

난소의 형태와 배양 용기가 한우 체외수정란의 발달과 세포수에 미치는 영향

박용수[†] · 박흡대

대구대학교 식품생명공학부

초 록

본 연구는 한우 수정란의 체외생산에 있어서 효율과 품질의 향상을 위해서, 미성숙 난포란을 회수하는 난소의 형태와 배양 용기로서 straw의 효과를 검토하였다. 난소의 형태에 따른 수정율은 전 군에서 70.3~84.1%로서 비슷한 경향이였다. 8세포기 및 배반포기 발달율은 황체와 난포가 모두 존재하지 않는 대조군이 가장 높았다. 배반포의 inner cell mass(ICM), trophectoderm(TE), total cell number(TCN) 및 ICM/TCN 비율은 낭종군과 퇴행황체군이 다른 군에 비하여 높은 경향이였다. 체외성숙에 이용하는 배양용기에 따른 수정율은 0.5 ml straw 군이, 8세포기 발달율은 대조군이 가장 높았으나, 배반포기 발달율은 23.1~30.7%로서 각 군 간에 비슷한 경향이였다. 한편 각각의 배양 용기에서 유래된 배반포의 ICM, TE, TCN 및 ICM/TCN 비율은 유사한 경향이였다.

(주제어 : *In vitro* maturation, Ovary, Straw, Embryo development, Cell number)

서 론

소의 난소로부터 회수된 미성숙 난포란은 일반적으로 혈청과 성선자극호르몬이 첨가된 TCM199 배지에서 체외 성숙이 유도되며(Fukui와 Ono, 1989), 제공된 난자의 약 90%가 성숙되어지며 이중 70~75%가 정상적인 수정과정을 거쳐서 2-세포기에 도달한다(Watson 등, 2000). 이후 5~7일간의 배양과정을 통하여 체외에서 수정된 수정란의 20~30%만이 이식 가능한 배반포까지 발달한다(Loneragan 등, 2003). 그러나 지금까지의 연구에도 불구하고 체외 성숙된 난자의 배 발생이 저조한 것은 난포란의 핵 성숙 및 세포질 성숙이 체내에서와 같이 정상적으로 일어나지 않기 때문이다(Iwasaki 등, 1990).

체외성숙에 제공되는 미성숙 난포란은 난소의 형태적 특징이나 생리주기에 관계없이 무작위로 채취하여 2~8 mm의 가시난포로부터 회수한다. 한편 난포의 크기가 증가할수록 난포란의 핵성숙과 수정율이 증가하지만(Fuhrer 등, 1989; Lonergan 등, 1992), 우세난포가 성장하면 나머지 난포들은 위축이 진행되므로(Adams 등, 1994; Ko 등, 1991) 우세난포가 존재하는 생리주기의 난소에서 회수한 난포란은 발달율이 낮다(Machatkova 등, 1996). 그러나 현재 도축소에서 채취하여 체외수정란 생산에 제공되는 난소는 그 생리주기를 알 수 없으므로, 난소에 존재하는 황체와 난포를 형태학적으로 분류하여 난포란을 회수한다면 보다 품질이 우수한 배반포의 생산이 가능하고 나아가서 발생 능력을 가진 난포란을 조기에 선발할 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 한우 수정란의 체외생산 효율과 품질의 향상을 위해서, 도축 소 난소의 형태 및 성숙에 사용되는 배양용기가 배 발생과 배반포의 세포수에 미치는 효과

를 검토하였다.

재료 및 방법

배 지

난소로부터 미성숙 난포란의 회수용 배지는 10mM HEPES와 3 mg/ml bovine serum albumin(BSA: Sigma, A-9647)이 첨가된 TALP(HEPES-TALP) 용액이다. 난포란의 체외성숙용 배지는 0.22 mg/ml pyruvate(Sigma, P-5280), 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco, 16000-044), 1 mg/ml follicle stimulating hormone(Sigma, F-8174), 10 µg/ml luteinizing hormone(Sigma, L-9773), 10 mg/ml heparin (Sigma, H-3149)이 각각 첨가된 TCM199(Gibco, 12340-030)이다. 체외수정용 배지는 6 mg/ml BSA(Sigma, A-6003) 및 10 mg/ml heparin (Sigma, H-3149)이 첨가된 IVF-TALP 용액이며, 정자처리용 배지는 3 mg/ml fraction V BSA (Sigma, A-9647)가 첨가된 Sperm-TALP 용액이다. 한편 체외 배양용 배지는 3 mg/ml BSA 또는 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액이다. 그리고 실험에 제공되는 모든 배지는 39 °C, 5% CO₂ 배양기에서 최소한 4시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

