

## 체외에서 양질의 한우 수정란 생산을 위한 배양조건의 설정 및 이식

박흥대 · 김종환\* · 정덕수\* · 이동철\* · 김주환\* · 윤산현\*\*

대구대학교 공과대학 생물공학과

### Embryo Transfer and Establishment of the Optimal Culture Systems for Production of Good Quality Blastocyst Derived *In Vitro* in Korean Cattle

H. D. Park, J. H. Kim, D. S. Chung, D. C. Lee and J. H. Kim

Department of Biotechnology, College of Engineering, Taegu University

\* Insemination Technician of Kyungsangbookdo

\*\* Maria Infertility Clinic

#### SUMMARY

To establish the optimal culture systems for production of transferable embryos in Korean Cattle, pregnancy rates of IVF-derived blastocysts according to different culture media, culture method and culture duration were compared. Development of IVF-derived embryos to blastocysts was most effective in YS medium group co-culture with cumulus cells.

Blastocysts cultured for 6 to 8 d *in vitro* showed higher hatching rate and good quality. Pregnancy rates after transfer of IVF-derived blastocysts cultured for 7 or 8 d were high. Through our experiments, it is considered that improvement of culture media and culture method is necessary for mass production of blastocysts with excellent of good quality in Korean Cattle.

(Key words : Korean Cattle oocyte, culture, medium, embryo quality, embryo transfer)

#### 서 론

체외에서 소 수정란의 배발달 과정중 8~16세포기에 발달정지현상(cell block)이 나타난다고 알려져 있다(Carnous 등, 1984; Wright와 Bondioli, 1981). 이러한 발달정지현상은 소 뿐만 아니라 돼지(4세포기), 생쥐(2세포기)등 각 동물의 종류에 따라 나타나는 시기가 다르며, 또한 계통에 따라 발생하는 정도의 차이도 있다. 이와 같은 수정란의 발달정지현상에 대한 원인은 명확히 밝혀져 있지 않으나,

이를 극복하기 위하여 많은 종류의 배양액과 배양방법 등 여러 측면에서 연구되어져 왔다. 그 결과 소 난자에 있어서는 단순 배양액(CR1aa : Rosenkrans와 First, 1991; CZB : Martino 등, 1996; SOF : Carolan 등, 1995), 체세포와의 공동배양(난구세포 : Fukuda 등, 1990; Goto 등, 1988), 난관상피세포(Eyeston과 First, 1989), 자궁내막세포(Marquand-Le 등, 1989), BRL세포(Rehman 등, 1994), Vero세포(Grocholova 등, 1995), 배양기의 산소분압(Tervit 등, 1972), 세포분화에 관여하는 성장촉진인자(Lee와 Fukui, 1995)등을 이용하여

이 논문은 1998학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

궁극적으로 체외에서 미성숙 난포란으로부터 배반포 단계까지 체외수정란을 생산하고 있다. 그러나 이러한 배양결과는 체내와 비교할 때 아직도 만족할만한 결과는 아니다. 소의 경우 체내에서 수정란으로부터 배반포 형성까지 발달하는데 요구되는 기간은 6.5일~7일 정도이지만, 체외의 경우 사용하는 배양액에 따라 약간의 차이는 있지만 대략 8일~9일 정도이다. 이와 같이 배양기간이 길어지면 불충분한 배양환경에 의한 난자의 손상때문에 양질의 배반포를 생산할 수 없으며(Husiman 등, 1994; Dokras 등, 1993), 나아가서 유전자 결함 등으로 인한 수정란이식 후 수태율 저하의 원인이 될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 체외에서 한우 난포란 유래의 배반포를 효율적으로 생산할 수 있는 기술 개발을 위하여 배양액의 종류, 배양방법, 배양기간별로 형성된 배반포의 수태율을 비교·검토함으로써 형성된 배반포의 질적 평가를 행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 배양액

본 연구에 사용된 기초배양액은 먼저 난소로부터 미성숙 난자를 회수하기 위한 배양액으로는 25mM HEPES와 3mg/ml BSA(Sigma, A6003)가 첨가된 TALP용액(HEPES-TALP), 미성숙 난자의 체외성숙용 배양액으로는 0.2mg/ml pyruvate(Sigma, P2256), 10% FBS(Gibco, Lot. No. 1013314), 1 $\mu$ g/ml FSH (Sigma, 14H0796)가 첨가된 TCM199(Gibco, 12340-030)용액을, 체외수정용 배양액으로는 10 $\mu$ g/ml heparin(Sigma, H3149)과 6mg/ml BSA가 첨가된 TALP용액(Fer-TALP)을 이용하였으며, 수정된 난자의 체외배양용 배양액으로는 10% human follicle fluid(hFF, 마리아블 임크리닉) 또는 10% hFF와 10% FBS가 함유된 TCM199, CR1aa(Rosenkrans와 First, 1991), YS(허 등, 1996)를 각각 비교·검토하였다.

