

優秀 哺乳動物 受精卵의 利用效率 提高에 관한 研究

I. 牛 卵胞卵의 體外成熟, 受精 및 發育

金正翊 · 韓相翊 · 朴春權 · 任石基 · 金鐘培* · 鄭柄鉉* · 鄭吉生*

江原大學校 畜產大學

Elevating Utilization Efficiency of Excellent Embryo in Mammals

I. In Vitro Maturation, Fertilization and Development of Bovine Oocytes

Kim, C.I., S.I. Han, C.K. Park, S.K. Im, J.B. Kim*, B.H. Chung* and K.S. Chung*

College of Animal Agriculture, Kangweon National University

SUMMARY

Bovine oocytes obtained from ovarian(2 to 5mm in diameter) of slaughtered cows were cultured in TCM 199 with 10~20% estrous-cow-serum(ECS) for 24~25hr at 39°C in 5% CO₂ - 95% air. After culture, some oocytes were examined their maturation. The remainder were used to assess the fertilizability with frozen-thawed spermatozoa in a medium containing caffeine and heparin, and subsequent development in media with bovine cumulus cells(BCC) or bovine oviduct epithelial cells(BOEC). The results obtained were summarized as follows:

1. The maturation rate of the oocytes in TCM 199 with 15% ECS group(76.5%) was higher than that of 10% ECS(69.2%) or 20% ECS group(64.8%).
2. The proportions of the oocytes penetrated and the pronuclear oocytes in the presence of caffeine and heparin were 72.1%(62/86) and 93.5%(58/62), respectively. The rate of polyspermy in the fertilized oocytes was 8.1%.
3. When 73 oocytes recovered from fertilization drop were cultured in TC-199 medium with 10% fetal calf serum(FCS), 41 oocytes(56%) cleaved to 2-cell and further stages of embryos. Among these only one embryo developed upto morula stage.
4. The rate of the cleaved oocytes was higher in medium with BCC(80% : 59/74) than BOEC (76% : 58/76). However, the rate of developed morulae and blastocysts was higher in the medium with BOEC(40% : 23/58) than with BCC(34 : 20/59).

I. 緒 論

소의 수정란이식이 산업적으로 이용 가능해짐에 따라 체외수정란의 이식에 의한 송아지 생산이 가능해졌다 (Brackett 등, 1982; Sirard와 Lambert, 1986). 체외수정을 성립시키기 위해서는 성숙난자의 확보 및

정자의 수정능력획득과 침체반응의 유기가 요구되며, 현단계에서 성숙배란 난자의 대응으로 도축장에서 얻은 난소로부터, 회수한 미성숙 난자를 이용한 체외수정과 최외수정란의 배양(Fukui와 Sakuma, 1980; Xu 등, 1987)에 관한 연구와 체외수정에 이용되는 정자의 처리법으로 heparin(Parrish 등, 1988), 황산

*建國大學校 畜產大學(College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University)

본 연구는 한국학술진흥재단 연구비에 의하여 수행된 것임.

chondroitin(Lenz 등, 1983), caffeine(Niwa 등, 1988), 고정액(Brackett 등, 1980) 및 난포액(Fukui 등, 1983) 등에 의한 방법이 보고되었다. 그러나 미성숙난포란의 체외성숙 후 수정란을 배양하는 경우에는 체외발생율이 극히 저조하며(Eyestone 등, 1987)체내에서 정상적으로 발생한 난자에 비하여 세포수가 현저하게 감소된다(Kane, 1987).

체외수정란의 체외배양시 야기되는 발육억제현상(*in vitro cell block*)을 극복하는 수단으로 난구세포(Goto 등, 1988), 난관상피세포(Eyestone 과 First, 1989) 및 영양막세포(Heyman 등, 1987) 등과의 공동배양법(co-culture system)이 보고되었으나 16세포기 이상 발생율은 만족할만한 단계에 이르지 못하고 있다.

본 연구는 소에서 미성숙난포란의 체외성숙과 체외성숙란의 수정법을 검토함과 동시에 우수한 유전능력을 갖는 송아지를 대량 생산하기 위하여 기초연구로서 소의 난구세포와 난관 상피세포가 체외수정란의 발생에 미치는 영향을 검토하였다.

