

체외수정 및 미세조작에 의한 가축(胚)의 생산과
효율적 이용에 관한 연구
Ⅲ. 소에 있어서 난포란의 체외수정과 수정란 이식

정영채 · 김창근 · 윤종택* · 이종완** · 최선호
중앙대학교 산업대학

Studies on Production and Efficient Utilization of Livestock Embryos by *In Vitro* Fertilization and Micromanipulation.
Ⅲ. Transfer of Embryo Derived from *In Vitro* Fertilization of Bovine Follicular Oocytes Matured *In Vitro*

Y.C. Chung, C.K. Kim, J.T. Yoon*, J.W. Lee** and S.H. Choi
College of Industrial Studies, Chung-Ang University

SUMMARY

Immatured bovine follicular oocytes added with serum, hormones, granulosa cells and bovine oviduct epithelium cells were fertilized *in vitro* after *in vitro* maturation. *In vitro* maturation and early development capacity were examined and IVF-derived embryos were transferred and to recipients and effects of sperm treatment on *in vitro* capacitation were investigated. The rate of *in vitro* maturation was improved when they were co-cultured with granulosa cells in the TCM199 medium added with 10% FCS and hormones. The percentage of acrosome reaction was not differed between sperm treatments and sperm of above 25% under-went AR during 30 min preincubation with caffeine and heparin. The cleavage rate of oocytes *in vitro* fertilized in TCM199 medium added with 10% FCS and hormones, GC or BOEC higher than that in medium with 10% FCS and GC. But the rate was not significantly different between GC and BOEC. The cleavage of rate oocytes cultured in medium containing serum, hormones and BOEC was 80.2% and more embryos were developed to Blastocyst(17.3%). The selected embryos were transferred to 9 recipients by surgical or nonsurgical method but did not result in pregnancy.

서 론

가축의 우수한 형질의 확보와 개량은 종모축을 중심으로 한 인공수정 방법이 크게 기여하였으나

최근에는 발생공학적 기법을 이용한 체외수정 및 수정란 이식기술로 유전 형질이 우수한 종빈축을 동시에 이용함으로써 가축의 생산성 향상과 능력 개량의 효과를 배가시키게 되었다. 이와 같은 체외 수정기술을 통한 체외수정란의 대량 생산은 초기배

이 논문은 1992년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.
* 안성산업대학교(Anseung National University)
** 공주대학교(Kong Ju National University)

의 발생생리, 성감별, 핵이식, 클론 생산 및 왜래 유전자도입 등의 생명공학기술이 급속하게 발달되었다(Leibfried-Rutledge 등, 1989; Keefer 등, 1984).

이러한 체외수정기술은 도살장에서 도살되는 암소의 난소로부터 채란된 난자를 이용하여 수정란 이식분야에서 가장 큰 문제점으로 대두되고 있는 다량의 수정란 확보와 경비절감 뿐만 아니라 생명공학 분야에서 유전자 조작 기술 등의 다양한 기술개발을 촉진하고 있지만 아직도 소 난포란의 체외성숙 및 체외수정을 위한 최적조건의 배양체계가 불분명한 상태이며 해결해야 할 많은 문제점들이 있다.

소의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정 그리고 이식으로 산자를 얻기 위한 성숙배양 과정, 혈청, 호르몬, 정자처리 또는 초기배의 배양 방법 등 여러 가지 방법이 제시되어 많은 개선이 이루어졌으며, 난구세포(Goto 등, 1988; Fukuda 등, 1990), 파립막세포(Crister 등, 1986; Goto 등, 1992), 소 난관상피세포(Lu 등, 1988; Eystone과 First, 1989; Fukui와 Ono, 1989) 등의 체세포와의 공배양하여 체외성숙시킨 후 체외수정한 배반포기 배를 이식하여 산자를 생산하여(Goto 등, 1988, 1989; Lu 등, 1988; Fukuda 등, 1990; Kajihara 등, 1990, 1991; 황 등, 1993; 박 등, 1994; 한 등, 1994), 매우 바람직한 결과를 얻고 있으나 그 방법의 재현성과 결과에 큰 차이를 나타내고 있다.

