

소 및 家兔에 있어서 Chamber內 受精에 관한 研究

金 明 哲

忠南大學校 農科大學 獸醫學科

Studies on the In Chamber Fertilization in Cattle and Rabbit

Myung Cheol Kim

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture,
Chungnam National University, Taejon

Summary

Hydrogel chambers made from polymerized 2-hydroxyethyl methacrylate were used for in chamber fertilization.

To determine whether sperm motility was preserved in the Hydrogel chamber, chambers which have rabbit sperm or frozen-thawed bovine sperm were transplanted inside of mouse peritoneal cavity and sperm were observed after recovering the chambers in the due time. As a result, it was determined that preservation of sperm motility was good.

To determine whether in chamber fertilization was possible, chambers which have rabbit oocytes and sperm were transplanted inside of mouse peritoneal cavity and eggs were observed after recovering the chambers at 84 hr of preservation. As a result, the fact that fertilization and culture was occurred inside of the chamber was determined.

緒 論

체외수정이란 난자와 정자를 체외에서 배양하여 수정시키는 것을 말하며, 이 경우에 수정이 성립되기 위해서는 정자의 수정능력회복과 침체반응, 신선한 난자, 고원력의 정자, 난관내의 환경과 비슷한 배양조건등이 필요하다.

체외수정에 관한 연구로는, 1965년에 Brinster 및 Biggers가 mouse의 난자를 이용한 체외수정에 대해 발표한 이래로 1968년에는 Whittingham이, 1970년에는 Sreenan등의 많은 연구자들에 의해서 이에 관한 보고가 있었으며, Brachett는 1981년 소에서 체외수정에 의한 방법으로 송아지를 분만시키는데 성공하였다.

한편 국내에서는 1981년부터 대가축을 중심으로

하여 수정란이식이 시도된 이래(고등, 1981;이등, 1982;정등, 1983;석등, 1983), 체외수정에 관한 연구도 시도되었으나(임등, 1984;김등, 1986;정등, 1986;구등, 1986), 아직은 초보단계에서 탈피하지 못한 실정으로 이 기술이 국내에 정착이 되기까지는 많은 연구와 노력이 필요할 것으로 사료된다.

난모세포가 1차유사분열을 완성하기 위해서는 광동형성이 되어야 하며(Lindner 등, 1980), 난모세포가 그들의 발육을 거의 완성시키야 한다(난모세포 직경 77-78 μm). 난모세포 성숙의 과정은 응성 전핵 발육인자를 생성하는 세포질 내부의 변화를 포함한다(Thibault 등, 1975). 난포강으로부터 방출되는 난구-난모세포 복합체는 제 1 유사분열을 완성시키기 24시간전에 요구되는(Leibfried 및 First, 1979), 자발적인 핵의 성숙을 일으킨다(Motlik 및

본 연구는 한국과학재단의 지원에 의한 Post-Doc 연구결과의 일부임.

Fulka, 1986).

체외에서 성숙된 소의 난관을 수정시키려는 노력은 다양하게 성공되었다(Sreenan, 1970; Shea 등, 1976; Iritani 및 Niwa, 1977; Trounson 등, 1977). 배양조건을 적절히 하면 체외수정의 성공을 증가시킨다(Ball 등, 1983; Lenz 등, 1983). 최근에는 체외성숙된 소의 난모세포를 냉동-융해된 소의 정액과 수정시키는 방법이 발달되었다(Parrish 등, 1986). 또한 체내성숙 또는 체외성숙된 난모세포로 임신이 이루어졌다(Brackett 등, 1982; Sirard 및 Lambert, 1985; Parrish 등, 1986).

Polymerized Hema (pHema) 는 인체의학에서는 임상적용에 오랜 역사를 갖고 있는(Ratner, 1981), 반복명함, 확산성의, 생체에 사용할 수 있는, 그리고 생체에 해를 미치지 않는 hydrogel이다. 또한 Hema는 어떠한 형태 또는 크기에서도 수형되며, 쉽게重合된다(Ratner, 1981; Pinehuk 및 Eckstein, 1981; Lee 등, 1978).

