

한우 체외수정란의 발달에 자궁상피세포 및 난관 상피세포의 공배양이 미치는 영향

최선호 · 양병철 · 김일화 · 손동수 · 이광원 · 이동원 ·
서국현 · 이호준 · 이중휘 · 김경남
농촌진흥청 축산기술연구소

Effects of Co-culture with Uterine or Oviductal Epithelial Cells on Development of Korean Native Cattle Oocytes Fertilized *In Vitro*

S. H. Choi, B. C. Yang, I. H. Kim, D. S. Son, K. W. Lee, D. W. Lee, K. H. Suh,
H. J. Lee, J. H. Lee and K. N. Kim

National Livestock Research Institute, Rural Development Administration

SUMMARY

The object of this study was to evaluate the effect of uterine epithelial cells on development of Korean native cattle(KNC) oocytes fertilized *in vitro*. Oocytes were collected from ovaries of slaughtered Korean Native Cows and matured in TCM199 with granulosa cells supplemented with 10% FBS, 5 μ g/ml FSH, 10 IU/ml hCG, and 1 μ g/ml estradiol-17 β for 24 hrs. For co-culture of *in vitro* development of fertilized ova, oviductal epithelial cells(1×10^6 cells/ml) obtained from slaughtered cow and uterine epithelial cells(1×10^6 cells/ml) flushed from the superovulated holstein on Day 7 were incubated in 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% air. Frozen-thawed KNC sperm was capacitated with BO(Brackett & Oliphant, 1975) medium supplemented with 10mM, 5mM-cafein. Matured oocytes were inseminated for 20 hrs. And then fertilized oocytes were washed with culture medium and transferred to oviductal epithelial cells for *in vitro* development and three days later a portion of embryos were transferred to uterine epithelial cells. Stastical methods of developmental rates on KNC-IVF oocytes was ANOVA-test.

Developmental rates of KNC-IVF oocytes was significant higher(P<0.01) when co-cultured with uterine epithelial cells(25.2%) than oviductal epithelial cells. Blastocyst cultured for 7 to 9 days were frozen by automatic freezer with 1.4M glycerol-PBS. Survival rates of blastocyst was 40.0%.

Fourteen frozen-thawed blastocysts were transferred to five holstein heifers on day 7 after natural estrus. Three recipients were observed twin and one recipient was single by ultra-sound systems on days 45 after embryo transfer.

(Key word: *in vitro*, co-culture, uterine or oviductal epithelial cells, embryo transfer)

서 론

가축개량의 효율을 극대화하기 위한 기술은 선발
과 자연교배 등 자연현상의 이용을 시작으로 하여
생명현상을 인위적으로 조절하려는 노력에 까지 이

르게 되었다.