### 2. 난포란의 회수 및 체외성숙

도축된 한우 난소들을 penicillin G와 streptomycin sulfate 등의 항생물질이 함유된 30~33 $^{\circ}$ C의

생리식염수가 들어있는 보온병에 담아, 도축후 2~4시간 이내 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 여러번 세척하고, 18gauge 주사침이 부착된 1회용 10ml 주사기를 이용하여 직경 2.0~5.0mm의 난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 회수한 난포란중 난구세포가 치밀하고 세포질이 균일한 것만을 실체현미경하에서 선별하여 50 $\mu$ l의 체외성숙용 배양액에서 15~20개씩의 난자를 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 난포란의 체외성숙을 유도하였다.

### 3. 성숙 난포란의 체외수정

먼저 정자를 처리한다. 축협으로부터 구입한 한우 동결정액 1~2개 straw를 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 30초간 흔들며 용해한 후, 15ml 원심분리관(Corning, 25310-15)에 담겨져 있는 80% percoll 3ml 용액위에 조심스럽게 놓는다. 2,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층부의 percoll 용액을 제거하여 하층부의 정자괴를 회수하고, Fer-TALP 용액으로 2회 원심분리(1,000 rpm, 10분)하여 정자를 세척하였다. 그리고 Fer-TALP 용액으로 정자농도가 2.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml 되도록 조절하여 체외수정용 정자로서 준비한다. 한편 형태적으로 체외성숙된 난포란만을 선별하여 0.03% hyaluronidase가 첨가된 HEPES-TALP 용액으로 처리하여 난구세포를 제거하고, 체외수정에 제공하였다. 그리고 실험의 목적에 따라 이 과정에서 얻어진 난구세포는 체외수정란과의 공배양에 제공하였다. 공배양용 난구세포는 강력한 pipetting에 의해 한 개씩으로 분리시켜 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록 500 $\mu$ l의 10% FBS 첨가 TCM199 용액이 담겨져 있는 4-well dish(Nunc, 176740)에 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양함으로써 준비하였다. 체외수정은 10~15개씩의 난포란이 함유된 46 $\mu$ l의 Fer-TALP 용액에 2 $\mu$ l의 heparin과 최종 정자농도가 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml가 되도록 미리 준비한 정자 2 $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

### 4. 체외배양

체외수정에 공시된 난포란중 형태적으로 정상인

것만을 회수·세척하여 10% hFF가 함유된 각각의 배양액(10~15개/50 $\mu$ l)으로 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양(day 1)하였다. 배양 3일(day 3)째에 4~8세포배를 10% hFF와 10% FBS가 함유된 각각의 배양액(500 $\mu$ l)으로 체외수정시 준비했던 공배양용 난구세포와 함께 배양하였다. 그리고 배양 5일째에는 각각의 신선 배양액으로 교환하여 배반포 또는 부화배반포까지의 배발생을 24시간 간격으로 관찰하였다.

### 5. 수정란의 이식

체외배양기간별로 형성된 배반포기 A 또는 B등급 2개의 배(양, 1998)를 10% FBS 함유 TCM199 용액을 이용하여 정액동결용 0.25ml straw에 넣은 후, 약 35 $^{\circ}$ C 상태로 유지하면서 이식장소까지 3시간 이내에 운반하였다. 수란우는 경북 경산군, 영천군, 의성·군위군, 상주군 일대의 일반 낙농가에서 사육되고 있는 경산 또는 미경산 Holstein대상으로 발정 및 직장검사로서 황체를 확인하여 정상적인 것을 선발하였다. 선발된 수란우는 인공수정을 실시하지 않고 발정 7.5일째에 황체가 존재하는 난소쪽의 자궁각 상단에 일반적인 방법(축산기술연구소 관행)으로 배반포를 이식하였다. 임신 여부는 이식 후 30일경에 재발정이 오지 않은 수란우를 대상으로 직장검사를 통하여 진단하였다.