II. 材料 및 方法

1. 난포란의 채취와 체외성숙

1) 난포란의 채취

도축장에서 도살된 소의 난소를 적출, 35~36°C의 생리식염수에 침적하여 2시간 이내에 실험을 운반하였다. 직경이 2~5mm 내의 난포에서 미성숙 난포란을 채취하여 난세포질이 균일하고, 난구세포가 진밀히 둘러싸인 난포란을 선별(McGaughey, 1978)하여 성숙용 배양액에서 4회 세척후 성숙배양에 공용하였다.

2) 난포란의 체외성숙

난포란의 성숙배양은 TC-199액(Gibco, Cat. No. 380-2340, New York 14072, USA)에 비동화시킨 발정우혈청(ECS)을 10, 15 및 20% 첨가한 배양액을 millipore filter(0.2 μ m)로 여과시켜 4-well dish(Nunc, Denmark)에 1ml씩 주입, 멸균된 paraffin oil로 피복하여 2시간 이상 평형(39°C, 5% CO₂ in air)시킨 후 각 well 당 10~15개의 미성숙 난포란을 옮겨 넣은 후 24~25시간 배양하였다.

3) 성숙난포란의 판정

난포란을 24~25시간 배양후 0.2% hyaluronidase(Sigma Chemical Co., St Louis, MO. USA)액으로 난구세포층을 제거한 후 고정액(acetic acid 1: ethanol 3)으로 24~48시간 고정후 1% aceto-orcein 액으로 염색하여 핵의 성숙상태를 검토하여 제2성숙분열 중기(metaphase-II)에 도달한 난자를 성숙난자로 판정하였다.

2. 정자의 수정능획득과 체외수정

1) 정자의 수정능획득

동결보존된 2개의 정액 straw(1ml)를 37°C의 항온수조에서 0.5~1분간 침지하여 용해하였다. 용해된 정액 1ml에 Ca²⁺ free TALP(Bavister와 Yanagisachi, 1977) 배양액 10ml을 점진적으로 첨가하여 채부유, 10분간 원심분리(833g)하여 정자를 세척한 후에 같은 배양액 10ml를 첨가, 0.5~1시간 배양(39°C, 5% CO₂ in air)하여 정액을 상층분리(swim up separation)하였다(Kim 등, 1990).

상층정자 부유액은 heparin(100 μ g/ml)이 첨가된 BO 배양액(Brackett와 Oliphant, 1975)에 옮겨서 2회 원심분리(833g, 10분)하여, 침전층의 1ml와 동량의 BO 배양액을 첨가하여 15~20분간 배양(39°C, 5% CO₂ in air), 정자의 수정능획득을 유기하여 체외수정에 이용할 정자부유액을 준비하였다.

2) 체외수정

Heparin(10 μ g/ml)과 caffeine(5mM)이 첨가된 BO 배양액을 멸균된 paraffin oil로 피복하여 체외수정용 소적배양액(0.5ml)을 만들고 CO₂배양기내에서 2시간 이상 평형시켰다. 체외수정용 소적배양액에 상기의 준비된 체외성숙 난포란(5~10개)과 분리정자부유액(20~30 μ l)을 첨가하여 체외수정하였다. 체외수정 24~25시간후 일부를 1% aceto-orcein 염색액으로 염색하여 정자의 침입율을 조사하였고, 나머지 난자는 난구세포 또는 난관상피세포와 공동배양(co-culture)하여 체외발생능을 검토하였다.

3. 체외수정란의 체외배양

1) 난구세포와 공동배양

수정된 난포란은 8시간 배양후 난구세포가 부착된 난자와 난구세포를 반복된 pipetting에 의해 기계적으로 제거한 난자를 발생용 배양액(TCM 199+10% FCS)

에서 2~3회 세척후 멸균된 paraffin oil로 피복한 동일배지(0.1ml)내로 옮겨 7일간 배양후 초기배의 발생상태를 조사하였다.