최근 수정란이식 기술이 개발되면서 수정란 생산의 한계성이 노출되었고, 그 해결책으로 체외수정란이 각광을 받게 되었으며, 저가 및 대량의 수정란을 생산할 수 있다는 장점을 지니고 있어, 이 기술을 바탕으로 쌍자생산, 핵이식 등의 첨단유전공학적인 기법의 가능성을 한층 더 높여주었다. 체외수정은 미성숙 난포란의 체외성숙, 체외수정, 체외배양 등 일련의 기술들이 집약된 것으로서, 체외성숙, 체외수정 기술의 향상을 이식 가능 수정란의 다량생산이 주된 기법이므로, 기본 배양액을 중심으로 호르몬(Fukushima와 Fukui, 1985; Younis 등, 1989), 혈청(Xu 등, 1987; Lu 등, 1988; Fukui와 Ono, 1989) 등의 첨가에 의해 발생능이 향상되었음을 보고하였고, 수정란의 체내 발달과정을 응용하여 과립막세포(Goto 등, 1988; Lu 등, 1990), 난관상피세포(Fukui 등, 1989; Lu 등, 1990; Kim 등, 1991; Choi 등, 1991; Xu 등, 1992; Hernandez-Ledzma 등, 1993; Miller 등, 1994; Shamsuddin 등, 1994; Dunford 등, 1994; Nagao 등, 1994; 정 등, 1994; Katska 등, 1995), 자궁상피세포(Voelkel 등, 1985; Goodeux 등, 1989; Rorie 등, 1990; Kajihara 등, 1991; Goto 등, 1992), 이종의 체세포(Goto 등, 1992; Kane 등, 1992; Hawk와 Wall, 1994) 등과의 공배양이 종 특이성에 관계없이 체외발달에 있어서 block현상을 극복시켜 준다고 하였다(Rexroad, 1989; Bongso 등, 1991; Bavister, 1992). 그러나 각 세포들의 종 특이성에 의한 차이, 처리미숙에 의한 오염, 처리시간 소요 등의 문제점을 내포하고 있어, 그 재현성에 있어서 큰 차이를 나타내고 있는 실정이다. 한편 자동세포동결기의 개발로 생산된 수정란의 이용효율을 향상시킬 수 있게 되어, 수정란의 동결보존이 수정란이식에는 필수적이며, 대표적으로 glycerol을 항동해제로 이용하고 있으나(Goto 등, 1992), 동결 또는 융해시 평형시간이 요구되므로, 인공수정과 같이 간편한 조작으로 시술할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다. 또한 수정란 이식시 수정란의 일령과 수란우에 대한 동기화에 따른 수태율(Monson 등, 1992; Hasler 등, 1995) 등 수정란과 수란우의 조절에 따른 문제점도 많이 산재되어 있다.

따라서 본 실험은 수정란이식 기술확립의 일부로서 체외수정에 의한 한우 수정란을 난관 및 자궁 상피세포와의 체외배양에 의한 공배양효과와 동결-융해 체외수정란을 이식하여 산자를 생산하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취

도살장으로부터 폐기되는 한우 암소의 난소를 33~35℃ 보온병에 담아 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포란은 20 gauge 주사침이 부착된 10 cc 주사기로 난소실질에 삽입하여 난포 직경 2~6mm의 난포로부터 난포란을 흡입 채취하였으며, 시험관에 10분간 정치 후 상층액을 제거하고, 난구세포가 충만한 난포란만을 선별하여 본 실험에 공시하였다.

2. 배양액 제조

체외성숙 및 배발생용 배양액은 TCM199를 기본 배양액으로 FSH 5 μ g/ml, hCG 10 IU/ml, estradiol-17 β 1 μ g/ml를 첨가하였으며 10% FBS가 되게 하였다.

체외수정용 배양액은 BO배양액(Brackett와 Oliphant, 1975)에 10mM, 5mM caffein을 첨가하였으며, 배양액들은 사용 전에 12시간 이상 5% CO₂, 95% 공기, 39℃ CO₂ 배양기에서 전배양을 실시하였다.

3. 체외성숙 및 체외수정

선별된 난포란의 체외성숙은 직경 10mm이상 난포의 과립막세포를 1 \times 10⁶ cells/ml가 되게 조정하여 24시간 동안 공배양을 실시하였다.

체외수정을 위하여 정자처리는 서로 다른 2개체의 한우 동결 정액을 37℃ 온수에 용해 후, 10mM caffein이 함유된 BO액으로 2회, 5mM caffein이 함유된 BO액으로 1회 세정을 실시하였고, 최종농도는 1 \times 10⁶ cells/ml로 조정하여 200 μ l의 소적을 만들어 10~15개의 성숙 난포란을 주입하여 20시간 체외수정을 실시하였다.