### 6. 통계처리

실험결과에 대한 통계학적 분석은  $\chi^2$ -test를 이용

하여 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 체외성숙 및 체외수정된 한우 난포란의 체외발생

체외성숙 및 체외수정된 한우 난포란을 각각의 TCM199, CR1aa, YS배양액으로 난구세포와 공동 배양하여 배반포로의 배발생율을 검토했던 결과는 Table 1과 같다.

한우 난포란의 체외수정율(난분할율)은 배양액과 난구세포와의 공동배양과는 관계없이 70% 이상으로 유의차는 없었다. 4~8세포기까지의 배발생율은 YS구가 높았지만, 배양액간의 유의차는 인정되지 않았으며, 배양액간에 있었어도 난구세포와의 공동배양은 난구세포와 공동배양을 하지 않았을 경우(단순배양)보다 배발생율이 상승하는 경향이 있었다. 한편 배반포까지의 배발생율에 있어서 단순 배양인 경우 TCM199, CR1aa, YS구에서 각각 8.7%, 16.8%, 21.5%로서 YS구가 가장 높았으며, 각 구간의 유의차도 인정되었다( $p < 0.05$ ). 한편 공동 배양의 경우는 어떤 배양액에서도 단순배양의 배발생율이 상승하며, 특히 TCM199구와 CR1aa구에서는 유의하게 상승하였다( $p < 0.05$ ).

소 난포란유래 배의 배반포로의 배발생에 있어서 배를 난관상피세포, 난구세포, 섬유아세포, vero세포 등과 같은 체세포와 함께 공동배양을 행할 경우 발생율이 상승한다고 많은 학자들이 보고하고 있으

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

Culture media	Co-culture with cumulus cells*	No. of oocytes cultured	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of developed to	
				4~8 cell	Blastocyst
TCM199	-	413	303(73.4)	170(41.2)	36( 8.7) <sup>a</sup>
	+	851	667(78.4)	463(54.4)	133(15.6) <sup>b</sup>
CR1aa	-	483	340(70.4)	261(54.0)	81(16.8) <sup>b</sup>
	+	893	648(72.6)	601(67.3)	191(21.4) <sup>c</sup>
YS	-	520	382(73.5)	357(68.7)	112(21.5) <sup>c</sup>
	+	1,186	905(76.3)	765(64.5)	289(24.4) <sup>c</sup>

\* - : without, + : with

<sup>a,b,c</sup>: The values with different superscripts in the same column are significantly different,  $P < 0.05$ .

며, 본 실험에서도 증명되었다. 그리고 박 등(1992)은 난구세포를 제거하지 않은 난자의 배발생율은 난구세포를 제거한 난자의 배발생율보다 유의하게 높았다고 한다. 이상의 결과로부터 난자의 배발달에 있어서 난구세포의 역할은 완전히 밝혀져 있지는 않으나, 아마도 난자의 핵과 세포질 성숙유도 인자가 존재할 것이라고 사료된다(Lu 등, 1987; Fukui와 Ono, 1989). 따라서 배와 공동배양하는 체세포의 종류로서의 난구세포는 구입과 조작이 용이하며, 외부로부터 오염을 최대한 줄일 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 폭넓게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

한편 배양액의 종류에 따라 공동배양의 효과가 나타나지 않는 경우도 있다. 한 등(1994)은 젖소 난포란 유래 배의 배발생에 CR1aa용액을 이용할 경우 체세포와의 공동배양은 효과가 없었다고 보고하였다. 한우의 난포란을 이용한 본 실험에서는 단순 배양인 경우 CR1aa용액은 효과가 YS용액보다 없었다. 이것은 품종간의 차이에서 기인하는 것으로 사료되며, 또 YS용액에는 인산기가 적으며, 항산화

제로서 taurine이 첨가되어져 있기 때문에 CR1aa 용액에서의 결과보다 향상되었을 것이다.

## 2. 여러 종류의 배양액에서 배양기간에 따른 배반포 형성율

여러 종류의 배양액에서 난구세포와 공동배양하였을 경우 배양기간에 따라 형성되는 배반포 및 그 배반포의 부화율을 관찰한 결과는 Table 2와 같다.