난포란의 회수 및 체외성

도축 한우에서 난소를 적출하여 25 µg/ml gentamycin (Sigma, G1264)이 첨가된 0.9% 생리식염수(25~28 °C)가 들어있는 보온병에 담아 3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 수집된 난소는 penicillin G(Sigma, P3032)가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하여, 18G 주사침이 부착된 10 ml 주

[†] Corresponding author : Dr. Yong Soo Park, Kyoungbuk Livestock Research Institute, Youngju, Kyoungbuk. TEL : +82-53-638-6012, E-mail : pys0112@chollian.net

사기를 이용하여 직경 2~8 mm의 가시난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 실체현미경하에서 난구세포의 부착상태가 치밀한 것만을 선별하여, 50 μ l의 체외성숙용 배지에 15개 난포란을 옮겨 20시간 동안 39°C, 5% CO₂ 배양기에 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

1) 난소의 형태

대조군은 난포와 황체가 없는 난소에서 미성숙 난포란을 회수하였고, 실험군은 각각 Dominant follicle(DF), Corpus luteum(CL), Regressive CL(RCL), Pregnant CL (PCL) 및 Follicular cystic(FC)를 가진 난소에서 미성숙 난포란을 각각 회수하였다. 난포는 크기가 20 mm이하는 DF로, 25 mm 이상은 FC 난포로 각각 분류하였다.

2) 배양용기

체외성숙용 용기는 각각 대조군은 petri dish(NUNC)를, 실험군은 0.25 ml 또는 0.5 ml straw(FHK)를 이용하였다. 대조군은 50 μ l 미세소적에 미성숙 난포란을 15개씩 첨가하여 체외성숙을 유도하였다. 한편 실험군은 0.25 ml 또는 0.5 ml straw에 체외성숙용 배지와 미성숙 난포란 15개씩을 함께 주입하여 체외성숙을 유도하였다.

체외수정

한우 동결정액 1개(KPN388)를 실온에서 10초간, 37°C의 항온수조에서 30초간 처리하여 용해한 후 90% percoll (Sigma, P4937) 2 ml 용액이 담겨져 있는 15 ml 원심분리관 (Corning, 430052)에 살며시 놓은 후 700g에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하여, 2 ml Sperm-TALP 용액으로 350g에서 다시 10분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 정자농도는 25×10^6 spermatozoa/ml가 되도록 조절하여, 난포란이 함유되어 있는 46 μ l의 체외수정용 배지에 heparin 2 μ l와 정자 2 μ l를 첨가(최종 정자농도 1×10^6 spermatozoa/ml) 하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에 20시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

체외배양

체외수정된 수정란(배양 1일)은 3 mg/ml BSA가 첨가된 체외배양용 배지로 2회 세척한 후 미리 준비한 20 μ l 배지에 20개씩 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 배양 3 및 5일째에 10% FBS가 첨가된 체외배양용 배지로 교환하여 배양하였다.

배반포의 이중형광염색

배반포의 세포수를 측정하기 위하여 propidium iodide (Sigma, P-4170; PI)와 bisBenzimide (Sigma, B-2261)를 사용하여 이중형광염색을 실시하였다. 배반포의 투명대를 0.5% protease(Sigma, P-6911) 용액으로 5분간 처리하여 용해시킨 후 HEPES-TALP 용액으로 3회 세척하였다. 그리고 rabbit antbovine whole serum(Sigma, B-8270)이 1:5로 희석된 HEPES-TALP 용액에서 1시간 배양한 후 HEPES-TALP 용액에 1:10으로 희석된 guinea pig complement (Sigma, S-1639, PI와 bisBenzimide가 각각 4 μ g/ml 첨가)에 1시간 처리하여 염색하였다. 염색된 배반포를 5분간 HEPES-TALP 용액으로 세척한 후, slide glass에 whole mount하여 형광현미경(Olympus, Japan) 하에서 배반포의 inner cell mass(ICM)와 trophectoderm(TE) 세포수를 각각 조사하였다.