한편 pHema chamber를 사용한 胚의 배양 및 분리된 割球의 배양이 이루어졌다(Pollard 및 Pineda, 1988; Pollard, 1987). 그 동안 체외수정에 관한 연구는 많이 이루어졌으나(Bavister, 1981; Bavister 및 Yanagimachi, 1977; Bousquet 및 Brackett, 1982; Leibfrid 및 Bavister, 1983), 아직 agar chip을 이용한 체외수정에 관한 보고는 접한 바 없다. 이에 저자는 pHema chamber를 이용한 체외수정을 시도하게 되었다.

材料 및 方法

1. Hydrogel chambers

Hydrogel chamber는 monomer로서 lowacid Hema를, cross linkers로서는 tetraethylene glycol dimethacrylate(TGD), ethylene glycol(EG)를 사용하였다(Polysciences, Inc., Warrington, PA). Chamber를 수형하기 위하여, 3개의 용액을 준비하고 주사기침관에 위치시켰다: 용액 A-10ml의 Hema, 0.1ml TGD, 3.0ml EG 및 2.0ml 증류수의 혼합물; 용액 B-증류수 100ml에 40g을 용해한 1.0ml ammonium persulfate(initiator); 용액 C-증류수 100ml에 15g을 용해한 1.0ml sodium metabisulfite(coiniaor). 각 용액은 질소로 15분간 purge하고, 반응제를 온

함하여 암리학에 중합하였다(Ratner, 1981). Hydrogel chamber는 71mm 길이, 3.5mm 직경의 0.5ml 인슐린주사기(No. 8471, single use, plastipak LO-dose U-100; Becton Dickinson, NJ)를 실온에서 사용하여 수형하였다. 주사침은 제거하고, syringe로부터 plunger를 꺼내어, plunger 끝에 있는 gasket를 분리하여 다시 정모지기 주입지킴으로써, plunger에 접해 있던 gasket의 부분이 주사기 내강을 향하게 하고, 전도된 gasket를 주사기의 50 unit mark에 위치시켰다. 1.5ml의 용액 A, 0.1ml의 용액 B 및 0.1ml의 용액 C를 3ml의 polyethylene syringe내에서 혼합시켜서 수형 인슐린주사기에 주입시켰다. 인슐린주사기에 0.5ml의 중합혼합물을 채운 직후에 1.7mm 직경의 Teflon tubing(Cole Parmer International, Chicago, IL)을 끼운, 5.6cm 길이의, 0.9mm 직경의 stainless steel rod를 주사침연결부분을 통하여 통과시켜서, 반응제 혼합물을 거쳐서 gasket에 삽입시켜서 polymerizing gel이 hollow chamber를 형성하도록 하였다. Steel rod가 들어있는 Teflon tubing을 주사침연결부분과 gasket의 내강에 의해서 barrel의 중심에 위치시켰다. 4cm 길이의, 3.5mm 직경의 stainless steel rod를 주사기 barrel의 flanged end에 삽입시키고, 주사기를 neoprene stoppers 사이에 끼우고 pipe clamp의 jaws에 닿게 하였다. Polymerizing gel에 기포가 인포일 때까지 clamp의 jaws를 조이고, 15분동안 압력을 가하였다. 암리학의 중합이 15분간 일어난 후, 인슐린주사기로부터 cast hydrogel을 제거하고, 가운데 위치한 rod가 들어 있는 Teflon tubing을 cast hydrogel로부터 제거하여, 5cm 길이의, 0.9mm 두께의, 1.7mm 강을 갖고 있는 hydrogel tube를 만들었다. pHema hydrogel tube를 95% ethanol을 함유한 100ml 유리 비커에 위치시키고, nonpolymerized Hema를 제거하기 위하여, 12시간 간격으로 ethanol을 교체하면서 96시간 동안 남가두었다. Ethanol washing 후에, pHema tubes를 500ml의 증류수를 함유하고 있는 배지에 4시간동안 양을 가하고, 증류수를 교환하였는데, 이 과정을 12번 반복하였다. 그 후, pHema tubes를 1cm 길이가 되게 razor blade를 사용하여 절단하였다. 분절은 10X의 암체현미경하에서 점검하고, 결함을 갖고 있는 것은 제거하였다. Silastic adhesive로 채운 2.16mm 직경의, 2mm 길이