배양기간에 따른 배반포의 형성은 배양액의 종류에 따라 차이가 있다. 비록 낮은 발달율이지만 배양 6일째(CR1aa구와 YS구)부터 형성되기 시작하여 배양 10일째까지 형성되었다. TCM199구의 경우는 배양 8일, 9일째에 각각 36.8%와 33.8%로서 비교적 높은 발달율을 형성하였으며, 배양 10일째에도 21.2%가 형성되었다. 그러나 CR1aa구와 YS구는 배양 7일(14.1%와 29.8%), 8일(54.5%와 45.3%)째에 집중적으로 형성되었으며, 특히 YS구는 이 시기에 전체의 75%가 형성되었다. 그리고 배양기간이 경과할수록 배반포의 형성은 현저히 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 배반포의 부화율은 배양

Table 2. Production of *in vitro* fertilized bovine embryos by culture duration and various culture medium

Culture medium	Culture duration (day)	No. (%) of blastocyst formation	No. (%) of blastocyst hatched
TCM199	6	0	0
	7	11(8.3)	8(72.7)
	8	49(36.8)	25(51.0)
	9	45(33.8)	22(48.9)
	10	28(21.1)	11(39.3)
	Total	133(100)	66(50.0)
CR1aa	6	4( 2.1)	2(50.0)
	7	27(14.1)	19(70.4)
	8	104(54.5)	47(45.2)
	9	33(17.3)	10(30.3)
	10	23(12.0)	6(26.1)
	Total	191(100)	84(44.0)
YS	6	24( 8.3)	16(66.7)
	7	86(29.8)	66(76.7)
	8	131(45.3)	62(47.3)
	9	34(11.8)	7(20.6)
	10	14( 4.8)	4(28.6)
	Total	289(100)	155(53.6)

액의 종류와는 관계없이 전반적으로 50%수준이었다. 그러나 배반포가 형성되는 배양기간과는 밀접한 관계가 있었다. 배반포가 형성되기 시작하는 배양기간으로부터 24시간 이내, 즉 TCM199구는 배양 7일과 8일, CR1aa구와 YS구는 각각 배양 6일과 7일째에 각각 형성된 배반포의 부화율은 50%이상이었으나, 이후에 형성된 것은 현저히 감소하였다.

이러한 결과로부터 어떠한 배양조건을 선택하더라도 양질의 배반포는 배양기간이 짧은 시간대에 형성된 배반포일 것이다. 그리고 Iwasaki 등(1990)은 체외성숙 및 체외수정 유래 배반포 중에서도 배반포까지의 발생속도가 빠른 것이 세포내 inner cell mass의 수가 많으므로 양질의 배반포라고 보고했던 것과 일치하였다.

### 3. 배양기간별로 형성된 배반포의 이식

YS용액으로 난구세포와 1주일간 공동배양하여 배양기간별로 형성된 한우 난포란 유래의 배반포 2개씩을 젖소의 자궁에 이식하여 그 임신율을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

총 134두의 젖소에 이식한 결과 53두(39.6%)가 임신하였다. 그러나 배양 7일과 8일에 형성된 배반포를 이용하였을 경우 각각 56.8%와 42.0%로서 평균보다 상승하였으며, 특히 배양 6일(15.4%)과 9-10일(18.5%)에 형성된 배반포의 임신율보다 각각 유의하게 상승하였다( $p < 0.05$ ).

Table 2에서 배반포의 품질은 배양기간이 짧을수록 양호하였으며, 이들 배의 태아로의 발생율도 높다는 것이 이식에서도 증명되었다. 그러나 Table 2에서 배양 6일째 형성된 배반포의 품질이 양호한 것으로 판정되었으나, 이식시 태아로의 발생율이 감소하는 것은 6.5일째의 발정주기인 수란우에 이식, 즉 발정주기가 일치하지 않았기 때문이라고 사료된다. 그리고 배양 9~10일째의 배반포는 확장배반포로의 발생이 시간적으로 지연되는 경향이 있기 때문에 이식시 확장배반포기 배가 이 시기 이전의 배반포기 배보다 태아로의 발생율이 높다고 생각된다. 또한 한 등(1994)은 체외수정란이식에 있어서 상실배기보다는 배반포, 그리고 배반포 중에서도 초기보다는 중기나 확장배반포가 태아로의 발생율이 높았다는 보고와 본 실험을 일치하였다. 또한 배

Table 3. Transfer to Holstein uterus of blastocysts were formationed according to culture duration in YS solution of IVM and IVF-derived bovine embryos

Culture duration (day)	No. of recipients	No. (%) of pregnant recipients
6	13	2(15.4) <sup>a</sup>
7	44	25(56.8) <sup>b</sup>
8	50	21(42.0) <sup>b</sup>
9~10	27	5(18.5) <sup>a</sup>
Total	134	53(39.6)

<sup>a,b,c</sup>: The values with different superscripts in the same column are significantly different,  $P < 0.05$ .