통계처리

실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test와 SPSS 10.0 프로그램 이용한 일원배치 분산분석을 통한 Duncan's test를 실시하였으며, 유의차는 $p < .05$ 수준에서 검정하였다.

결 과

난소의 형태

체외성숙에 제공되는 난소의 형태가 미성숙 난포란의 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 수정율(≥ 2 cell)은 대조군이 84.1%로서 가장 높았으나, 실험군의 70.3~78.3%와는 차이가 없었다. 8세포기까지 발달율은

Table 1. Effects of the morphological statuses of ovaries on the subsequent development of Korean Native Cow oocytes

Morphology	No.	No. (%) of oocytes developed to		
		≥ 2 cell	8cell	Blastocyst
Control ¹⁾	265	223(84.1)	137(51.6) ^a	57(21.5) ^a
FC ²⁾	135	95(70.3)	50(37.0) ^b	17(12.5) ^b
CL ³⁾	344	261(75.8)	158(45.9) ^{ab}	68(19.7) ^{ab}
RCL ⁴⁾	501	391(78.0)	230(45.9) ^{ab}	76(15.1) ^b
PCL ⁵⁾	208	156(75.0)	92(44.2) ^{ab}	28(13.4) ^b
DF ⁶⁾	560	409(73.0)	243(43.3) ^b	110(19.6) ^{ab}

^{ab}: Values within column with different superscript differ ($p < 0.05$).

¹⁾ Control: Without corpus luteum and follicle. ²⁾ FC: Follicular cyst. ³⁾ CL: Corpus luteum. ⁴⁾ RCL: Regressive corpus luteum.

⁵⁾ PCL: Pregnancy corpus luteum. ⁶⁾ DF: Dominant follicle.

Table 2. Effect of the morphological statuses of ovaries on the number of inner cell mass(ICM), trophoctoderm(TE) and total cell of Korean Native Cow blastocysts

Morphology	No.	No. of cells			ICM/TCN (%)
		ICM ¹⁾	TE ²⁾	TCN ³⁾	
Contro ⁴⁾	16	33.5±14.0 ^{ab}	102.5±19.2 ^a	136.0±29.2 ^a	24.0± 6.7 ^{ab}
FC ⁵⁾	16	40.3±13.1 ^a	100.0±33.3 ^a	140.4±29.4 ^a	30.5±13.3 ^a
CL ⁶⁾	16	18.9±12.1 ^c	109.9±33.0 ^a	128.8±33.5 ^{ab}	14.8± 7.6 ^c
RCL ⁷⁾	16	41.8±18.2 ^a	97.8±17.5 ^a	136.7±29.4 ^a	30.0± 9.2 ^a
PCL ⁸⁾	16	30.6±26.2 ^{ab}	74.1±28.4 ^b	105.3±29.5 ^b	27.8±19.7 ^{ab}
DF ⁹⁾	16	24.6±10.7 ^{bc}	91.6±41.1 ^{ab}	116.3±45.7 ^{ab}	19.9± 8.4 ^{bc}

^{a,b,c} Values within column with different superscript differ($p < 0.05$). Mean±SD.

¹⁾ ICM: Inner cell mass. ²⁾ TE: Trophoctoderm. ³⁾ TCN: Total cell number. ⁴⁾ Control: Without corpus luteum and follicle.

⁵⁾ FC: Follicular cyst. ⁶⁾ CL: Corpus luteum. ⁷⁾ RCL: Regressive corpus luteum. ⁸⁾ PCL: Pregnancy corpus luteum. ⁹⁾ DF: Dominant follicle.

Table 3. Effect of the vessels for *in vitro* maturation on the development of Korean Native Cow oocytes

Vessels	No.	No. (%) of oocytes developed to		
		≥ 2 cell	8 cell	Blastocyst
Control	210	152(72.3) ^{ab}	111(52.8) ^a	56(26.6)
0.25 ml straw	195	127(65.1) ^b	84(43.1) ^b	45(23.1)
0.5 ml straw	195	145(74.3) ^a	99(50.7) ^{ab}	60(30.7)

^{ab}: Values within column with different superscript differ($p < 0.05$).

대조군이 51.5%로서 FC군의 37% 및 DF군의 43.3%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편 배반포까지 발달율은 대조군(21.5%)이 FC군(12.5%), RCL군(15.1%) 및 PCL군(13.4%)보다 유의하게 높았다.