2) 난관상피세포와 공동배양

도축장에서 채취한 난관을 1% polyvinyl alcohol 이 함유된 10~20ml PBS 용액을 관류시켜 유리되어 나온 내용물중 난관상피세포를 분리후 2~3회 세척하여 Ham's F-10배양액(10% FCS 첨가)으로 재부유한 후 4-well dish에 1ml씩 분주하여 배양(39°C, 5% CO₂ in air)하였다. 24시간 배양후 매 48시간에 신선한 배양액으로 교환하여 monolayer 층이 형성된 후에 수정란을 넣어 7일간 배양후 수정란의 체외발생능력을 검토하였다.

III. 結果 및 考察

1. 난포란의 체외성숙

Table 1에서 나타난 바와 같이 TC-199 배양액에 발정우 혈청(ECS)을 첨가하여 난포란(Fig. 1)을 배

양한 결과, 총 311개의 미성숙란중 218개가 meta phase-II로 발달되어 체외성숙율은 70.1%였으며, 고정하기전 현미경 하에서 제1극체(Fig. 2)를 관찰할 수 있었다.

한편 배양액에 첨가한 발정우 혈청의 농도가 성숙율에 미치는 영향을 조사한 결과 10%, 15%와 20% 첨가구에서 각각 69.2%(72/104), 76.5%(78/102)와 64.8%(68/105)로 15% 첨가구가 10%와 20%첨가구보다 높았다. 이와 같은 성적은 Fukui와 Ono(1989)가 TC-199 배양액에 20%의 FCS 및 ECS 첨가시에 성숙율이 66.1%와 62.4%였으며, Sanbuissho와 Threlfall(1989)가 발정우 혈청을 10% 첨가한 Ham's F-10배양액으로 배양하여 얻은 53.4%의 성숙율보다 높았다. 이상의 결과는 난포란의 체외성숙에 사용한 배양액의 종류와 배양시간 등 배양조건이 상이한데 기인된 것으로 보인다.

2. 체외성숙 난포란의 체외수정

TC-199 배양액에 15%의 ECS를 첨가한 배양액으로부터 얻은 체외성숙난포란을 이용하여 caffeine과

Table 1. *In vitro* maturation of bovine oocytes cultured in TCM 199 with ECS

Concentration of ECS (%)	No. of trials	No. of oocytes cultured	No. of oocytes at metaphase-II (%)
10	5	104	72(69.2)
15	5	102	78(76.5)
20	5	105	68(64.8)
Total	15	311	218(70.1)

Table 2. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro**

Trials	No. of oocytes examined	No. of oocytes		Total no. of oocytes penetrated (%)	No. of polyspermic oocytes (%)
		With enlarged sperm head(s)	With two pronuclei		
1	23	2	16	18(78.3)	1(5.6)
2	23	1	15	16(69.6)	1(6.3)
3	18	1	11	12(66.7)	1(8.3)
4	22	0	16	16(72.7)	2(12.5)
Total	86	4	58	62(72.1)	5(8.1)

*The oocytes were matured in TCM 199 with 15% ECS.

heparin 이 첨가된 배양액내에서 체외수정을 실시하여 얻은 결과는 Table 2와 같다.

총 86개의 난자중 62개가 정자 침입란으로 판정되어 72.1%의 정자침입율을 얻었다. 이와 같은 성적은 heparin 의 단독첨가시에 Parrish 등(1986)이 보고한 71%와는 비슷한 수준이었으나, Niwa 등(1988)이 보고한 35%에 비하여 높았으며, 또한 caffeine 단독첨가시 Aoyagi 등(1988)이 보고한 53%보다 높았다.

한편 Niwa 와 Ohgoda(1988)는 heparin(35%)의 단독첨가보다 caffeine 과의 공동첨가에 의해 정자침입율(68%)을 향상시켰는데 본 연구에서도 caffeine 과 heparin 이 공동첨가된 수정배지로부터 얻은 정자침입율이 72.1%로서 비슷한 수준을 보였다. 생체내에서 정자는 호흡과 해당작용에 의하여 ATP(adenosine 5'-triphosphate)를 생성하고, ATP로부터 생성된 cAMP는 cyclic nucleotide phosphodiesterase에 의해 분해되는데 caffeine은 cyclic nucleotide phosphodiesterase의 작용을 저해하여 cAMP를 증가시키므로서 정자의 운동성과 대사를 촉진(Garbers 등, 1971)시킬 뿐 아니라 암가축의 생식기도내에는 proteoglycans이 존재하고(Parrish 등, 1989), 이들 proteoglycan 중의 하나인 heparin은 소 정자의 침체반응을 유지하는 것으로 알려져 있으며(Handrow 등, 1982; Parrish 등, 1985, 1986), 체외수정시 caffeine과 heparin의 동시첨가는 정자의 수정능회복과 침체반응의 유기는 물론 정자침입에 효과적인 것으로 사료된다.