4. 공배양에 의한 배발달

수정이 완료된 수정란은 TCM199 배발생용 배양액으로 3회 이상 세척 후 난관 상피세포와 공배양을 실시하였고, 일부는 배발달 3일 후 자궁 상피세포로 옮겨 후기배 발달을 유도하였다. 공배양을 위한 난관 상피세포는 도축우의 난관을 채취하여 관류에 의해 채취하였으며, 자궁 상피세포는 과배란 처리된 홀스타인으로부터 수정란 채취와 함께 채취하여 사용하였다. 채취된 두가지 세포들은 3회 이상 세척 후 최종농도를 1×10^6 cells/ml로 조정하여 공배양을 실시하였다. 배발달율의 통계적 처리는 ANOVA-test에 의하였다.

5. 수정란의 동결 및 수정란 이식

배발달 7~9일 된 형태학적으로 정상인 배반포기 수정란을 선별하여 1.4M glycerol-PBS로 자동세포 동결기를 이용하여 동결을 실시하였다. 이식대상우가 발생될 경우 30℃ 온수에 15~20초간 용해하여 2단계로 항동해제를 제거하였고, 수정란이식은 자연발정 후 7일째인 홀스타인 미경산우 5두에 3~4개/두의 동결-용해 체외수정란을 이식하였으며, 45일째에 초음파 진단기(probe 7MHz)를 이용하여 임신감정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 공배양에 의한 배발달율

난관상피세포와 자궁상피세포와의 공배양에 의한 배발달율은 Table 1 과 같다.

체외수정 후 난관상피세포에 공배양한 결과 배반포기로 229개가 발달하여 8.3%의 발달율을 보였으며, 체외수정 후 난관 상피세포에서 배발생 3일 후

자궁 상피세포로 옮겨 공배양한 결과 27개로 25.2%를 나타내어 난관 상피세포 단독배양에 의한 것보다 월등히 높은 결과를 보였으며, 상실기 이상 발달한 것도 41.1%로 난관 상피세포만의 공배양보다 월등히 높은 결과를 나타냈다. 이 결과는 Choi 등(1991)이 난관 상피세포의 공배양 효과가 인정되지 않았다고 하여 배반포기 발달율이 $11.8\% \pm 3.5\%$ 를 보인 결과보다 월등히 높은 결과였으며, Prokofiev 등(1992)의 결과(3.6%)와 정 등(1993)의 결과(7.7%)보다도 매우 높은 결과였다. 난관 상피세포만으로 공배양시 12.2%의 상실기 이상의 배발달율을 보인 Fukui 등(1989)의 결과보다도 높은 결과였으며, 정 등(1994)과는 유사한 경향이였다. 그러나 Nagao 등(1994)은 33%가 배반포기로 발달하였다고 하여 높은 결과를 보였다.

또한 난관상피세포와의 단독배양보다 다른 배양액, 혈청, 기타 세포와의 동시 또는 첨가하여 공배양한 결과에서 대체로 유사한 결과를 보였는데, Kim 등(1990)이 CZB배양액에 배양시 38%의 상실기 이상 발달율을, Miller 등(1994)이 TALP배양액에 배양시 35%의 상실기 이상 발달율을 보였고, 호르몬 첨가 배양액으로 공배양을 한 Wiemer 등(1991)은 41.1%의 배반포기 발생율을 보여 다소 높은 결과였으며, 발정혈청 첨가시 $23.9 \pm 3.6\%$ 의 배반포기 발달율을 보였다고 하였다. 기타 세포들과의 공배양은 Lu 등(1990)이 과립막세포와의 공배양시 25~30%의 배반포기 발달율을, BRL세포와의 공배양시 Dunford 등(1994)도 20~23%의 배반포기 발달율을 보여 유사한 결과였으나, Hernandez-Ledezma 등(1993)은 40%의 배반포기 발달율을 보여 다소 높은 경향이였다.

한편 자궁 상피세포와의 공배양에 있어서는 Kajihara 등(1991)이 난관 상피세포에 1일 발생 후 자

Table 1. Effect of co-cultures with epithelial cells on development of KNC oocytes fertilized *in vitro*

Co-culture with epithelial cells	No. of oocytes fertilized	No. of oocytes developed to	
		morula(%)	blastocyst(%)
Oviduct	2754	199(7.2)	229(8.3) ^a
Uterus	107	17(15.9)	27(25.2) ^b

^{a, b} Developmental stage within columns with different superscript differ ($p < 0.01$).