체외성숙에 제공되는 난소의 형태에 따라 회수된 미성숙 난포란에서 유래된 배반포의 세포수를 검토한 결과는 Table 2와 같다. ICM 세포수는 FC군과 RCL군이 각각 평균 40.3 및 41.8개로서 CL군과 DF군의 각각 평균 18.9 및 24.6개보다 유의하게 많았다($p < 0.05$). TE 세포수는 대조군, FC, CL 및 RCL군의 평균 97.8~109.9개로서 PCL군의 평균 74.1개와 유의차가 인정되었다($p < 0.05$). 총 세포수는 대조군, FC 및 RCL군이 평균 136.0~140.4개로서 PCL군의 평균 105.3개보다 유의하게 많았다($p < 0.05$). 한편 ICM/

TCN 비율은 FC군(30.5%) 및 RCL군(30.0%)이 CL군(평균 14.8%)과 DF군(평균 19.9%)보다는 유의하게 높은 경향이 있었다($p < 0.05$).

배양용기

체외성숙 시 배양용기로서 동결용 straw가 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다. 수정율은 0.5 ml straw 군이 74.3%로서 0.25 ml straw의 65.1%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 그러나 8세포기까지 발달율은 대조군이 52.8%로서 0.25 ml straw 군의 43.1%와 유의차가 인정되었다($p < 0.05$). 배반포기까지 발달율은 23.1~30.7%로서 각 군 간에 유사한 경향이였다.

Table 4. Effect of container used for *in vitro* maturation on the number of inner cell mass(ICM), trophoctoderm(TE) and total cells of Korean Native Cow blastocysts

Vessels	No.	No. of cells			ICM/TCN (%)
		ICM ¹⁾	TE ²⁾	TCN ³⁾	
Control	12	26.3± 4.3	75.0±18.4	101.3±16.2	26.8± 7.4
0.25 ml straw	12	36.1±25.0	72.8±14.5	109.0±32.3	30.7±11.2
0.5 ml straw	12	35.3±11.4	86.5±21.7	121.7±21.5	29.0±10.7

¹⁾ ICM: Inner cell mass. ²⁾ TE: Trophoctoderm. ³⁾ TCN: Total cell number.

체외성숙 시 배양용기로써 동결용 straw가 배반포의 세포수에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 4와 같다. ICM 세포수는 대조군, 0.25 ml straw 및 0.5 ml straw 군에서 각각 평균 26.3, 36.1 및 35.3개로서 비슷한 경향이었다. TE 세포수는 평균 72.8~86.5개, TCN은 101.3~121.7개로서 각 군 간에 유사한 경향이었다. 한편 ICM/TCN 비율은 0.25 ml straw 군이 30.7%로서 가장 높았으나, 유의차는 인정되지 않았다.

고 찰

본 연구는 한우 수정란의 체외생산에 있어서, 난소의 형태적 분류와 성숙 용기로써의 straw가 배 발달과 배반포의 세포수 측면에서의 품질에 미치는 효과를 검토하였다.

Leibfried와 First(1979)는 생리 주기에 따라 회수된 미성숙 난포란의 핵성숙율은 차이가 없었으나, Machatkova 등(1996)은 luteal phase의 난소에서 회수한 난포란의 배반포 발달율이 높았다. Karja 등(2002)은 cat에서 inactive 또는 luteal stage 보다 follicular stage의 난소에서 회수한 미성숙 난포란의 배 발달율이 낮았다. 그러나 Freistedt 등(2001)은 inactive stage에 비하여 luteal과 follicular stage 유래의 난포란의 발달율이 높았다. 한편 Varisanga 등(1998)은 CL이 존재하거나 DF가 존재하지 않는 난소에서 회수한 난포란의 발달율이 높은 경향이었다. 그러나 본 연구에서는 황체와 난포가 모두 존재하지 않는 inactive stage의 난소에서 회수한 난포란의 발달율이 가장 높았다(Table 1). 한편 Varisanga 등(1998)은 DF가 존재하는 난소로부터 유래한 난포란의 배반포 발달율이 낮았으나, 본 연구에서는 차이가 없었다. Monniaux 등(1997)은 DF를 가진 난소에서 회수한 난포란의 발달율이 낮았고, 이것은 FSH 농도의 감소로 인한 estradiol과 inhibin의 상승으로 subordinate follicle의 퇴행이 유도되기 때문이라고 하였다. 또한 본 연구에서 FC, RCL 및 PCL 단계의 난소에서 회수한 난포란의 발달율이 낮은 경향인 것은 소 번식장애의 하나인 낭종 또는 임신 중에 있는 난소에서 채취한 난포란의 배 발생능이 다른 단계의 난소에 비하여 낮기 때문이다(손 등, 1999).