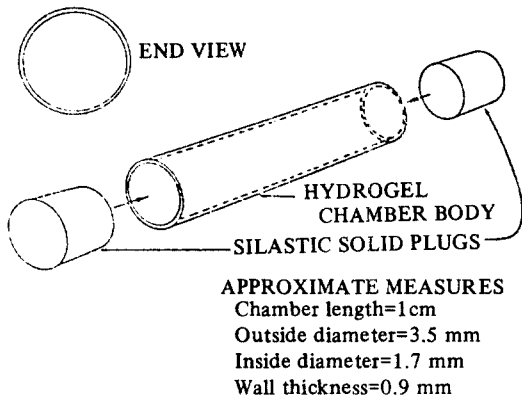


Fig. 1. PHEMA hydrogel chamber for the in vitro fertilization of embryos. Schematic representations of the chamber depicting general features and measures.

의 silastic tubing(Dow Corning Corp., Medical Products, MI)로 고체의 plugs를 있고, chamber를 형성하도록 pHEMA tube의 양단을 막는데 사용하였다(Fig. 1).

2ml 유리앰플에 증류수를 주입하고, 1개의 hydrogel tube의 분절과 2개의 solid plugs를 위치시켰다. 앰플들은 120°C에서 40분동안 고압멸균처리한 후, fire-sealed하고, 사용할 때까지 실온에 보관하였다.

2. 실험동물

Chamber 내에서의 牛精子運動性檢査를 위해서 사용한 정액은, straw 정액(0.5ml, 50×10^6 sperm)으로서, 사용시 35°C의 물에 1분간 담그어서 용해시켰다. chamber내 정자운동성 및 chamber내 수정을 위하여 사용한 토끼는 교잡종의 1회 분만경력이 있는 암놈 10두 및 수태능력이 있는 숫놈 5두로서 oocyte donor로 실험에 사용하기 전 1개월 동안 기초사육을 한 후 사용했으며, 일정한 온도(20~22°C) 및 조명(12hr light : 12hr dark)하에서 사육하였다. Intermediate recipient는 20두의 성숙한 자성 Balb/C mice를 사용하였으며, mice는 시판 mice사료를 급여하였으며, 일정한 온도(20~22°C) 및 조명(14hr light : 10hr dark)하에서 사육하였으며, 질점액검사를 하여 발정기의 mice를 intermediate recipient로 사용하였다.

3. Chamber 내에서의 정자운동성의 검사

가토정액은 인공질법(Walton, 1958)에 의해서 채취하였다. 채취된 정액으로부터 정장을 제거하고, defined medium(Brackett 및 Oliphant, 1975; Brackett 등, 1980b)에 $10^7/ml$ 의 농도에서 20분간 보관하였다. Chamber 내에서의 우 및 가토정자운동성 검사시에는 pHEMA tube 및 plugs를 초자엠프로 부터 멸균된 검자를 사용하여 꺼낸 후에 37°C 멸균생리식염수를 함유한 $10 \times 35mm$ 의 culture dish에 위치시켰다. pHEMA tube의 일단을 plug로 막고, μl 당 1×10^2 의 sperm을 함유한 defined medium $10 \mu l$ 를 腔에 주입시키고, plug로 나머지 일단을 폐쇄시켜서 chamber를 만들었다. 우 또는 가토정액을 함유한 chamber는, 마취된(Metofane, Pitman Moore, NJ) mouse에 1cm 길이의 복벽절개를 하여 외과적으로 이식하였다.

그리고 6시간, 12시간, 18시간 또는 24시간 후에, chamber를 복강으로부터 회수하여 정자의 운동성을 관찰하였다.

