

우 난구세포의 공동배양과 CR1aa배양액이 체외생산된 우 수정란의 체외 발생에 미치는 영향

김동훈 · 정형민 · 박세필 · 이훈택 · 정길생

건국대학교 동물자원연구센터

Effects of Bovine Cumulus Cell Co-Culture and CR1aa Medium on *In Vitro* Development of *In Vitro* Produced Bovine Embryos

Kim, D. H., H. M. Chung, S. P. Park, H. T. Lee and K. S. Chung

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

The aim of this study was to compare the two culture systems 1) co-culture with cumulus cells and 2) chemically defined medium supplemented with amino acids (CR1aa) and fetal calf serum (FCS) of *in vitro* produced bovine embryos from follicular oocytes *in vitro*. Bovine follicular oocytes were collected from ovaries of slaughtered cows and matured in TCM199 supplemented with 10% FCS and hormones (1 μ g/ml FSH-P and 1 μ g/ml oestradiol-17 β) 24 hours at 39°C under 5% CO₂ in air. The capacitation of spermatozoa from ejaculated or frozen bull semen was induced by centrifugation through Percoll density gradient (45%, 90%). Then capacitated spermatozoa (1 \times 10⁶/ml) were inseminated into 50 μ l droplet containing matured follicular oocytes and incubated for 40~42 hours. Cleaved embryos of 2~4cell stage were transferred to the co-culture with cumulus cells and/or CR1aa medium supplemented with FCS. In semen source, the developmental rates to the blastocyst and the hatched blastocyst stages were higher in ejaculated semen (27.6% and 14.9%) than those of frozen-thawed semen (18.3% and 11.8%), respectively. In two culture systems, the proportions of embryonic development upto the blastocysts and the hatched blastocysts were higher of CR1aa medium (22.1% and 12.1%) than those of cumulus cell co-culture (16.8% and 5.1%), respectively. The number of cells in expanded blastocysts was slightly higher in cumulus cells co-culture (122.6 \pm 8.5) than that in CR1aa medium (117.9 \pm 5.9). The present results indicated that the early development of *in vitro* produced bovine embryos can be maintained efficiently in CR1aa medium as well as in co-culture with cumulus cells.

I. 서 론

가축의 난포란, 특히 우 난포란의 체외성숙, 수정 및 배양기술은 핵치환 및 외래 유전자 주입에 의한 형질

전환동물의 생산과 같은 첨단 생명공학 연구에 필요한 다량의 수정란 확보와 경비 절감을 위하여 그 의의가 크므로 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 우 난포란의 최적 체외 배양체계가 아직 확립되어

있지 않으며, 기존의 것들도 많은 문제들이 지적되어 오고 있다. 특히 소의 체외성숙, 수정된 수정란을 체외에서 배양할 경우 8~16세포기에서 발생이 정지되는 *in vitro* cell block현상(Eyestone 등, 1986)이 체외 수정란의 대량 확보에 큰 장애 요인이 되고 있다. 이러한 *in vitro* cell block현상을 극복하기 위한 방법으로 다양한 체세포와의 공동배양(Goto 등, 1988; Fukuda 등, 1990; Eyestone 등, 1989; Xu 등, 1992)와 conditioned medium(Eyestone 등, 1989) 그리고 동종 혹은 타종의 난관을 이용한 기관배양(Xu 등, 1987; Parrish 등, 1986; Eyestone 등, 1987; Iwasaki와 Nakahara, 1990) 등이 체외수정란의 체외배양방법으로 제시되어 왔으며, 그중에서도 체세포와의 공동배양이 가장 좋은 결과를 얻었다고 보고하였다.

공동배양에 이용되는 체세포는 미지의 수정란 성장 촉진인자를 생산하거나 배양액 내에 존재하는 수정란 유해인자를 제거하는 것으로 보고있다(Eyestone과 First, 1989). 그러나 체세포와 공동배양을 실시할 경우 monolayer작성이 용이하지 않고, 장기간 배양에 따른 세포의 형태변형, 세포유지를 위한 계대배양의 어려움, 오염의 위험성이 크다는 문제점이 제기되고 있다(Xu 등, 1992). 또한 수정란에 대한 기초연구에 있어서 체세포와의 공동배양은 수정란의 배양과 발달에 있어서 정확한 영양소 요구량과 수정란 대사작용의 명확한 이해를 막는다고 보고한다(Takahashi와 First, 1992).

이와 같은 배양체계의 문제점들을 해결하기 위해서 somatic cell free medium을 이용하는 방법이 제시되었는데, 면양의 난관분비액을 기초로한 semi-chemically defined medium인 Synthetic Oviduct Fluid (SOF) (Tervit 등, 1972; Takahashi와 First, 1992)와 CR1 배양액 (Rosenkrans 등, 1990)이 개발되었으며, 특히 CR1배양액에 필수아미노산과 비필수아미노산이 첨가되었을 경우에 양호한 배발달을 나타낸다고 하였다 (Rosenkrans 등, 1991).