반포를 동결, 용해하였을 경우 생존율 및 부화율도 역시 확장, 중기, 초기배반포기 배의 순으로 나타난 것은 간접적이기는 하지만, 본 실험의 결과를 뒷받침한다. 따라서 체외수정란의 이식에 있어서 초기나 후기 배반포기 배보다는 중기나 확장배반포기 배를 이식하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 체외에서 한우 난포란 유래의 배반포를 효율적으로 생산할 수 있는 기술의 개발을 위하여 배양액의 종류, 배양방법, 배양기간별로 형성된 배반포의 수태율을 비교 검토하였다.

배양액으로는 YS용액, 난구세포와의 공동배양이 가장 효과적이었으며, 배반포가 배양 6~8일(수정란의 배양을 배양 1일)째에 형성된 것이 부화율이 높고, 양질의 배반포라고 인정하였다. 그리고 배양 7~8일에 형성된 배반포를 이식했을 때에 태아로의 발생율이 향상되었다.

따라서 본 연구로부터 양질의 배반포를 효율적으로 생산하기 위해서는 배양기간을 단축시킬 수 있는 배양액의 개발과 배양방법의 개선이 필요하다고 사료된다.

## 참고문헌

Arlotto T, Schwartz JL, First NL and Leibfried-

- Rutledge ML. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45:943-956.
- Ball GD, Leibfreid ML, Ax RL and First NL. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 67:2775-2785.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37:127-146
- Carolan C, Longergan P, Van Langendonck A and Mermillod D. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, 43:1115-1128.
- Del Campo MR, Donoso MX, Palasz AT, Garia A and Mapletoft RJ. 1993. The effects of days in co-culture on survival of deep frozen bovine IVF blastocysts. *Theriogenology*, 39:208.
- Eyeston, WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.*, 85:715-720.
- Farin CE, Hasler JF, Martus NS and Stockes JE. 1997. A comparison of Menezes's B2 and tissue culture medium-199 for *in vitro* production of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 48:699-709.
- Farin PW, Farin CE. 1995. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro* : survival and fetal development. *Biology reproduction*, 52:676-682.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 92:125-131.
- 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, Iwai N, Ide K, Takuma Y and Nakanishi Y. 1994. Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro* : comparison of cell-free culture with co-culture. *J. Reprod. Fertil.*, 100:239-243.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y and Nakanshi Y. Co-culture of cumulus cells with bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1149-1453.
- Goto K, Kakihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogaw K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* mature follicular oocytes. *J. Rep. Fert.*, 83: 753-758.
- Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H and Hyttel P. 1993. *In vitro* producing bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim. Reprod. Sci.*, 33:51-69.
- Grocholova R, Petr J, Marek J and Tepla O. 1995. Beneficial influence of vero cells on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 44:199-207.
- 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 Kubisch HM. 1996. Increasing the rate of blastocyst formation and hatching from *in vitro* produced bovine zygotes. *Theriogenology*, 46:961-969.
- Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD and Roberts RM. 1996. Comparison of co-culture and conditioned medium on expansion and hatching of *in vitro*-derived bovine blastocysts. *Theriogenology*, 43:233.