궁 상피세포로 공배양한 것은 39.4%의 배반포기 발달율을 보여 다소 높았으나, 난관 상피세포에서 2일 배양 후 자궁 상피세포와 공배양시 29.6%를 보여 본 결과와 유사한 결과였다. Goto 등(1992)도 4~8 세포기 수정란을 난관 상피세포와의 공배양시 37.5%, 자궁 상피세포와의 공배양시 39.2%를 보여 본 결과보다는 높았으며, 자궁 상피세포의 공배양이 다소 높다고 한 것은 유사한 경향이었다. 이상의 결과에서 난관 상피세포나 자궁 상피세포 모두 체외 수정란의 발달에 좋은 영향을 미치는 것으로 여겨지며, Xu 등(1992), Goto 등(1992)은 난관상피세포와 공배양시 *in vivo* 수정란의 발달시간과 유사하다고 하였고, Katska 등(1995)은 난관 상피세포를 동결-융해 후 공배양하여도 유사한 결과를 보인다고 하였으며, Rorie 등(1990)은 동결-융해 수정란을 자궁에 배양함으로써 유용한 결과를 얻었다고 하였고, Dunford 등(1994)은 난관 상피세포와의 공배양에 의해 배반포기 세포수가 133~138개로 충실한 수정란을 얻을 수 있다고 하여, 체내 발달과정 중의 생식기유래 상피세포들은 체외수정란의 체외 발달에 미치는 영향이 큰 것으로 사료된다.

2. 동결-융해에 의한 생존율

체외발달 7~9일 된 배반포기 수정란을 1.4M glycerol-PBS에 자동세포동결기로 동결하고, 융해 후 생존율은 Table 2와 같다.

동결방법은 가장 높은 생존율을 얻기 위하여 conventional methods를 이용하였으며, 35개의 배반포기 수정란을 동결하여, 14개의 형태학적으로 정상인 배반포기 수정란을 얻어 40.0%의 생존율을 나타냈다. Massip 등(1993)은 1.36M-glycerol과 0.25M-sucrose로 동결하고 융해 후 10% FCS-TCM199에서는 40%의 회복율을 보여 같은 결과를 나타냈으나, 난관 상피세포와의 24시간 공배양시 82%

Table 2. Results of survival rates of frozen-thawed blastocyst derived from KNC*-IVF

No. of blastocysts frozen-thawed	No. of blastocysts survived	Survival rate (%)
35	14	40.0

* KNC : Korean native cattle

의 높은 회복율을 보여 난관상피세포와의 공배양이 체외발달시 뿐만 아니라, 동결-융해 수정란에도 유익한 환경을 만들어 주는 것으로 보고하였으며, Rorie 등(1990)도 동결-융해 수정란을 자궁에 옮겨 회복시킨 결과 상당히 좋은 결과를 나타낸다고 하였다.

3. 수정란 이식

동결-융해 수정란을 자연발정 7일된 홀스타인 비경산우에 이식한 결과는 Table 3과 같다.

홀스타인 비경산우 5두에 이식하였으며, 4두가 착상되어 80%의 착상율을 보였고, 3두는 쌍자, 1두는 단태가 착상되었으며, 임신감정은 초음파진단기를 이용하여 이식 후 45일째에 실시하였다.