따라서 본 실험은 난포란의 이용을 실용화 하기 위하여 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외 발생과정을 확립하고 체외성숙, 체외 수정 및 체외배양으로 생산된 소의 체외수정란을 발달 단계에 따라 외과적 및 비외과적 방법으로 이식하여 송아지를 생산하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시 난자와 정액

공시 난자는 축협가락동 도축장에서 도살되는 암소중 정상적인 생식기를 가진 개체의 난소에서 채란하였으며 공시정액은 축협한우개량사업소에서 제조된 한우 동결정액을 사용하였다.

2. 난포란의 채란

난포란의 채란은 도살 직후 분리 채취된 난소를 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 후 항생제와 생리식염수가 들어있는 보온병(35℃)에 담아 38℃ 항온실로 운반하여 생리식염수로 3회 세척하고 10 ml 주사기와 18게이지 주사침을 직경 2~6 mm의 정상 난포로부터 난소 실질을 천자하여 난포액과 동시에 연속흡입 채취하여 채란하였다. 난포란은 난구세포층이 치밀하고 세포질이 양호한 난포란만을 선별 이용하였다.

3. 난포란의 체외성숙배양과 성숙판정

난포란의 체외성숙배양은 TCM199(380-2340, Gibco)를 사용하여 fetal calf serum(FCS:240-1555, Gibco) 10%를 첨가하였고 gentamycin(국제약품) 50 mg/ml을 첨가하여 CO₂ 배양기에서 4~5 시간 평형후 4-well dish(Nunclon)에 0.5 ml씩 분주하여 각 well당 10~15개의 난포란은 39℃, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도인 배양기에서 22~24시간 체외배양을 실시하였다.

난포란을 체외성숙시키기 위한 파립막세포와의 공배양은 Racowsky와 Mcgaughey(1982)의 방법에 따라 파립막세포수를 1×10^6 /ml로 조정하여 사용하였다.

난포란의 체외성숙 판정은 배양된 난포란을 0.3% hyaluronidase로 5분간 처리하여 난구세포를 제거하고 acetic-alcohol고정액(1:3)으로 고정하여 1% acetic orcein으로 염색하고 위상차현미경하에서 Shea 등(1976), Iritani 등(1984), Ball 등(1984)의 방법에 따라 metaphase II에 도달된 난자를 성숙난자로 판정하였다.

4. 정자처리와 체외수정

정자의 체외수정능획득은 서로 다른 2개체의 한우 동결정액 straw를 용해 혼합하여 caffeine(Ohgoda 등, 1988)과 caffeine-heparin(Niwa와 Ohgoda, 1988)을 첨가하고 39℃, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도의 CO₂ 배양기에서 전배양하여 유기하였다.

정자의 침체반응율은 Didion 등(1989)의 이중염

색법에 준하여 한 표본당 2개의 도말표본을 만들어 슬라이드당 200개의 정자를 평가하여 판정하였다.

Caffeine과 heparin의 최종농도를 각각 5 mM과 10 µg/ml 되게 하였고 정자수는 1.0×10^6 /ml 생존정자수로 하여 petri-dish에 0.1 ml씩 소적을 만든 후 멸균 paraffin oil로 피복하고 성숙된 난포란을 10~15개씩 넣고 39°C, 5% CO₂, 95% 공기를 100% 습도의 CO₂ 배양기에서 18시간 동안 체외수정을 실시하였다.

5. 체외수정란의 체외배양

1) 과립막세포와의 공배양

체외수정란의 체외발생을 위한 과립막세포의 준비는 체외성숙 배양시와 같은 방법으로 과립막세포를 분리하여 4 well-dish에 0.5 ml씩 분주하여 48시간 배양시켜 과립막 단층세포층을 형성시킨 후 공배양을 실시하였으며 매 48시간마다 신선배양액으로 배양액의 1/2씩 교환하였고 체외수정 후 18시간 된 난포란을 공배양하여 배발생 상태를 관찰하였다.

