. TCM-199는 여러가지 무기염 이외에, 아미노산, 비타민 및 여러가지 영양소가 함유되어 있고 소, 돼지 등 여러 종류의 동물에서 난자 및 배의 배양에 많이 이용되고 있는 배양액이다. EBSS는 TCM-199에 비하여 아미노산, 비타민이 함유되어 있지 않고 영양소로는 포도당만 함유되어 있는 balanced salt solution이며, VH는 토끼 안구의 유리체방에서 채취한 생체액이다. 이들 3종의 크게 다른 배양액에서 토끼 초기배를 체외배양할 경우 배반포 형성율에 있어서는 커다란 차이가 없이 모두 90% 전후의 높은 발달율을 보였다.

대부분의 포유동물 초기배를 체외배양시킬 경우 배발달조절이 모성유전자조절 기작에서 태아유전자조절 기작으로 전이가 원인이 되어(Telford 등, 1990) 특정 발달단계에서 발달 중지 현상(block)이 있으나 토끼 초기배의 체외배양에 있어서는 block 현상이 인정되지 않았으며, 이는 난관상피세포에서 분비되는 sulphated glycoprotein이 토끼에만 특이적으로 존재하는 mucin coat를 형성하게 하며 이러한 mucin coat는 배발달과 포배형성에 유효적인 tropic factor로써 작용한다고한 결과(Kille와 Hamner, 1973;

Greenwald, 1962)와 일치하는 소견을 보였다.

## 2. 소 또는 토끼 난관상피세포와의 공배양 효과

초기배를 난관상피세포와 공배양하면 block 현상을 차단하고 배발달능을 향상시키며 이는 ovarian cell이 분비하는 대사, 성장자극 및 배양액의 탈독소 역할을 하는데 도움을 주는 특정 단백질 때문일 것이라고 한다(Caird E와 Rexroad Jr, 1989). 동종 또는 이종의 난관상피세포가 토끼 초기배의 발달에 어떠한 영향을 주는지 조사하기 위해서 TCM-199와 EBSS의 배양액에 토끼의 난관상피세포를 공배양하여 발달을 조사한 바, Table 2와 같이 FCS가 10% 첨가된 TCM-199와 EBSS의 발달율은 유의적 차이없이 높은 발달율을 보이고 있다. 또한 이종의 소 난관상피세포와의 공배양에서도 배 발달율에는 상이한 차이를 나타내지 않았으며, 이는 1991년 Fontes가 소의 초기배를 소와 토끼의 난관상피세포와 공배양했을 때 발달율이 서로 비슷하다고 한 결과와 일치한다. 그러므로 토끼 초기배는 이종인 소의 난관상피세포와 공배양할 경우 species specificity가 없는 것으로 사료된다.

토끼 초기배를 TCM-199 배양액 단독보다는 소 또는 토끼 난관상피세포와 공배양할 경우 더욱 높은 배반포 형성율을 보였고, EBSS 배양액 또한 그러하였다. 토끼 초기배의 배 발달을 향상시킬 목적으로 토끼의 난관상피세포를 구하기 위해서 토끼를 안락사시킬 필요없이 인근의 도축장에서 손쉽게 구할 수 있는 소의 난관상피세포와 공배양하는 것이 배 발생능향상에 효과적일 것이라고 사료된다.

**Table 2. Effect of co-culture with rabbit or bovine oviductal epithelial cells in different media for 72 hours on *in vitro* development of rabbit embryos**

Co-culture cells	Media	No. of zygotes or 2-cells cultured	No. (%) of embryos developed to		
			Morula	Blastocyst	Degenerated
BOEC*	TCM-199	40	1	39(97.5%)	0
	EBSS	32	1	31(96.9%)	0
ROEC**	TCM-199	24	0	23(95.8%)	1
	EBSS	20	0	19(95.0%)	1

\* There was no significant ( $P < 0.05$ ) difference in blastocyst formation between the groups.