이에 본 연구에서는 체세포 공동배양체계 중 우 난구세포 공동배양과 somatic cell free medium인 CR1a배양액을 이용하여 체외생산된 우 난포란의 체외발생능과 부화율 그리고 세포수를 상호 비교 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수

도축장(우성농역)에서 도살 직후 채취된 소의 난소를 37℃의 멸균 생리식염수가 충만된 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반한 후, 난소 표면의 혈액과 이물질을 제거한 후, 18 gauge 주사침이 부착된 주사기를 이용하여 2~6mm 가시난포로부터 난포액을 흡인한 후, 이를 조직배양용 petri dish (Falcon, USA)에 옮겨, 실체현미경하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고, 세포질이 균일한 난자만을 선별하여 난자세척용 배양액 (TL-HEPES)으로 3회 세척 후, 체외성숙에 이용하였다.

2. 체외성숙

회수된 난포란의 체외성숙에는 TCM199 (GIBCO, USA)을 기본배양액으로 10% FCS (Sigma, USA) 및 1 µg/ml FSH-P (Schering Co., USA), 1 µg/ml oestradiol-17β-(Sigma, USA)가 첨가된 배양액을 사용하였으며, 2시간 이상 전배양을 실시한 paraffin oil이 피복된 50 µl의 체외성숙용 배양액 소적에 8~10개의 난포란을 옮겨, 5% CO₂, 95% 공기, 39℃ 조건의 배양기 내에서 24시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

3. 체외수정

체외성숙이 유도된 난포란의 체외수정을 위해서, 먼저 성숙난포란을 수정용 배양액 (Fert-TALP)으로 3회 세척한 다음, 2시간 이상 전배양을 실시한 paraffin oil이 피복된 50 µl의 Fert-TALP배양액 (6mg/ml fatty acid free BSA, 2 µg/ml heparin 첨가) 소적에 10개 성숙난포란을 옮겼다. 이때 사용된 Fert-TALP배양액에는 glucose를 첨가하지 않았다. 정자의 처리방법은 15ml cornical tube (Falcon, USA)에 각 2ml로 만든 90%, 45% percoll (Sigma, USA) 이중층의 상층부에 동결정액 혹은 원정액을 500 µl 분주한 후 2,000rpm에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리후 tube하단의 정액층만을 회수하여 6mg/ml BSA (Fraction V, Sigma, USA)가 첨가된 정자처리용 배양액 (Sp-TALP)으로 희석하

여, 정자농도를 $2\sim 3\times 10^7$ /ml로 조정하였다. 체외수정은 성숙난포난을 함유하고 있는 Fert-TALP배양액의 소적에 정자부유액을 주입하여 실시하였으며, 이때 최종정자농도는 1×10^6 /ml로 조정하였다.

4. 체외수정된 수정란의 체외배양

체외수정을 유도한 후 40~42시간 경에, 수정된 난자는 난구세포를 제거한 후, 2세포기 이상 발달된 수정란만을 선별하여 체외배양을 실시하였다.

1) 난구세포와의 공동배양

체외성숙된 난포난의 주위를 덮고있는 난구세포를 회수한 후, 0.1% hyaluronidase 용액에 5분간 처리 후, 10% FCS가 첨가된 신선 TCM199배양액으로 3회 이상 세척한 다음, TCM199배양액을 첨가하여 세포농도를 1×10^6 /ml로 조정하여 조직배양용 petri dish에 paraffin oil이 피복된 100μ l의 소적을 제작한 다음 5% CO₂, 95% 공기, 39℃ 조건의 배양기내에서 2일간 배양을 실시함으로써 monolayer를 작성하였다. Cumulus cell monolayer가 작성된 소적에 체외수정된 2~4세포기 수정란을 소적당 10~20개씩 옮겨서 체외배양을 실시하였다. 이때 cumulus cell monolayer 소적의 배양액은 48시간 간격으로 50%씩 신선 배양액으로 교체하였다.

2) CR1aa배양액에서의 체외배양

Semi-chemically defined medium인 CR1에 MEM Essential amino acid (GIBCO, USA), MEM Non-essential amino acid (GIBCO, USA) 및 fatty acid free BSA를 첨가한 배양액 (CR1aa)을 제작하였으며, 2시간 이상 전배양을 실시한 50μ l의 CR1aa배양 소적에 체외수정된 2~4세포기 수정란을 소적당 10개씩 옮겨서 40~42시간 배양을 실시한 후, 다시 fatty acid free BSA 대신에 10% FCS가 첨가된 CR1aa 배양액으로 옮겨서 체외배양을 실시하였다 (Fig. 1).