2) 난관 상피세포와의 공배양

난관 상피세포와의 공배양은 Gandolfi와 Moor (1987)의 방법에 따라 난관을 TCM199 2 ml로 관류하여 원심분리하여 상층액을 제거하고 2~3회 반복 세척한 후 Antibiotic-Antimycotic(Gibco)을 ml당 0.02 ml 첨가하여 48시간 배양하여 난관 상피세포 단층세포층을 형성시키고 과립막세포와 같은 방법으로 공배양을 실시하여 배발생 상태를 관찰하였다.

6. 수정란의 이식

1) 비외과적 이식

수정란 이식을 위한 수란우를 중앙대학교 부속목장에서 사육중인 한우 암소를 이용하였다. 수란우는 정상적인 발정주기와 번식장애가 없다고 판정되는 미경산우를 선정하여 자연 발정주기 5~6일에 미추어 16세포기 또는 상실배기의 수정란을 이식하였고 발정주기 7~8일에 배반포기의 수정란을 0.25 straw에 장진하여 Curtis(1990)의 방법으로 2개를 자궁에 비외과적으로 이식하였다.

2) 외과적 이식

외과적 이식을 수란우의 선정은 비외과적 이식 대상우와 같은 방법으로 선정하였으며 발정동기화를 위하여 PRID(progesterone rearing inhibiting device)를 삽입하고 12~14일째 제거한 후 익일에 PMSG를 주사하여 발정을 유도하고 외과적 수술을 위하여 림퐁(바이엘약품, 한국)으로 전신 마취를 실시하고 정중복부를 절개하여 난소 및 난소간막을 복강속에서 끌어내어 4~8세포기의 수정란을 난관 누두부를 통하여 양쪽 난관에 2개의 수정란을 이식하였다.

7. 임신 진단

수태 여부의 판정은 수정란을 이식하여 다음 발정 재귀 여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 난포란의 체외성숙

Table 1. *In vitro* maturation of oocytes cultured in TCM 199 with GC and hoirmone

Maturation medium	No. of oocytes		Maturation rate(%)
	Examined	Matured	
10%FCS	28	16	57.1
10%FCS+GC	115	76	66.1
10%FCS+GC+FSH, LH, E ₂	111	84	75.6
10%FCS+GC+FSH, HCG, E ₂	122	98	80.3

* Hormone level was 5µg /FSH, 10µg /ml LH, 10IU /ml HCG and 1µg /ml Estradiol-17β

난포란을 성숙배양액 TCM199에 FCS 10%와 호르몬을 첨가하고 과립막세포와 공배양하였을 때 난포란의 체외성숙율은 Table 1과 같다.

FCS 10%만 첨가된 배양액에서 난포란의 체외성숙율은 57.1%이었고 FCS 10%와 과립막세포와의 공배양한 결과는 66.1%이었다. FCS 10%와 FSH, LH, E₂ 과립막세포가 첨가된 배양액에서의 체외성숙율은 75.6%이었으며, FCS 10%와 FSH, HCG, E₂ 및 과립막세포와 공배양한 결과는 80.3%이었다.

TCM 199배양액에 혈청만을 첨가하여 난포란을 체외성숙시켰을 때 난포란의 체외성숙율은 57.1%로 혈청과 과립막세포와 공배양하였을 때 66.1%로 향상되었으나 큰 차이는 없었고 혈청과 호르몬을 첨가하고 과립막세포와 공배양하였을 때는 75.6%와 80.3%로 향상되었다.

난포란의 체외성숙율은 혈청만을 첨가하여 체외배양하였을 때보다는 혈청을 첨가하고 과립막세포와 공배양하였을 때 향상되었으며 혈청과 호르몬을 첨가하고 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시킬 때 매우 높게 향상되었다.