\* BOEC : bovine oviductal epithelial cells

\*\*ROEC : rabbit oviductal epithelial cells

**Table 3. Effect of different media and co-culture systems on the number of nuclei in rabbit embryos cultured *in vitro* for 72 hours or collected 96 hours after hCG injection**

<i>In vitro</i> culture system		No. of embryos used	No. of nuclei / Blastocyst	Mean cell cycle number
Basal media	Co-culture			
EBSS / FCS	None	29	104.5 ± 29.1 <sup>a</sup>	6.63
	BOEC*	19	129.3 ± 27.4 <sup>b</sup>	7.01
	ROEC**	15	162.2 ± 28.6 <sup>c</sup>	7.27
TCM-199 / FCS	None	28	176.8 ± 33.7 <sup>c</sup>	7.38
	BOEC*	20	224.9 ± 28.4 <sup>d</sup>	7.76
	ROEC**	19	216.0 ± 33.6 <sup>d</sup>	7.69
Vitreous humor	None	21	132.3 ± 30.4 <sup>b</sup>	7.03
<i>In vivo</i> developed***		25	1,009.6 ± 78.7 <sup>e</sup>	9.92

The numbers of nuclei per blastocyst are means ± S.E.M.

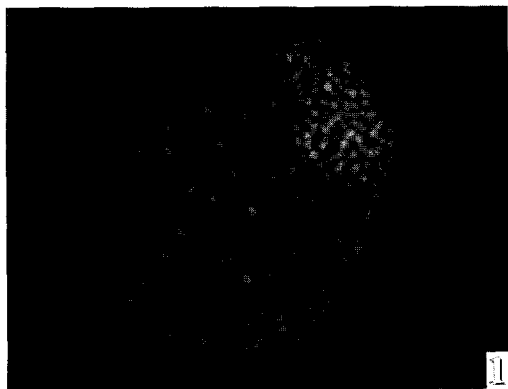
The values with different superscripts denote significant ( $P < 0.05$ ) difference.

\* BOEC : bovine oviductal epithelial cells

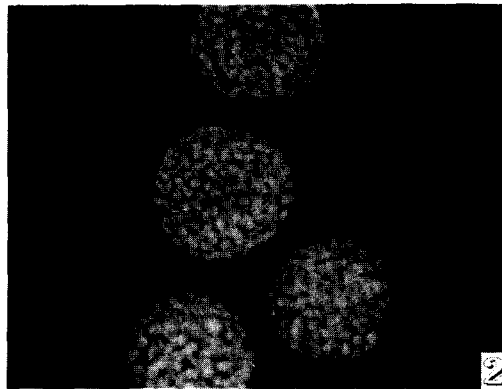
\*\* ROEC : rabbit oviductal epithelial cell

\*\*\* *In vivo* developed blastocysts were collected 96 hours after hCG injection.

All of the *in vitro* cultured embryos were collected 24 hours after hCG injection and cultured for 72 hours (96 hours after hCG injection).



**Fig. 1. An expanded blastocyst stage embryo co-cultured with bovine oviductal epithelial cells in TCM-199 with 10% FCS for 72 hours and stained with Hoechst 33342 solution. (× 200)**

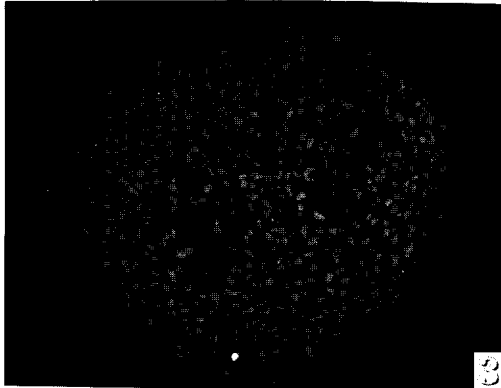


**Fig. 2. Early blastocyst stage embryos cultured in TCM-199 with 10% FCS for 72 hours and stained with Hoechst 33342 solution. (× 200)**

### 3. 핵의 수 조사

이상의 실험에서 서로 다른 배양액이나, 동종 혹은 이종의 난관상피세포와의 공배양에 의한 배발달율은 서로 유사하게 나타난 반면, 배양액간의 핵의 수 조

사에서는 현격한 차이를 보인다. hCG 투여 후 24 시간 간에 채란한 토끼 초기배를 각기 다른 배양액에 72 시간 체외배양하여 Hoechst 33342 염색처리에 의한 핵의 수 조사에서 TCM-199 배양액이 다른 배양액에서 보다 다소 증가된 경향을 보였다. 이는 1987년 Gon-