5. 세포수의 조사

난구세포 공동배양과 CR1aa 배양액에서 체외생산된 blastocyst의 세포수를 조사하기 위하여, 수정 후 8일째 expanded blastocyst를 DNA-specific dye인 Hoechst 33342(Sigma, USA)로 염색을 실시한 후, 형광현미경 하에서 사진촬영을 하여 세포수를 조사하였다 (Fig. 2).

6. 통계 처리

본 실험에서 얻어진 결과들의 통계분석은 χ^2 검정으로 실시하였다.

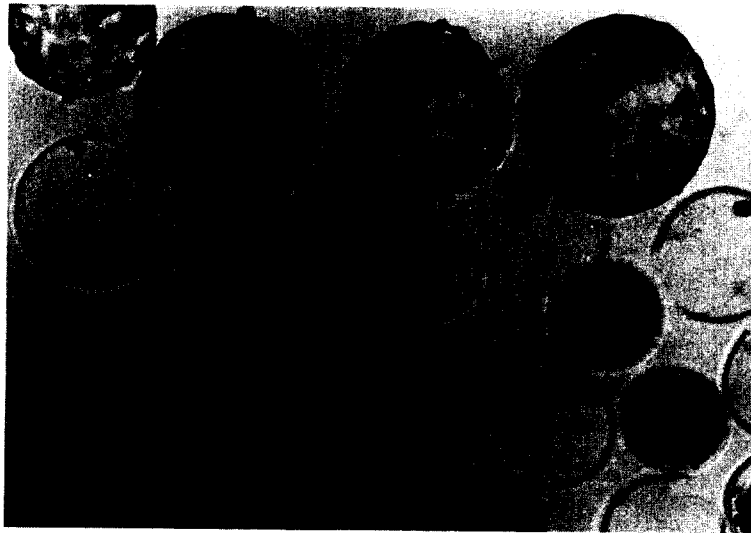


Fig. 1. Bovine blastocysts cultured in CR1aa medium for 8 day .

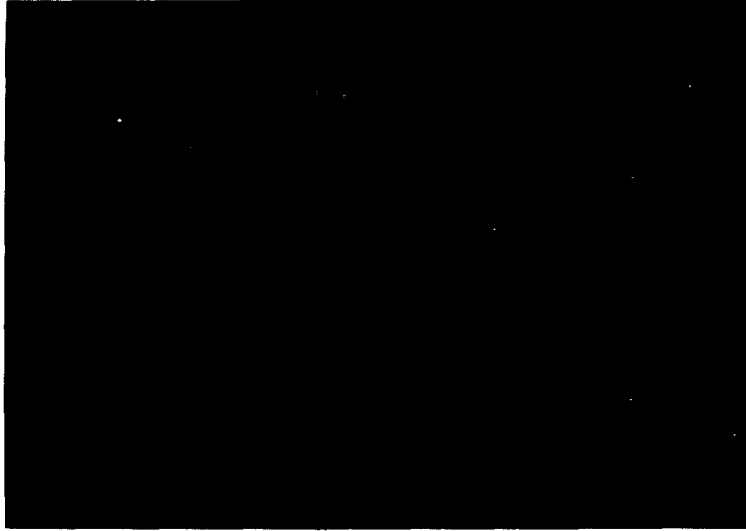


Fig. 2. Hoechst 33342 stained blastocyst on day-8 of culture.(Cell numbers> 100).

III. 결과 및 고찰

1. 원정액과 동결정액에 따른 난포란의 체외발생에 미치는 영향

체외성숙된 난포란을 원정액 또는 동결정액으로 체외수정을 실시한 후, CR1aa배양액에서 체외발생을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

인공질을 사용하여 채취된 Holstein 원정액 또는 동결정액을 이용하여 체외수정을 실시하였을 경우, 수정후 40~42시간째 난할율은 각각 70.1%, 52.7%로서 통계적 유의차는 없었지만 원정액군이 높은 난할율을 나타냈다. 이러한 결과는 체외성숙된 난포란을 원정액으로 체외수정을 실시하였을 때 난할율이 60%라고 보고한 Fukuda 등 (1990)의 결과보다는 다소 높은 성적이었다. 그리고 동결정액을 이용한 경우 난할율은 Saeki 등 (1991)의 63%, Wiemer 등 (1991)의 78.8~86.6%에 비하여 낮은 성적이었지만, 33%의 성적을 보고한 Younis 등 (1989)의 결과보다는 높은 성적이었다.