4. Chamber 내 受精

Chamber 내 수정을 위한 oocyte를 채취할 시에, 과배란을 유도하기 위하여 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin(Gestyl, Organon) 150 IU를 근육주사하고, 92~96시간후에 Human Chorionic Gonadotropin(APL, Ayerst) 75 IU를 혈관주사하였다. 그리고 HCG주사후 13시간경에 체중 kg당 35mg의 Ketamine hydrochloride(Ketalar, Parke-Davis, Morris Plains, NJ)와 체중 kg당 5mg의 Xylazine hydrochloride(Rompun, Miles Laboratories, Shawnee, KA)를 근육주사하여 마취하였으며, 외과적 수술방법으로 수란관을 노출하여, defined medium으로 flushing하여 oocyte를 채취하였다. 정액의 채취는 인공질법에 의해서 채취하였다(Walton, 1958). 준비된 pHEMA tube의 일단을 plug로 막고, 6개의 oocyte와 μl 당 1×10^2 의 sperm이 들어 있는 defined medium 약 $10 \mu l$ 를 腔에 주입시키고, plug로 나머지 일단을 폐쇄시켜서 chamber를 만들었다. 이 chamber를 마취된 mouse에 1cm 길이의 복벽절개를 하여 외과적으로 이식한 후에 84시간만에 chamber를 복강으로부터 회수하여 수정 및 배양상태를 관찰하였다.

Table 1. Frozen-thawed bovine sperm motility (%) in Hydrogel chambers implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients

Bull No.	Duration of preservation (hours)				
	0	6	12	18	24
1	32	25	15	8	5
2	28	23	11	7	3
3	40	27	13	9	5
4	35	24	12	6	2
Mean ± S.D.	33.8**±5.06	24.8±1.71	12.8±1.71	7.5 ± 1.29	3.8 ± 1.50

**P < 0.01

Table 2. Rabbit sperm motility (%) in Hydrogel chambers implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients

Rabbit No.	Duration of preservation (hours)				
	0	6	12	18	24
1	95	70	37	23	11
2	75	55	24	12	7
3	80	65	26	18	6
4	70	60	28	12	3
5	85	70	31	16	10
Mean ± S.D.	81.0**±9.62	64.0 ± 6.52	29.2 ± 5.07	16.2 ± 4.60	7.4 ± 3.21

**P < 0.01

結 果

냉동용해된 우정액 및 인공질법에 의해 채취된 가토정액을 원심분리하여 정장을 제거하고, μl 당 1×10^2 의 sperm이 되게 defined medium에 희석하여, hydrogel chamber에 넣어서 intermediate mouse recipients의 복강에 이식한 후 6시간, 12시간, 18시간 또는 24시간 후에, chamber를 복강으로부터 회수하여 정자의 운동성을 관찰한 결과는 Table 1 및 Table 2와 같다. Table 1에서 mouse의 복강에 이식하기 직전인, 0시간에서는 Bull No. 1, 2, 3 및 4에서 각각 32, 28, 40 및 35%를 나타내었으나, 6시간에서는 각각 25, 23, 27 및 24%를 나타내었고, 12시간에서는 각각 15, 11, 13 및 12%를 나타내었으며, 시간이 경과할수록 유의성있는 운동성의 감소를 나타내었다($P < 0.01$).

Table 2에서 mouse의 복강에 이식하기 직전인,

0시간에서는 Rabbit No. 1, 2, 3, 4 및 5에서 각각 95, 75, 80, 70 및 85%를 나타내었으나, 12시간에서는 각각 37, 24, 26, 28 및 31%를 나타내었고, 24시간에서는 각각 11, 7, 6, 3 및 10%를 나타내었으며, 시간이 경과할수록 유의성있는 운동성의 감소를 나타내었다($P < 0.01$).

Table 3. Fertilization and culture of rabbit oocyte in Hydrogel chamber implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients

Oocyte donor	Degenerated	Molura	Blastocyst
1	2	10	6
2	3	7	8
3	3	3	1
4	3	2	1

4 두의 donor에서 채취된 oocyte를 1×10^3 의 sperm을 함유한 chamber 1개당 3개의 oocyte를 넣고, mouse의 복강내에 chamber를 이식하여 in chamber fertilization을 시도한 결과는 Table 3와 같다. Donor 1에서는 변성상태 2, 상실배기 10, 포배기 6을 나타내었고, Donor 2에서는 변성상태 3, 상실배기 7, 포배기 8을 나타내었으며, Donor 3에서는 변성상태 3, 상실배기 3, 포배기 12을 나타내었고, Donor 4에서는 변성상태 3, 상실배기 2, 포배기 13을 나타내었으므로 in chamber fertilization 및 culture에 있어서 좋은 성적을 나타내었다.