**Fig. 3. An expanded blastocyst stage embryo developed *in vitro* and collected at 96 hours after hCG injection and stained with Hoechst 33342 solution. ( $\times 200$ )**

dolfi와 Moor가 TCM-199는 소나 양의 수정란을 체외배양함에 있어 적합한 배양액이라고 한 것과 같이 토끼에서도 좋은 배양액이라고 사료되며, 각기 다른 배양액에 토끼 혹은 소의 난관상피세포와의 공배양에 의한 핵의 수 관찰에서 TCM-199 배양액에 토끼 혹은 소의 난관상피세포와의 공배양이 다른 처리군보다 유의적으로 높은 수로 조사되었다(Table 3). 따라서 토끼 수정란의 배발달율에도 난관상피세포와의 공배양 효과가 중요한 요인으로 작용한다고 사료된다.

체외배양된 배반포기배는 핵 수의 현격한 감소가 특징이며(Walker 등, 1992), 이러한 현상은 양의 수정란을 체외배양했을 경우 약 35%(Walker 등, 1992), 소에 있어서는 약 58% 정도의 감소가 있었다고 한다(Duby 등, 1992). 토끼 배의 체외배양과 체내배양에 있어서 핵 수의 차이를 조사한 결과, 공배양조건하에서 TCM-199의 핵 수는 224.9 개인 반면, hCG 투여 후 96 시간에 채란한 배반포기배에서는 1,009.6 개로 월등히 많은 핵 수를 보였으며, 96 시간 배양에서 체외 배양군에서는 약 7 회 정도의 cell cycle을 가지지만, 체내배양에서는 9.92 회로 체외배양군보다 현저히 증가된 경향을 보였다. 또한 1-, 2-세포기배 채란된 배는 mucin coat층이 아주 얇게 보였고, 체내에서 자란 배의 mucin coat층은 150  $\mu\text{m}$  이상의 두께로 관찰되었다. 따라서 체외배양란은 mucin coat층이 얇은 관계

로 적은 수의 할구를 가지고 부화가 진행되며, 체내배양란은 두꺼운 mucin coat층의 물리적 압력으로 세포 분열이 더욱 진행된 후 많은 수의 할구를 지니고 부화가 되는 것으로 사료된다(Fig 1. 2. 3.).

#### IV. 적 요

본 연구는 토끼의 초기배를 체외배양함에 있어서 최적의 배양조건을 알아보고자 실시하였다. New-Zealand White 종의 성숙된 토끼에 PMSG 100 IU를 근육주사한 다음 72 시간 후 hCG 100 IU를 이정맥주사함과 동시에 2 회 이상 교미를 실시한 후 24 시간에 전신마취시켜 개복수술을 실시하여 난관에서 1-, 2-세포기배를 D-PBS를 관류함으로써 회수하였다. 이들 회수된 배는 TCM-199, EBSS 및 체액인 Vitreous humor 액에서 72 시간 체외배양하여 배발달능력에 대한 이들 배양액간의 차이를 조사하였다. 아울러 이들 초기배를 소 또는 토끼 난관상피세포와 공배양을 실시하여 공배양의 효과와 이종 난관상피세포와의 공배양 효과를 배반포발달율과 핵의 수를 조사함으로써 확인하였다.

1. 토끼 초기배는 TCM-199, EBSS 및 VH에서 각각 93, 92 및 89%의 높은 배반포 발달율을 보였다.
2. 토끼 초기배는 TCM-199 또는 EBSS 배양액에서 소 난관상피세포 또는 토끼 난관상피세포와 공배양할 경우 95~97%의 더욱 높은 배반포 발달율을 보였으며 이종의 난관상피세포와 공배양하여도 배반포 발달율에는 차이를 보이지 않았다.
3. 그러나 핵의 수에 있어서는 체내에서 96 시간 자란 배반포(평균 핵수: 1,009.6 개)에 비하여 체외에서 배양한 배반포에서 유의적으로 적었다. 배양액의 종류 간에는 EBSS(104.5 개)가 가장 적은 핵수를 보였고 TCM-199(176.8 개)에서 가장 많은 핵수를 보였다. 공배양에서는 배양액 단독보다 더욱 많은 핵수를 보였다. 동종 또는 이종 난관상피세포간에는 차이를 나타내지 않았다.