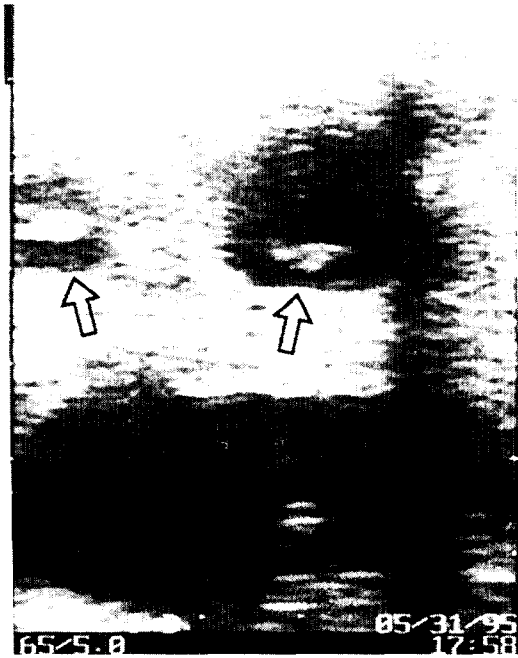
신선배반포기 수정란의 이식시 Xu 등(1990)은 42.9~66.7%의 수태율을 보였고, Hasler 등(1995)은 7일째 수정란은 56%, 8일째 수정란은 43%, 9일째는 41%의 수태율을 보였으며, 동결-융해 배반포기 수정란의 이식시 Lu 등(1990)은 50%, Hasler 등(1995)은 42%의 수태율을 보여 본 실험의 결과보다는 다소 낮은 경향이었다. 이는 자연발정 7일째의 건강한 미경산우를 수란우로 선발하였고, 두당 2~4개의 수정란을 이식하여 보다 높은 수태율을 보인 것으로 사료된다. 대부분의 결과에서 Suzuki 등(1991), Kajihara 등(1992), Monson 등(1992)과 같이 7일째 배반포기 수정란을 이식할 때, 7일 이상의 것보다 높은 수태율을 나타내어 본 실험의 결과와 유사하였다.

Table 3. Results of embryo transfer of KNC*-IVF blastocysts

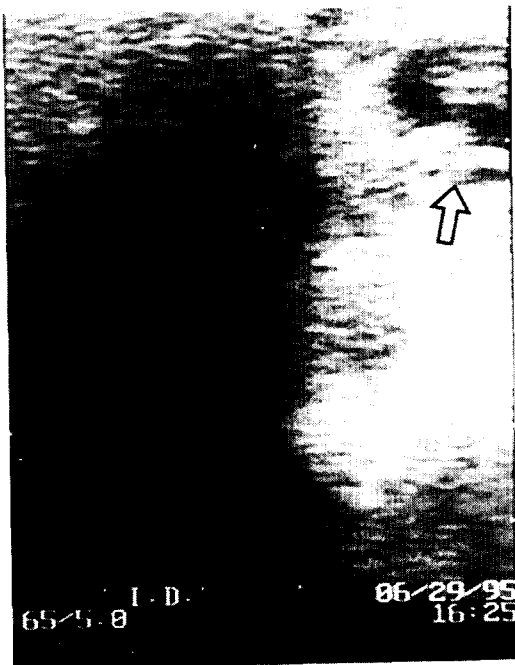
Recipients	Transferred Day**	No. of blastocysts transferred	Pregnancy
1	7th	3	twin
2	7th	2	single
3	7th	4	twin
4	7th	2	non-pregnant
5	7th	3	twin