이와 같이 과립막세포는 난포란의 성숙과정에 없어서는 안되는 필수적인 요인으로 난구세포 팽화에 유익하며 성숙을 및 수정율을 향상시키며(Ball 등, 1983), 혈청과 과립막세포는 난포란의 체외성숙에 유효하고(Crister 등, 1989; Fukui, 1989; Fukui와 Ono, 1989) 혈청, 호르몬 및 과립막세포는 난포란의 체외성숙시 핵과 세포질 성숙에 영향을 미친다(Sirard와 Bilodeau, 1990)고 하였다.

이와 같이 난포란의 체외성숙율은 혈청 및 호르몬을 첨가하고 과립막 세포와 공배양하였을 때 향상되며 이후 체외수정과 배발생에 매우 유효한 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

2. 정자처리에 따른 정자의 침체반응을

동결 용해된 소 정자를 caffeine 단독처리와 caffeine-heparin 병용처리에 의한 정자의 침체 반응율은 Table 2와 같다.

동결 용해후 정자의 생존율은 98.3%이었으나 caffeine-heparin 처리후 전배양시간에 따라 79.3%에서 48.1%로 감소하였다. 침체가 완전한 생존 정자는 동결 용해후 93.8%이었으나 전배양시간에 따라 66.0%에서 30.8%로 감소하였고 침체가 소실된 생존정자는 동결용해 후 4.5%에서 전배양 시간에 따라 13.3%에서 17.3%로 증가하였으며 침체가 소실된 죽은 정자는 동결용해 후 1.3%에서 전배양시간에 따라 11.6%에서 43.2%로 증가하였다.

Caffeine 처리구에서도 정자의 생존율은 동결용해 후 98.0%이었으나 전배양시간에 따라 69.4%에서 41.5%로 감소하였다. 침체가 완전한 생존정자는 동결 직후 93.9%이었으나 전배양시간에 따라서 56.8%에서 20.3%로 감소하였고 침체가 소실된 생존정자는 동결용해 후 4.1%에서 전배양시간에 따라 12.6%에서 21.2%로 증가하였으며 침체가 소실된 죽은 정자는 1.8%이었으나 전배양 시간에 따라 17.2%에서 47.1%로 증가하였다.

이처럼 caffeine 단독 처리에서도 caffeine-hep-

Table 2. Acrosome reaction of frozen-thawed sperm preincubation in BO medium

Sperm treatment	Incubation time(hrs)	Dead sperm		Live sperm		A+C	B+D
		Intact(A)	Detacted(B)	Intact(C)	Dectacted(D)		
Caffeine (5mM)	0	0.4	1.3	93.8	4.5	94.2	5.8
	0.5	9.0	11.6	66.0	13.3	75.0	25.5
	1.0	15.7	21.0	50.2	13.0	65.9	34.1
Heparin (10 μ g/ml)	1.5	13.1	32.7	41.0	13.2	54.1	45.9
	2.0	8.8	43.2	30.8	17.3	39.5	60.5
Caffeine (5mM)	0	6.2	1.8	93.9	4.1	94.1	5.9
	0.5	13.4	17.2	56.8	12.6	70.2	29.2
	1.0	19.8	23.5	45.8	10.9	65.6	34.4
	1.5	10.5	29.6	46.1	13.8	56.6	43.4
	2.0	11.1	47.4	20.3	21.2	31.4	68.6

arin 병용처리와 유사한 결과를 나타내고 있다. 양 처리구에서 정자의 침체반응율은 25.5%에서 68.6%로 증가하고 있으나 생존 정자중 진정 침체반응율은 전배양 30분 이후에 전배양 시간에 따라 10.9%에서 21.2%로 증가하지만 큰 변화는 없었다. 정자의 침체 반응율은 양처리구에서 매우 비슷한 경향을 나타내었고 큰 차이를 보이지 않았다.