한편 62개의 정자침입란 중 58개가 자웅전핵(Fig. 3)이 형성되어 94%의 전핵형성율을 보였다. 이와 같은 성적은 Parrish 등(1986)이 10 μ g/ml heparin만을 첨가한 경우에 80개의 정자침입란 중 57개(71%)가 자웅양전핵이 형성되었으며, Niwa 등(1988)이 5mM caffeine 첨가의 경우에 47개의 정자침입란 중 41개(87%)가 자웅양전핵이 형성되었다는 보고보다도 높아 본 체외수정계가 자웅양전핵의 형성에도 매우 효과적인 것으로 평가된다.

본 연구에서 정자침입란 중 다정자침입율은 8.1%(5/62)로 나타났는데 이와 같은 성적은 Chikamatsu 등(1989)과 Aoyagi 등(1988)이 보고한 27.1%와 13% 보다 낮은 수준이었다. 이와 같은 결과는 swim-up 처리에 의해 보다 활력이 좋은 정자만을 이용했던 점과 수정시 첨가된 정자농도가 0.5~1 \times 10⁵/ml로 낮았던 것에 기인된 것으로 생각된다.

3. 체외수정란의 체외 발생

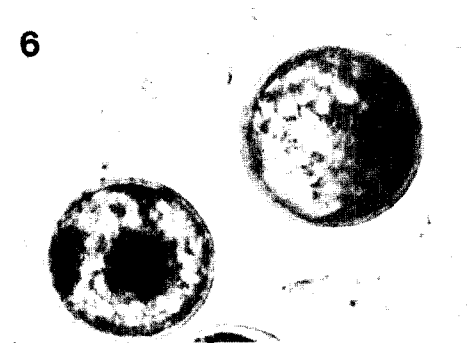
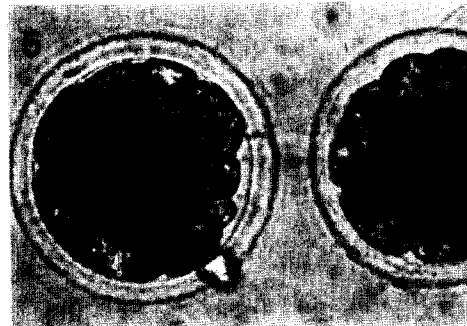
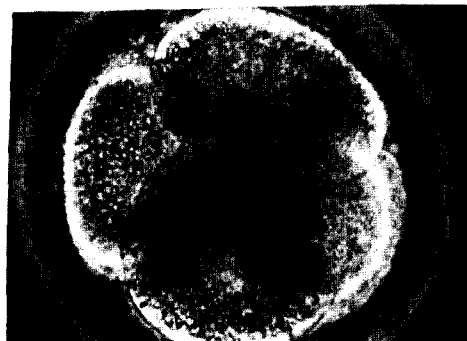
본 실험에서 얻은 체외수정란의 체외발생능을 검토하기 위하여 소의 난구세포 및 난관상피세포와 공동배양하여 얻은 결과는 Table 3에 요약하였다.

대조구인 TCM-199 배양액에 10% FCS가 첨가된 배양액에서는 73개의 난자 중 41개가 2~16세포기로 발육되었으며(Fig. 4), 상실배기 이상으로 발육한 것은 1개(2%)로 낮은 성적을 나타냈다. 이와 같은 성적은 Eyestone 과 First(1989)가 보고한 3%(1/37)와 비슷한 수준으로 체외수정란을 단순배양액내에서 배양하는

Table 3. Development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro

Culture system*	No. of oocytes examined	No. of embryos developed(%)			Morula Blastocyst
		2~16 cell	Morula	Blastocyst	
TCM199+ 10 FCS	73	40	1	0	1(2)
TCM199+10% FCS+BCC	74	39	13	7	20(34)
Ham's F-10 +10% FCS +BOEC	76	35	13	10	23(40)

*Abbreviations are FCS, fetal calf serum; BCC, bovine cumulus cells and BOEC, bovine oviduct epithelial cells.