* KNC : Korean native cattle

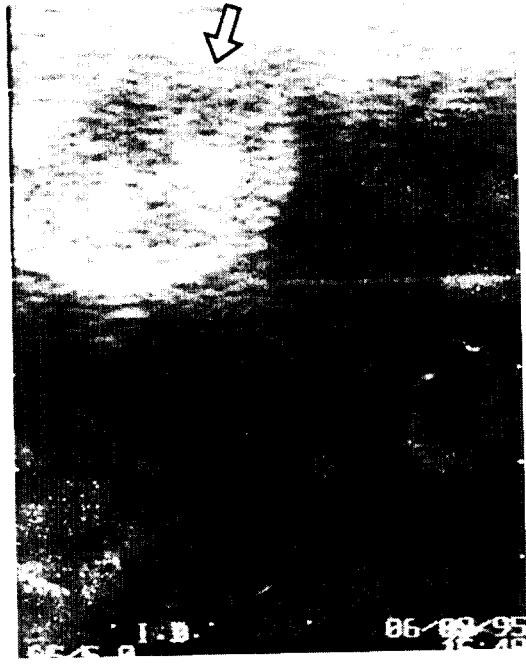
** 7th day after natural heat



a) Twin conceptus



b) Single conceptus



c) Single conceptus

Fig. 1. Photographs by pregnancy diagnosis with ultrasound system.
The arrows will show conceptuses

적 요

체외성숙·체외수정된 한우 난포란을 난관 상피세포 및 자궁 상피세포와의 공배양에 의한 배 발달을 조사하기 위하여 본 실험을 실시하였으며, 결과는 다음과 같다.

1. TCM199배양액에 10% FBS, FSH 5 μ g/ml, hCG 10 IU/ml, estradiol-17 β 1 μ g/ml를 각각 첨가하고, 과립막세포와의 공배양에 의해 24시간 동안 체외성숙을 유도하였다. 5mM caffein에 의해 체외수정능 획득된 동결-융해 한우정자로 20시간 체외수정을 실시하였고, 난관 상피세포와의 공배양에 의해 배발생을 유도하였으며, 일부는 3일 후 자궁 상피세포와의 공배양을 실시하였다. 난관 상피세포 단독 공배양시 8.3%, 자궁 상피세포에 공배양시 25.5%의 배반포기 발달율을 나타내어 난관 상피세포에서 발생 후 자궁 상피세포와의 공배양시 결과가 유의적으로 높은 것으로 나타났다(P < 0.01).
2. 체외발달 7~9일 된 배반포기 수정란을 1.4M glycerol-PBS에서 자동세포동결기로 동결하고 융해 후 40.0%의 생존율을 나타냈다.
3. 자연발정 7일째 홀스타인 미경산우 5두에 2~4개의 동결-융해 배반포기 수정란을 이식하여 45일째 초음파진단기로 임신감정한 결과 3두는 쌍자 1두는 단태가 임신되었다.

따라서, 한우체외수정란의 체외발달시 난관 상피세포와 자궁 상피세포와의 공배양에 의해 배발달을 향상시킬 수 있으며, 자궁 상피세포가 더 좋은 효과를 나타냈다.