이와 같은 결과는 Parrish 등(1985, 1988)의 정자의 생존율보다는 낮았으나 침체 반응율과는 같았고 Didion과 Grave(1989)는 전배양 6시간에 침체반응율이 31.5%로, Didion 등(1989)의 28.2%로 증가하였다는 결과와도 유사하였다.

그러나 Parrish 등(1986)은 heparin이 수정능획득에 관여하며 Garbers 등(1971)은 caffeine은 정자의 호흡 및 운동성을 증가시켜 좋은 성적을 얻을 수 있다는 보고와 Niwa와 Ohgoda(1988)가 caffeine 단독처리보다는 caffeine-heparin을 병용처리함으로써 침체 반응율이 향상되었다는 결과와는 상이하였다. 그러나 침체반응 정자중 진정 침체반응 정자의 비율이 각 처리 30분 이후에 10.9~21.2%로 큰 변화가 없는 것으로 보아 체외 수정능획득 과정에서 침체반응이 유기된 정자는 곧 사멸하는 것으로 생각된다. 이와 같이 정자의 세포주기는 정상 정자에서 수정능획득 정자로 변하고 이어서 진정 침체반응 정자로 변한 다음 사멸되는 것으로 사료되었다.

3. 체외수정 난포란의 발생능

TCM199 배양액에서 혈청, 호르몬, 과립막세포

및 난관상피세포와 체외배양하였을 때 난포란의 배 발달율은 Table 3과 같다.

TCM199 배양액에 FCS 10%를 첨가하고 과립막세포와 공배양하여 체외배양하였을 때 난포란의 난할율은 60.7%이었고 상실배 이상 발달율은 9.8%이었으며 FCS 10%와 FSH, LH, HCG, E₂를 첨가하고 과립막세포와 공배양하였을 때 난할율은 80.2%이었고 상실배 이상 배발달율은 16.1%이었다. FCS 10%와 FSH, LH, HCG, E₂를 첨가하고 난관상피세포와 공배양하였을 때 난할율은 80.2%이었으며 상실배 이상 배발달율은 40.1%이었다. 소 난포란을 체외수정하여 혈청, 호르몬, 과립막세포 및 난관상피세포와 공배양하였을 때 난할율은 호르몬을 첨가하고 체세포와 공배양하였을 때 향상되었으며 상실배 이상 배발달율에서도 호르몬을 첨가하고 공배양하였을 때 호르몬을 첨가하지 않은 구보다 매우 높았다. 그러나 같은 호르몬 첨가구라도 과립막세포와의 공배양 보다는 난관상피세포와 공배양에서 상실배 이상 배발달율이 40.1%로 매우 높았으며 이중 배반포기 이상 발생달율도 17.3%이었다.

이와 같은 결과는 Table 1에서 보이는 체외성숙율과 비슷한 경향을 나타내고 있어 호르몬과 체세포와의 공배양은 난포란의 체외성숙도를 충실하게 하며 결과적으로 체외수정에서 초기배의 발달율을 높게 하는 것으로 생각되어진다. 과립막세포와 난관상피세포와 공배양시에 난할율은 80.2%로 같았으나 배발생율에 있어서는 난관상피세포와의 공배양이 유효한 것으로 보인다.

이처럼 난포란을 과립막세포와 공배양할 때 성숙

Table 3. Development of bovine oocytes after *in vitro* fertilization co-cultured in TCM199 with hormones, granulosa cell or bovine oviduct epithelium cell

Culture system	No. of oocytes		No. of oocytes developed to				Mo + Bc cleaved
	Cultured	Cleaved(%)	2-4cell	8-16cell	Morula	Blatocyst	
10%FCS+GC	84	51(60.7)	29	17	3	2	5(9.8)
10%FCS+GC +FSH+HCG+E ₂	160	118(80.2)	62	37	11	8	19(16.1)
10%FCS+BOEC +FSH+HCG+E ₂	188	156(80.2)	43	48	38	27	65(40.1)