- Fig. 1. A bovine oocyte enclosed with tight cumulus cells recovered from ovarian follicles after slaughter.
- Fig. 2. Oocyte at metaphase II with the first polar body(1PB) 25 hours after culture in TCM199 with 15% ECS.
- Fig. 3. Fertilized oocyte at the pronuclear stage with female(fPN) and male(mPN) pronuclei accompanying the sperm tail(arrow) fixed 24 hours after insemination.
- Fig. 4. Four-cell embryo after culture for 7 days in TCM 199
- Fig. 5. Morula after 7 days in TCM 199 with bovine cumulus cells co-culture.
- Fig. 6. Blastocysts co-cultured with bovine epithelial cells in Ham's F-10 for 7 days.

경우 체외발생이 중지되는 현상을 확인할 수 있었다.

소의 난구세포 및 난관 상피세포와 체외수정란을 공동배양한 경우 난할율은 난구세포와의 공동배양시 80% (59/74)로서 난관 상피세포와의 배양시 76% (58/76)보다 높았다. 이와 같은 성적은 Fukui와 Ono (1989)가 난구세포와의 배양시 난할율 52.4%, Eyestone과 First(1989)가 난관 상피세포와의 배양시의 63%보다도 높은 성적이었다. 그러나 상실배(Fig. 5) 및 배반포기(Fig. 6)의 난할율은 난관상피세포와 배양하는 경우에 40% (23/76)로 난구세포와의 배양시 34% (20/76)보다 높았다.

난구세포가 수정란의 체외발생에 효과적인 것은 소 이외에도 토끼(Motilik과 Fulka, 1981), 돼지(Fulka와 Motlik, 1980) 및 면양(Staignmiller와 Moor, 1984)에서도 확인된 바 있다. 한편 Eyestone과 First(1989)가 체외수정란을 TC-199(10% FCS) 배양액에 난관 상피세포와 체외수정란을 공동배양한 결과 43% (15/35)가 상실배와 배반포로 발육된 성적 및 Kim 등(1990)이 CZB 배양액(Chatot 등, 1989)에 소의 난관 상피세포와 체외수정란을 공동배양한 결과 37.5% (39/104)가 상실배 및 배반포로 발생된 성적과 대체로 유사한 경향을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 난구세포 및 난관 상피세포에서 수정란의 발생촉진인자가 생성 분비되는 것으로 추측되며, 체내에서 초기배가 난관 상피세포와 접촉하여 발생됨을 감안할 때, 특히 난관 상피세포에서 분비되는 초기배의 성장인자가 존재(Bavister, 1988)하여 체외수정란의 배양시 난관 상피세포와 공동배양이 난구세포로 효과적인 것으로 생각된다.

IV. 摘 要

본 연구는 미성숙 우난포란의 체외성숙, 체외수정 및 수정란의 체외발생에 영향을 미치는 요인에 대한 검토와 안정된 체외배양계의 확립을 위한 기초연구를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 난포란의 체외성숙율은 TC-199배양액에 15%의 ECS 첨가구(76.5%)가 10% (69.2%)와 20% (64.8%) 첨가구보다 효과적이었다.
2. TC-199 배양액에 15% ECS를 첨가한 조건에서

체외성숙 난포란의 정자침입율은 72.1% (62/86)였으며, 정자침입란중 자동전핵 형성율은 93.5% (58/62)이고 다정자 침입의 발생비율은 8.1% (5/62)이었다.

3. TC-199 배양액에 10% FCS를 첨가한 구에서는 56% (41/73)가 세포분열하였으며, 그중 2% (1/41)만이 상실배로 발생하였다.
4. 체외수정란을 난구세포(BCC) 및 난관 상피세포(BOEC)와 공동배양한 결과 세포분열에서는 난구세포와의 공동배양구(80% ; 59/74)가 난관 상피세포 첨가구(76% ; 58/76)보다 우수하였으나, 발생난자중 상실배와 배반포기배의 발생율은 난관 상피세포구(40% ; 23/58)가 난구세포와의 공동배양구(34% ; 20/59)보다 높았다.