참고문헌

- Bavister BD. 1992. Co-culture for embryo development: is it really necessary?. Human Reproduction, 7(10):1339-1341.
- Bongso A, Ng SC, Fong CY and Ratnam S. 1991. Cocultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction, Fertility and Sterility, 56(2):179-191.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
- Chian RC, Okuda K and Niwa K. 1995. Influence of cumulus cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes derived from *in vitro* maturation. Animal Reproduction Sci., 38:37-48.
- Choi YH, Fukui Y and Ono H. 1991. Effects of media the presence of bovine oviduct epithelial cells during *in vitro* fertilization on fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes. Theriogenology, 36:863-873.
- Durnford R, Stubbings RB and Ainsworth L. 1994. Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 42:261-272.
- Fukui Y, Urakawa M, Sasaki C, Chikamatsu N and Ono H. 1989. Development to the late morula or blastocyst stage following *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. Animal Reproduction Science, 18:139-148.
- Fukushima M and Fukui Y. 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*. Anim. Reprod. Sci., 9:323-332.
- Goodeaux LL, Voelkel SA, Anzalone CA, Menezo Y and Graves KH. 1989. The effects of rhesus uterine epithelial cell monolayers on *in vitro* growth of rhesus embryos. Theriogenology, 31(1):197.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y and Nakanishi Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. J. Anim. Sci., 70:1449-1453.
- Goto K, Kajihara, Kosaka S, Koba M, 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.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-152.
- Hawk, HW and Wall RJ. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. II. Media and co-culture cells. *Theriogenology*, 41:1585-1594.
- Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD and Roberts RM. 1993. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation-*in vitro* fertilization procedures. *Theriogenology*, 39:1267-1277.
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Chitanaka Y and Goto K. 1991. Pregnancy by bovine blastocysts developed in co-culture with cumulus /uterine endometrial cells after *in vitro* fertilization. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 37:177-184.
- Kajihara Y, Kometani N, Shitanaka Y, Saito S, Yamaguchi Y, Hishiyama K and Endo M. 1992. Pregnancy rates and births after the direct transfers of frozen-thawed bovine IVF embryos. *Theriogenology*, 37(1):233.
- Kane MT, Carney EW and Ellington JE. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 38:297-312.
- Katska L, Rynska B and Smorag Z. 1995. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM /IVF oocytes. *Theriogenology*, 43:859-870.
- Keskintepe L, Burnley CA and Brackett BG. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biology of Reproduction*, 52:1410-1417.
- Kim CI, Ellington JE and Foote RH. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM199 and simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, 33(2):433-440.
- Lu KH, Gordon I, Gallagher M and McGovern H. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.*, 122:539-540.
- 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 *in vitro*. *Theriogenology*, 33(1):278.
- Massip A, Mermillod P, Wils C and Dessy F. 1993. Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97:65-69.
- Miller GF, Gliedt DW, Rakes JM and Rorie RW. 1994. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PE) or bovine oviductal epithelial cells(BOEC) alone or in combination to bovine *in vitro* fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology*, 41:689-696.
- Monson R, Northey DL, Gottfredson R, Peschel DR, Rutledge JJ and Schaefer DM. 1992. Pregnancy rates of *in vitro* produced bovine embryos following nonsurgical transfer. *Theriogenology*, 37(1):261.
- Nagao Y, Saeki K, Hoshi M and Kainuma H. 1994. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the develop-

- ment of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology*, 41:681-687.
- Prokofiev MI, Ernst LK, Suraeva NM, Lagutina IS, Udavlennikova NN, Kesyan AZ and Dolgoastskiy AI. 1992. Bovine oocyte maturation, fertilization and further development *in vitro* and after transfer into recipients. *Theriogenology*, 38:461-469.
- Rexroad CE. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31(1):105-113.
- Rorie RW, Xu KP and Betteridge KJ. 1990. Effects of culture on the post-thaw viability of cryopreserved, *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 33(1):311.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H. 1994. A serum-free culture systems for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology*, 41:1033-1043.
- Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Nishikata Y, Okamoto K and Tsukihara T. 1991. Effect of media on fertilization and development rates of *in vitro* fertilized embryos, and age and freezing of embryos on pregnancy rates. *Theriogenology*, 35(1):278.
- Voelkel SA, 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 KW, 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. *Molecular Reproduction and Development*, 30:330-338.
- Xu Kp, Greve T, Callesen H and Hyttel P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 81:501-504.
- Xu KP, Pollard JW, Rorie RW, Plante L, King WA and Betteridge KJ. 1990. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. *Theriogenology*, 33(1):351.
- Xu KP, Yadaw BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ and King WA. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matures and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 94:33-43.
- Younis AI, Brackett BG and Fayer-Hosken RA. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.*, 23:189-201.
- 정영채, 김창근, 윤종택, 이종완, 최선호. 1994. 체외수정 및 미세조작에 의한 가축배(胚)의 생산과 효율적 이용에 관한 연구. III. 소에 있어서 난포란의 체외수정과 수정란 이식. *한국수정란 이식학회지*, 9(3):261-268.
- 정영채, 김창근, 윤종택, 최선호, 정광조. 1993. 체외수정 및 미세조작에 의한 가축(胚)의 생산과 효율적 이용에 관한 연구. II. 소 체외수정 난포란의 발생단계별 동결과 이식 후의 생존성. *한국가축번식학회지*, 17(3):233-242.