이상의 결과로 보아, 토끼 초기배를 체외배양할 경우에는 TCM-199 배양액에서 소 또는 토끼 난관상피세포와 공배양하는 것이 바람직하다. 그러나 이러한

체외배양법으로는 배반포기배의 핵수에 있어서 체내에서 자란 배반포기배에 비하여 1/5 수준 밖에 이르지 못하므로 앞으로 체외배양 기법의 개선 또는 개발이 더욱 필요하다고 본다.

## V. 인용문헌

1. Abramczuk, J., D. Solter and H. Koprowski. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Development Biol.* 61:378-383.
2. Auerbach, S. and R. L. Brinster. 1968. Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos. *Nature* 217:465-466.
3. Bavister, B. D. 1988. Role of the oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 29:113-154.
4. Biggers, J. D., R. B. L. Gwatkin and R. L. Brinster. 1962. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes in a chemically defined medium. *Nature* 194:747-749.
5. Brown, C. R. and W. K. T. Cheng. 1986. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 92:183-191.
6. Caird, E. and C. E. Rexroad Jr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 31:105-114.
7. Carney, E. W., C. Tobback, J. E. Ellington and R. H. Foote. 1990. Co-culture of rabbit 2-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells. *Mol. Reprod. Dev.* 27:209-215.
8. Carney, E. W. and R. H. Foote. 1990. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *J. Reprod. Fertil.* 91:113-123.
9. Duby, R. T., P. Collas and J. M. Robl. 1992. Development of rabbit embryos to the hatched blastocyst stage in rabbit peritoneal fluid *in vitro*. *Theriogenology* 39:210 (Abstr.).
10. Ellington, J. E., P. B. Farrell, M. E. Simkin and R. H. Foote. 1990. Bovine 1-2 cell embryos development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod.* 43:97-104.
11. 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. Fertil.* 85:715-720.
12. Eyestone, W. H., D. L. Northey and M. L. Leibfried-Rutledge. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.* 32(Suppl. 1),100a(Abstr.).
13. Fischer, B. 1987. Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fertil.* 79:115-123.
14. Fischer, B., T. Jung, C. Hegele-Hartung and H. M. Beier. 1990. Development of preimplantation rabbit embryos in uterine flushing-supplemented culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 27 : 216-223.
15. Fontes, R. S., F. J. Ectors, A. Delval, K. Touati, J. F. Beckers and F. Ectors. 1991. Rabbit and bovine oviductal epithelial cell culture media are able to support early development from zygote to the blastocyst stage. *Theriogenology* 35(1):201(Abstr.).
16. Gandolfi, F., T. A. L. Brevini and R. M. Moor. 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl. 38):107-115.
17. Gandolfi, F. and R. M. Moor. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial

- cells. J. Reprod. Fertil. 81:23-28.
18. Greenwald, G. S. 1962. The role of the mucin layer in development of the rabbit blastocyst. Anat. Rec. 142:407-415
  19. Kane, M. T. 1985. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocysts cell division and expansion *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 73:147-150.
  20. Kapur, R. P. and L. V. Johnson. 1986. Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. J. Exp. Zool. 238:249-260.
  21. Kille, J. W. and C. E. Hammer. 1973. The influence of oviductal fluid on the development of one-cell rabbit embryos *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 35:415-423.
  22. Lawitts, J. A. and J. D. Biggers. 1991. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. Biol. Reprod. 45:245-251.
  23. Minami, M., B. D. Bavister and A. Iritani. 1988. Development of hamster two-cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system. Gamete Res. 19:235-240.
  24. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad Jr., R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology 24:687-691.
  25. Rexroad, C. E. and A. M. Powell. 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in Medium 199. J. Anim. Sci. 66:947-953.
  26. Telford, N. A., A. J. Watson, A. J. and G. A. Schultz. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. Mol. Reprod. Dev. 26:90-100.
  27. Walker, S. K., T. M. Heard and R. F. Seemark. 1992. *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. Theriogenology 37:111-126.
  28. Whittingham, D. G. and J. D. Bigger. 1967. Fallopian tubes and early cleavage in the mouse. Nature. Lond. 213:942-943.
  29. White, K. L., K. Hehnke, L. F. Rickords, L. L. Southern, D. L. Thompson Jr. and T. C. Wood. 1989. Early embryonic development *in vitro* by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs. Biol. Reprod. 41:425-430.