* FSH + HCG + E₂ See footnote in Table 1

Table 4. Result in transfer of IVF bovine embryos

Cell stage	No. of embryos transferred	No. of recipient	Transfer method	Pregnancy
4~8	8	2	Surgical (oviduct)	Extended
Morulae	10	5	Non-surgical (uterus)	Extended
Blastocyst	4	2	Non-surgical (uterus)	Extended

울이나 수정술에는 큰 영향을 미치지 않으나 상실 배 및 배반포기는 과립막세포와의 공배양에서만 이루어지며(Crister 등, 1986), 난포란을 난관상피세포와 공배양하였을 때 난관상피세포는 배 발생 자극 인자를 분비하고 배 발생 억제 물질을 제거하며(Eystone과 First, 1989), 난구세포와 과립막세포는 난포란의 발생능과 세포질 성숙에 꼭 필요하다(Fukai와 Ono, 1989; Sirard와 Bilodeau, 1990). 이처럼 공배양되는 체세포는 배 발생을 촉진시키는 물질을 분비하고(Gandolfi와 Moor, 1989), 배 발생에 필요한 인자를 생산하여(Bavister, 1988; Rexroad, 1989), 체외수정란을 helper cell들과 공배양하여 체외배양 하면 상실배 이상으로 발생이 증진되지만 배반포에로의 발육촉진 효과는 명확히 규명되어 있지 못하다.

그러나 Lu 등(1988)은 난관상피세포와의 공배양은 체외수정란을 이식하여 산자를 얻을 수 있는 배 발생에 적절한 환경을 제공할 수 있다고 하여 난포란의 체외발생은 체세포와의 공배양이 매우 유효한 수단임을 알 수 있었다.

4. 수정란의 이식

정상 발정주기를 갖는 한우와 홀스타인종 미경산우 9두를 선발하여 체외배양된 수정란을 외과적 및 비외과적으로 이식한 결과는 Table 4과 같다.

4~8세포의 초기배 수정란은 외과적으로 난관 두부를 통하여 양쪽 난관에 2개씩 이식하였고 또한 상실배와 배반포기의 체외수정란은 7두에 비외과적으로 2개씩 이식하였다. 이식후 발정주기를 관찰한 결과 모든 수란우에서 정상 발정 주기를 넘겼으나 임신에 이르지 못하는 못하였다. 그 원인이 배사멸 또는

임신중지에 의한 것인지 확인할 수 없었으나 체외수정란의 이식에 있어서 임신 실패의 원인은 이식되는 체외수정란의 질을 평가하는 문제와 수란우의 선발과 발정동기화에 그 원인이 있다고 생각되었다.

적 요

본 연구는 소 미성숙 난포란을 혈청과 호르몬, 과립막세포를 첨가하여 체외성숙시킨 후 체외성숙율과 초기배 발생능을 살펴보고 체외수정란을 이식하였다. 또한 정자 처리에 따른 침체반응을 살펴 보았다. TCM199 배양액내 FCS 10%와 호르몬을 첨가하고 과립막세포와 공배양하였을 때 체외성숙율은 향상되었다. 정자의 침체반응율은 caffeine과 heparin 처리에 따라 차이가 없었으며, 침체반응율은 정자처리 30분에 약 25% 증가하였다. 체외수정 후 난할율은 TCM199 배양액에 혈청, 호르몬, 과립막세포나 난관상피세포와 공배양하였을 때 높았으나 과립막세포와 난관상피세포와는 차이가 없었다. 배양액내 혈청, 호르몬 및 난관상피세포와 공배양하였을 때 난할율은 80.2%이었으며 배반포의 발생율은 17.3%이었다. 체외수정란을 외과적 및 비외과적 방법으로 9두 수란우에 이식하여 수태되지는 않았으나 정상 발정주기를 넘겨 체외수정란에 의한 수태 가능성을 보였다.