- van Inzen WG, van Stekelenburg-Hamers AEP, Weima SM, Kruip TAM, Bevers MM and Mummery CL. 1995. Culture of bovine embryos to blastocyst stage using buffalo rat liver(BRL) cells. *Theriogenology*, 43:723-738.
- Keeper CL, Stice SL and Maki-Laurila M. 1991. Bovine embryo development *in vitro*: effect of *in vitro* maturation conditions on fertilization and blastocyst development. *Theriogenology*, 37:229 abstr.
- Lee ES, Fujii Y and Fukui. 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 45:1151-1162.
- Lee ES and Fukui Y. 1995. Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 44:71-83.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ and First NL. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31:61-74.
- Li Z, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X and Godke RA. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 40:338-344.
- Lindenau A and Fisher B. 1994. Effects of oxygen concentration in the incubator's gas phase on the development of cultured preimplantation rabbit embryos. *Theriogenology*, 41:889-898.
- Linder GM and Wright Jr. RW. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20:407-416.
- Marquant-Le Guienne B, Gevard M, Solari A and Thibault C. 1989. *In vitro* culture of bovine eggs fertilized either *in vivo* or *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.*, 30:259-266.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction*, 54:1059-1069.
- Menezo YZR, Guerin JF and Czyba JC. 1990. Improvement of human early development *in vitro* by co-culture in monolayers of vero cells. *Biology of Reproduction*, 42:301-306.
- O'Doherty EM, Wade MG, Hill JL and Boland MP. 1997. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocyst. *Theriogenology*, 48:161-169.
- Overstr MEW. 1996. *In vitro* assessment of embryo viability. *Theriogenology*, 45:3-16.
- Park CK, Yuh IS and Kim CI. 1992. Early development bovine zygotes co-cultured with cumulus cells. *Korean J. Animal. Reprod.*, 16(4):311-316.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL and Leibfried-Rutledge ML. 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. *Biology of Reproduction*, 38:1171-1180.
- Rieger D, Loskutoff NM and Betteridge KJ. 1992. Developmentally regulated changes in the uptake & metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced *in vitro*. *Repro. Fertil.*, 4:547-557.
- Rosenkrans Jr. CF and First NL. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage : effects of amino acid and vitamins. *Theriogenology*, 35:266 abstr.
- Rosenkrans Jr. CF, Zerg GZ, Schoff PK and First NL. 1990. A simple medium for *in vitro* development of bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, 68(Suppl):430 abstr.

- Shioya Y, Kuwayama M, Fukúshima M and Iwasaki S. 1998. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. *Theriogenology*, 30:489-494.
- Suh TW. 1995. Co-culture with buffalo rat liver (BRL) cell for IVM-IVF bovine embryos. *Korean J. Animal. Reprod.*, 18(4):257-263.
- Tan SJ and Lu KH. 1990. Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 33:335 abst.
- Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 30:493-497.
- Utsumi K, Katoh H and Irtani A. 1988. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 29:320 abst.
- 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.*, 30:330-338.
- Xu KE, Pollard AJW, 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*, 33:351 abst.
- Yang X, Jiang S and Foote RH. 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol. Reprod.*, 34:94-100.
- 김상근, 이종진. 1995. 돼지 분할 초기배와 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포와의 공배양이 생존율에 미치는 영향에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 19(2):135-140.
- 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 광대오, 이효종, 최상용. 1994. 체외성숙, 수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우이식에 의한 산자 생산. *한국가축번식학회지*, 18(1):47-54.
- 양병철. 1998. 소 수정란 이식. *축산기술연구소(정기간행물 31255-51890-57-9801)*. 95-124
- 오성종, 양보석, 이명식, 백광수, 성관후, 정진관, 임경순. 1995. 직접이식을 위한 소 체외 수정란의 동결 용해후 생존성 및 수태율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 19(1):49-54.
- 윤산현, 김은영, 조현진, 윤혜균, 이원돈, 임진호. 1994. 배양액조성과 첨가제가 인간 수정란의 체외발생에 미치는 영향. *추계 산부인과학회*.
- 이명식, 박수봉, 박진기, 장원경, 민관식, 백광수, 성관후, 박용윤. 1998. 소 체외수정란의 발생 배양에 적합한 배양환경 조성 연구. *한국가축번식학회지*, 22(1):95-99.
- 이재관, 윤준진, 황성수, 윤종택, 김창근, 정영채. 1998. 공배양 및 산소농도가 한우 난포란의 체외발생에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 22(1):43-50.
- 한용만, 이철상, 이정호, 김선정, 신상태, 김동훈, 이훈택, 정병현, 정길생, 김영수, 김영훈, 이근세, 김교국, 황윤식, 이경광. 1994. 체외수정란 유래의 송아지 생산. *한국가축번식학회지*, 18(1):7-13.
- 허용수, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 윤혜진, 이석원, 김은영, 박세필, 이성구, 이원돈, 임진호. 1996. IVF-ET Programm에서 blastocyst 수정란 발생에 관한 연구. 1. Glucose와 Phosphate를 함유하지 않은 배양액에서 blastocyst 수정란의 발생. *대한불임학회지*, 23. 155-161.

(접수일 : 1999. 1. 29 / 채택일자 : 1999. 3. 19)