考 察

냉동용해된 우정자를 defined medium에 희석하여, hydrogel chamber에 넣어서 mouse의 복강에 이식한 후, 6시간, 12시간, 18시간 또는 24시간후에 관찰한 결과인 Table 1에서 정자운동성은 Bull No. 3에서는 각각 27, 13, 9 및 5%를 나타내었고, 다른 Bull들에서도 비슷한 결과를 나타냄으로서, 냉동용해된 우정액에서 고회력정자를 분리하여 (Parrish 등, 1986), 체외성숙시킨 난모세포 (Parrish 등, 1986; Sirard 및 Lambert, 1985)를 사용하면 소에서의 chamber내 수정이 가능한 것으로 사료된다.

신장절법에 의해 채취된 가토정자를 defined medium에 희석하여, hydrogel chamber에 넣어서 복강에 이식한 후, 6, 12, 18 또는 24시간후에 관찰한 결과인 Table 2에서 정자운동성은 Rabbit No. 1에서는 각각 95, 70, 37, 23 및 11%를 나타내었고, 다른 Rabbit들에서도 유사한 결과를 나타냄으로서 양호한 운동성의 보존을 보였으며, chamber내에서의 수정가능성을 나타내었다.

지금까지 豚의 배양 (Bavister 등, 1983), 체외수정 (Brackett 등, 1980a, 1980b; Iritani 및 Niwa, 1977) 등에 관한 보고는 많았으나, pHema chamber를 이용한 체외수정에 관한 보고에는 아직 접한 바 없었다. 도끼에서의 chamber내 수정을 시도한 결과인 Table 3에서, 72개의 oocyte를 실험에 사용한 결과, 변성상태 11, 상실배기 22, 포배기 39로서 chamber내에서 수정 및 배양이 가능함을 나타내었다. 이 실험에서 pHema chamber를 이식받은 in-

termediate recipient인 mouse를 사용하여 수정란의 수송이 가능할 것으로 생각된다. 복강내에 있는 chamber내에서 수정 및 배양이 되는 것으로 보아서, 복강내에서 난의 수정 및 배양에 필요한 성장인자를 포함한 체액이 chamber내로 교류되는 것으로 사료되며, 이 인자성분을 구명하기 위한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

結 論

Chamber내 受精을 하기 위하여 polymerized 2-hydroxyethyl methacrylate로 만든 hydrogel chamber를 사용하였다.

Hydrogel chamber내에서 정자운동성이 보존되는가를 알아보기 위하여, 냉동용해된 우정액과 가토정액을 chamber내에 주입하고, 그 chamber를 mouse의 복강내에 이식하고 일정시간이 경과한 후에 chamber를 회수하여 정자를 관찰하였으며, 그 결과 양호한 정자운동성의 보존을 나타내었다.

Chamber내 수정이 가능한가를 알아보기 위하여, 가토의 난자와 정자를 주입시킨 chamber를 mouse의 복강내에 이식하고, 84시간이 지난 후에 chamber를 회수하고 eggs를 관찰하였으며, 그 결과 chamber내에서 수정과 배양이 일어나는 사실을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

- 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.*, 23:717-725.
- Bavister BD. 1981. Analysis of culture media for in vitro fertilization and criteria for success. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro* (L. Mastroianni, Jr. and J. Biggers, eds.). Plenum Press, New York, pp.61-79.
- Bavister BD, Leibfried ML and Lieberman G. 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.*, 28:235-247.
- Bavister BD and Yanagimachi R. 1977. The effects of

- sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster sperm in vitro. *Biol. Reprod.*, 16:228-237.
- Bousquet D and Brackett BG. 1982. Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. *Theriogenology*, 17:199-213.
- Brackett GF, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ and Evans JF. 1981. Pregnancy following cow in vitro fertilization. *Biol. Reprod* 24 (Suppl 1), 173: 190A.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27:147-158.
- Brackett BG, Evans JF, Donawick WJ, Boice ML and Cofone MA. 1980a. In vitro penetration of cow oocytes by bull sperm. *Arch. Androl.*, 5:69-71.
- Brackett BG, Oh YK, Evans JF and Donawick WJ. 1980b. Fertilization and early development of cow ova. *Biol. Reprod.*, 23:189-205.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation and rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod.*, 12:260-274.
- Brinster RL and Biggers JD. 1965. In vitro fertilization of mouse ova within the explanted fallopian tube. *J. Reprod Fertil.*, 10:277.
- Hafez ESE. 1980. *Reproduction in Farm Animals*. 4th ed. Lea & Febiger. Philadelphia pp.481,525.
- Iritani A and Niwa K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 50:119-121.
- Lee KH, Jee JG, Jhon MS and Ree T. 1978. Solute transport through crosslinked poly (2-hydroxyethyl methacrylate) membrane. *J. Bioeng.*, 2:269-278.
- Leibfried ML and Bavister BD. 1983. Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamsters. *J. Exp. Zool.*, 226:481-485.
- Leibfried ML and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL and First NL. 1983. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. *Biol. Reprod.*, 29:173-179.
- Lindner HR, Bar-Ami S and Tsafiri A. 1980. Model systems for studying oocyte maturation. In Serio M, Moryini L (eds.), *Animal Models in Human Reproduction*. New York: Raven Press, pp.65-85.
- Motilik J and Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25: 87-96.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
- Pinchuk L and Eckstein EC. 1981. Pressurized polymerization for extrusion casting of poly (2-hydroxyethyl methacrylate). *J Biomed Mat Res.*, 15: 183-189.
- Pollard JW. 1987. Controlled in vivo culture of mammalian embryos and blastomeres. Master of Science Thesis, Iowa State University.
- Pollard JW and Pineda MH. 1988. Culture of rabbit embryos and isolated blastomeres in hydrogel chambers implanted in the peritoneal cavity of intermediate mouse recipients. *J. In Vitro Fert. & Embryo Transfer*, 5:207-215.
- Rather BD. 1981. Biomedical application of hydrogels: review and critical appraisal. In *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*, DF Williams (ed), Boca Raton, CRC Press, Vol. II, pp.145-175.
- Shea BF, Latour JPA, Bedirian KN and Baker RD. 1976. Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.*, 43:809-815.
- Sirard MA and Lambert RD. 1985. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.*, 33:487-94.
- Sreenan J. 1970. In vitro maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *J. Agric. Sci.*, 72:393-96.
- Thibault C, Gerard M and Menezo Y. 1975. Acquisi-

- tion par l'oocytes de lapine et de vau du facteur de decondensation do noyau do spermatozoide fecondant (MPGH). *Ann Biol. Anim. Biochem. Bio-705-1* 15:705-714.
- Trounson AO, Willadsen SM and Rowson LEA. 1977. Fertilization and development capabilities of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows. *J. Reprod. Fertil.*, 52:231-237.
- Walton A. 1958. Improvement in the design of an artificial vagina for the rabbit. *J. Physiol.*, 143: 26-28.
- Whittingham DG. 1968. Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature(London)*, 220:592-593.
- Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH and Buckner PJ. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 113:247.
- 고광두, 정길생, 이기만. 1981. 한우의 수정란이식에 관한 연구. *한국축산학회지*, 23 : 331.
- 구병삼, 유동화, 이규환, 나중열, 홍성봉, 배인하. 1986. 체외수정과 배이식에 의한 임신성공예에 관한 연구. *대한불임학회지*, 13 : 121.
- 김창근, 임경순, 켈, 후트. 1986. Studies on in-vitro capacitation by Lysolecithin and in-vitro fertilizing ability of ejaculated rabbit sperm. *한국가축번식학회지*, 10 : 109.
- 석호봉, 이광원, 신용식, 김호중, 조윤형, 오대균, 지철하, 임경순, 알피에스펜. 1983. 소의 동결수정란이 수태에 미치는 영향.
- 이기만, 정길생, 고광두. 1982. 대가축의 수정란이식에 관한 연구. *건대학술지*, 26 : 375.
- 임용택, 최승현, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석. 1984. 마우스난자의 체외수정에 관한 연구. *대한불임학회지*, 11 : 51.
- 정영채, 김창근, 윤종택, 방명걸. 1986. 유우의 개량 및 번식효율 증진에 관한 연구. I. 햄스터 난자를 이용한 유우정자 수정능력 평가에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 10 : 91.
- 정길생. 1983. 수정란이식의 산업화 방안. *한국가축번식학회지*, 25 : 529.
- 정길생. 1983. 수정란이식에 의한 우의 쌍태유기에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 25 : 401.