V. 引用文獻

1. Aoyagi, Y., K. Fujii, Y. Iwazumi, M. Furudote, Y. Fukui and H. Ono. 1988. Effects of two treatments on semens from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*, 30 : 973-985.
2. Bavister, B.D. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 29 : 143-154.
3. Bavister, B.D. and R. Yanagimachi. 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.
4. Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A. Dressel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27 : 147-158.
5. Brackett, B.G., Y.K. Oh, J.F. Evans and W.J. Donawick. 1980. Fertilization and early development of cow ova. *Biol. Reprod.*, 23 : 189-205.

6. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12: 260-274.
7. Chatot, C.L., C.A. Ziomek, B.D. Bavister, J.L. Lewis and I. Torries. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. Theriogenology, 86: 679-688.
8. Chikamatsu, N., M. Urakawa, Y. Fukui, Y. Aoyagi and H. Ono. 1989. *In vitro* fertilization and early development of bovine follicular oocytes matured in different culture systems and inseminated with spermatozoa treated by different methods. Jpn. J. Anim. Reprod., 35: 154-158.
9. Eystone, W.H. and N.L. First. 1989. Co-culture of cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85: 715-720.
10. Eystone, W.H., J. Vignieri and N.L. First. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. Theriogenology, 27: 228(abstr.).
11. Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono. 1983. Fertilization of bovine oocytes after various sperm procedures. Theriogenology, 20: 651-660.
12. Fukui, Y. and H. Ono. 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. Fert., 86: 501-506.
13. Fukui, Y. and Y. Sakuma. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: Relation of ovarian activity, follicular size and the presence of cumulus cells. Biol. Reprod., 22: 669-672.
14. Fulka, J. and J. Motlik. 1980. *In vitro* maturation. Proc. 9th int. Cong. Anim. Reprod. A.I., Madrid, Spain., 2: 55-62.
15. Garbers, D.L., N.L. First, J.J. Sullivan and A.L. Henry. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. Biol. Reprod., 5: 336-339.
16. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba and K. Nakanishi. 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.
17. Handrow, R.R., R.W. Lenz and R.L. Ax. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Comm., 107: 1322-1326.
18. Heyman, Y., Y. Menezo, P. Chesne, S. Camous and V. Garnier. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. Theriogenology, 27: 59-67.
19. Kane, M.T. 1987. *In vitro* growth of preimplantation rabbit embryos. In: The mammalian preimplantation embryo: Regulation of growth and differentiation *in vitro*. Bavister, B.D. (ed.), pp. 139-217. Plenum Press, NY, U.S.A.
20. Kim, C.I., J.E. Ellington and R.H. Foote. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM199 and a simple defined medium with co-culture. Theriogenology, 33: 433-440.
21. Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K. Lohse, N. L. First and R.L. Ax. 1983. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. Biol. Reprod., 28:

- 683-690.
22. McGaughey, R.W. 1978. *In vitro* oocyte maturation. In: Methods in mammalian reproduction. Daniel, J.C., Jr.(ed.). pp. 1-20. Academic press, NY, U.S.A.
 23. Motlik, J. and J. Fulka. 1981. Fertilization of rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. J. Reprod. Fert., 63: 425-429.
 24. Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in-vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology, 30: 733-741.
 25. Niwa, K., O. Ohgoda and M. Yuhara, 1988. Effect of caffeine in media for treatment of frozen-thawed sperm on *in-vitro* penetration of cattle oocytes. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. Dublin, Ireland, 3: 346(3 pages).
 26. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N. L. First. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate or the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. Theriogenology, 24: 537-549.
 27. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, R.R. Handrow, M.M. Sims and N.L. First. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biol. Reprod., 40: 1020-1025.
 28. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine *in-vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 25: 591-600.
 29. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod., 38: 1171-1180.
 30. Sanbuissho and W.R. Threlfall. 1989. The effect of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. Theriogenology, 31: 693-699.
 31. Sirard, M.A. and R.D. Lambert. 1986. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. Vet. Res., 119: 167-169.
 32. Staigmiller, R.B. and R.M. Moor. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of bovine oocytes matured out side the follicle. Gamete Res., 9: 221-229.
 33. Xu, K.P., T.Greve, H. Callesen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 81: 501-504.