Pampfer 등(1994), Papaioannou와 Ebert(1988) 및 Du 등(1996)은 난소의 형태에 따라 배양한 배반포의 세포수는 황체와 난포가 모두 존재하지 않는 난소에서 유래된 것이 가장 높은 ICM/TCM 비율을 가지고 있었다. 그러나 본 연구(Table 2)에서는 FC군 및 RCL군의 ICM/TCN 비율이 높은 경향으로 이전의 연구와는 차이가 있었다. 이상의 결과에서 체외수정란의 생산에 제공하는 난소의 형태가 난포란의 배 발달 능력과 관련이 있으므로, 도축 난소를 황체와 난포의 형태에 따라 구분하는 것이 배 발달의 효율성을 높일 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 배반포의 세포수 측면에서의 품질은 배 발달율과는 반대의 결과를 나타내어 앞으로 추가적인 연구가 필요할 것이다.

인간에서 5 ml test tube, 4 well dish, straw 및 microdrop법을 이용한 체외수정란이 보고되었고, 특히 정자 동결에 이용하는 straw가 인간(van der Ven 등, 1989; Ranoux와 Seibel, 1990; Hammitt 등, 1991)과 porcine(Li 등, 2003)의 체외수정에 효과적이었다. Lu 등(1999) 및 Boone와 Shapiro(1990)은 bovine과 mouse의 배 배양에서 petri dish

가 4-well plates 보다 더 많은 독소를 발생한다고 하였고, petri dish 배양에서는 배지의 volume에 따라 차이가 많았다. 그러나 이전의 연구에도 불구하고 체외수정을 비롯한 체외성숙 및 체외배양에 널리 이용되면서 가장 효과적인 방법은 petri dish에서의 microdrop법이다(Trounson과 Gardner, 2000). 한편 microdrop법은 mineral oil로 피복되어 수정란이 조작되므로 oil의 오염과 배양 이전에 평형에 비교적 많은 시간이 소요되는 단점이 있다(Trounson과 Gardner, 2000). 본 연구(Table 3, 4)에서 체외성숙 용기로써 dish와 straw는 배 발달과 세포수가 유사한 경향이었으나, 0.5 ml straw 군의 수정율과 배반포 발달율이 0.25 ml straw 군에 비하여 다소 높은 경향인 것은 난포란의 체외성숙에는 물질의 이동과 대사에 적절한 공간이 필요하기 때문일 것이다(Rieger과 Loskutoff, 1994; Roberts 등, 2002). 따라서 소 난포란의 체외성숙에는 배양 용기에 따른 효과가 없는 것을 판단되지만, 체외수정과 배양에 대한 추가적인 검토는 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 소 미성숙 난포란의 체외 발달과 품질을 향상시키기 위해서는 먼저 도축장에서 수집하는 난소의 선발이 선행되어야 할 것으로 생각되며, 적절한 배양용기의 선정도 필요하다고 사료된다.

Effects of the Morphology of Ovaries and Vessels for *In Vitro* Maturation on the Development and Cell Number of Korean Native Cow Embryos

Park, Y. S. and H. D. Park

Division of Food and Biotechnology, Daegu University

ABSTRACT

The aim of this study was to improve efficiency and quality of the production of Korean Native Cow embryos. We examined effects of ovarian morphology and maturation vessel on the development and cell number of blastocysts. The development rates to the 2-cell embryos from oocytes collected from the ovaries of different morphological statues were similar ranging between 70.3 and 84.1%. The development rate to the 8 cell- and blastocyst-stage embryos was the highest in the group without both corpus luteum (CL) and follicle. The inner cell mass (ICM), trophoctoderm (TE) and total cell number (TCN) were significantly higher in the groups of follicular cyst and regressive CL than other treatment groups, and the same pattern was observed in the ICM/TCN ratio. The development rate to the 2-cell stage was significantly higher in 0.5-ml straw group than 0.25-ml straw group. However, the development rates to the blastocyst stage were similar between the dish and the straw group. There were no differences in the number of ICM and TE cells, TCN and ICM/TCN ratio of blastocysts from oocytes matured in the different vessels.