참고문헌

Ball GD, Leibfried ML, Ax RL and First NI, 1984. Maturation and fertilization of bovine

- ocytes *in vitro*. J. Dairy Sci. 67:2775-2785.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28:717-725.
- Bavister BD. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology 29:143-154.
- Crister ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL and First NI. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology 25:150.
- Curtis JL. 1990. Cattle embryo transfer procedure. KBN, U.S.A.
- Didion BA, Doberinsk JR, Giles JR and Graves CN. 1989. Staining procedure to detect viability and ture acrosome reaction in spermatozoa of various species. Gamet. Res. 22:51-57.
- Didion BA and Graves CN. 1986. *In vivo* capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrus and diestrus cows. J. Anim. Sci., 62:1029-1033.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviduct tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert. 85:715-720.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K and Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 42:114-119.
- Fukui Y. 1989. Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. J. Anim. Sci. 67:1318.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effect of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fret. 86:501-506.
- Gandolfi F and Moor RM. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert. 81:23-28.
- Garver DL, First NL, Sullivan JJ and Lardtis. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. Biol. Reprod., 5:336-339.
- Goto K, Kajihara Y, Koba M, Kosaka S, Nakanishi Y and Ogawa K. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci. 67:2181-2185.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Nakanishi Y and Ogawa K. 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.
- Goto KN, Iwai N, Takuma Y and Nakanishi P. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. J. Anim. Sci., 70:1149-1145.
- Iritani A, Kasai M, Niwa K and Song H. 1984. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. J. Reprod. Fert. 70:487-492.
- Kajihara Y, Goto K, Kosaka S, Nakanish Y and Ogawa K. 1987. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocyte and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. Jpn. J. Anim. Reprod. 33:173-180.
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y and Goto K. 1991. Pregnancy by bovine blastocysts developed in co-culture with cumulus cells/uterine endometrial cells after *in vitro* fertilization. Jpn J. Anim. Reprod. 37:177-184.

- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y, Koshiba Y, Hishiyama K, Shiraiwa K and Goto K. 1990. Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *Theriogenology* 33:264.
- Keefer CL, Stic SL and Mathews DL. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the prouction of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.* 50:935-939.
- Leifried-Rutledge ML, Crister ES, Parish J and First NL. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31:61-74.
- Lu KH, Gordon HI, Chen HB, Gallagher M and McGovern H. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.* 122:539-540.
- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in cultrue. *Theriogenology* 30:733-741.
- Ohgoda O, Niwa K, Yuhara M, Takahashi S and Kanoya K. 1988. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology* 29:1375-1381.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL and First NL. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the reaction and fertility of boine sperm *in vitro*. *Theriogenology.* 24:537-549.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eystone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology.* 25 (4):591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod* 38:1171-1180.
- Racowsky C and McGaughey RW. 1982. Further studies of the effects of follicular fluid and membrane granulosa cells on spontaneous maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.* 66:505-512.
- Rexroad CE, Jr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenolgy* 29:387-397.
- Shea BF, Latour JPA, Bedirian KN and Baker RD. 1976. Maturation *in vitro* and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.* 43:809-811.
- Sirard MA and Bilodeau S. 1990. Effects of granulosa cell co-culture on *in vitro* meiotic resumption of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 89:459-465.
- 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 짝대오, 이효중, 최상용. 1994. 체외성숙, 수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우이식에 의한 산자생산. *한국가축번식학회지* 18(1):47-54.
- 한용만, 이철상, 이정호, 신상태, 김동훈, 이훈택, 정병현, 정길생, 김영수, 김영훈, 이근세, 김교국, 황윤식, 이경광. 1994. 체외수정란 유래의 송아지생산. *한국가축번식학회지* 18(1):7-13.
- 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외송아지 생산에 관한 연구. *한국수정란이식학회지* 18(2):143-149.