(Key words : *In vitro* maturation, Ovary, Straw, Embryo development, Cell number)

인용문헌

1. Adams G, Nasser L, Bo G, Garcia A, Del Campo M, Mapletoft R (1994): Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 42:1103-1113.
2. Boone WR, Shapiro SS (1990): Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory. *Theriogenology* 33: 23-50.
3. Du F, Looney CR, Yang X (1996): Evaluation of bovine embryos produced *in vitro* vs. *in vivo* by differential staining of inner cell mass and trophoctodrum cells. *Theriogenology* 45:211(abstr).
4. Freistedt P, Stojkovic M, Wolf E (2001): Efficient *in vitro* production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effect of season and ovarian status. *Biol Reprod* 65:9-13.
5. Fuhrer F, Mayr B, Schellander K, Kalat M, Schleger W (1989): Maturation competence and chromatin behavior in growing and fully grown cattle oocytes. *J Vet Med Ser A* 36:285-291.
6. Fukui Y, Ono H (1989): Effects sera, hormone and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 86:501-506.
7. Hammitt DG, Walker DL, Syrop CH, Miler TM, Bennett MR (1991): Treatment of sever mala-factor infertility with high concntrations of motile sperm by microinsemination in embryo cryopreservation straws. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 8:101-110.
8. Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T (1990): Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fertil* 90:279-84.
9. Karja NWK, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T (2002): *In vitro* maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology* 57:2289-2298.
10. Ko J, Kastelic J, Del Campo M, Ginther O (1991): Effect of a dominant follicle on ovarian follicular dyanmics during oestrus cycle in heifers. *J Reprod Fertil* 91:511-519.
11. Leibfried L, First NL (1979): Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 48:76-86.
12. Li YH, Ma W, Li M, Hou L, Jiao LH, Wang WH (2003): Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new *in vitro* fertilization (IVF) system: Straw IVF. *Biol Reprod* 69:1580-1585.
13. Lonergan P, Sharif H, Monaghan P, Wahid H, Gallagher M, Gordon I (1992): Effect of follicle size of bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology* 37:248 (abstr).
14. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP (2003): Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Dom Anim* 38:259-267.
15. Lu SS, Wade MG, Kelly G (1999): Effects of taurine, glutamine and culture dishes on the *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology* 51: 244 (abstr).
16. Machatkova M, Jokesova E, Petelikova, Dvoracek V (1996): Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrus cycle. *Theriogenology* 45:801-810.
17. Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C (1997): Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 5:3-23.
18. Pampfer S, Wu YD, Vanderheyden I, De Hertogh R (1994): Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) receptors and selective effect of TNF alpha on the inner cell mass on mouse blastocysts. *Endocrinology* 134:206-212.
19. Papaioannou VE, Ebert KM (1988): The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophoctoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* 102:793-803.
20. Ranoux C, Seibel MM (1990): New techniques in fertilization: intravaginal culture and microvolume straw. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 7:6-8.
21. Rieger D, Loskutoff NM (1994): Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 100:257-262.
22. Roberts R, Franks S, Hardy K (2002): Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum Reprod* 17:2950-2956.
23. Trounson AO, Gardner DK (2000): Assessment of embryo metabolism. In: *Handbook of in vitro fertilization*, CRC press, New York, USA, pp 347-372.
24. Van der Ven HH, Hoebbel K, Al-Hasani S, Diedrich K, Kerbs D (1989): Fertilization of oocytes in capillary tubes with very small numbers of spermatozoa. *Hum Reprod* 4:72-76.
25. Varisanga MD, Sumantri C, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T (1998): Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos. *Theriogenology* 50:1015-1023.
26. Watson AJ, Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME (2000): Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod* 62:355-364.
27. 손창호, 강병규, 최한선, 강현구, 임원호, 박상국, 오기석, 서국현 (1999): 초음파검사에 의한 소의 번식장애 감별진단 및 치료법 개발 II. 도축우에서 난소낭종의 감별진단. *한국임상수의학회지* 16:138-144.
(접수일자: 2005. 3. 5. / 채택일자: 2005. 3. 25.)