CR1aa배양액에서 체외발생을 유도하였을 때, blastocyst 및 hatched blastocyst까지의 발달율은 원정액군이 27.6%와 18.3%, 동결정액군이 14.9%와 11.8%로서, 원정액군이 동결정액군에 비하여 높은 배 발달율을 나타냈다. 이러한 결과는 원정액으로 체외수

정을 실시후 난구세포와 공동배양하여 9%의 blastocyst 발달율을 보고한 Fukuda 등 (1990)의 결과와 비교하였을 때 높은 성적을 나타냈다.

본 연구결과에서는 원정액이 동결정액보다 체외수정후 체외발생에 있어 더 효과적인 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 동결정액의 경우 동결보존시 발생하는 정자 동해에 의한 것으로 사료된다.

2. 난구세포 공동배양과 CR1aa배양액이 체외발생에 미치는 영향

단층배양이 유도된 소 난구세포 공동배양과 아미노산이 첨가된 CR1aa배양액에서의 체외발생율을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

난구세포와 공동배양에서는 blastocyst 및 hatched blastocyst까지의 발달율은 16.8%와 5.1%를 나타냈으며, CR1aa배양액에서는 22.1%와 12.1%를 나타냈다. Blastocyst 발달율에 있어서는 통계적 유의차가 인정되지 않았지만, CR1aa에서 높은 성적을 나타냈으며, hatched blastocyst 발달율의 경우에는 CR1aa배양액이 유의하게 높은 성적을 나타냈다($P < 0.05$).

난구세포와의 공동배양시 결과는 Goto 등 (1988)의 15.1%, Fukuda 등 (1990)의 9%, Nakao 등 (1990)의 10%, Behboodi 등 (1992)의 3.8% 보다는

Table 1. *In vitro* development of *in vitro* matured oocytes fertilized with ejaculated and frozen semen

Source of semen	No. of oocytes examined	No(%) of embryos cleaved	No(%) of embryos developed to	
			Blastocyst	Hatched blastocyst
Ejaculated	87	61(70.1)	24(27.6)	13(14.9)
Forzen	93	49(52.7)	17(18.3)	11(11.8)

Table 2. *In vitro* development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in two different culture systems

Culture system	No. of oocytes examined	No(%) of embryos cleaved	No(%) of embryos developed to	
			Blastocyst	Hatched blastocyst
Cumulus cell	137	84(61.3)	23(16.8)	7(5.1) ^a
CR1aa	298	180(60.4)	66(22.1)	36(12.1) ^b

a, b : P<0.05

blastocyst 발달율이 높은 성적이었지만, Kajihara 등 (1991)의 25.9%, Yang 등 (1993)의 26~34% 보다는 저조한 결과를 나타냈다. 수정란을 난구세포와 공동배양시 그 효과에 대하여 명확하지는 않지만, Nakao 와 Nakatsuji (1990)는 난구세포로부터 분비되는 수정란 성장촉진인자 (embryotropic factor) 혹은 수정란과 세포간 접촉에 의한 것이라고 보고하고 있다. 한편, CR1aa 배양액에서 배양시 결과는 Rosenkrans 등 (1991)이 난할율을 기준으로 28.6%의 blastocyst 발달율을 보고한 성적보다는 높게 나타났다(본 실험의 경우 난할율을 기준으로 36.6%를 나타냄).

본 실험에서 필수아미노산과 비필수아미노산 첨가 및 무첨가에 따른 비교실험을 실시하지는 않았지만, 아미노산의 첨가가 체외성숙 및 수정된 수정란의 체외발달에 있어서 유효하며, 특히 blastocyst의 부화율에 있어서 유효한 것으로 추측된다. 이러한 결과는 체외수정란의 체외발달에 있어서 CR1aa 배양액 내에 필수아미노산과 비필수아미노산의 첨가가 유효하다는 Rosenkrans 등 (1991)의 보고와 일치한다. 따라서 추후에 체외수정란의 체외발생에 있어서 필수아미노산과 비필수아미노산 첨가효과에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

3. 세포수의 조사

난구세포 공동배양과 CR1aa배양액에서 체외발달된 expanded blastocyst를 DNA-specific dye인 Hoechst 33342로 염색을 실시하여 세포수를 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

난구세포 공동배양과 CR1aa배양액에서 체외생산된 expanded blastocyst의 세포수는 각각 122.6±8.5개, 117.9±5.9개 로서 두 배양체계간에 큰 차이는 없었다. 체세포와 공동배양에 있어서, Iwasaki 등 (1990)이 난구세포와 공동배양시 80개, Xu 등 (1992), Fukui 등 (1989)이 난관상피세포와 공동배양시 101.5개, 100개 였다고 보고한 결과보다는 많은 것이며, Wiemer 등 (1991)이 과립막세포와 난관상피세포에서 공동배양하여 116.4개를 나타냈다고 보고한 성적과는 대차가 없었다.

Somatic cell free medium인 CR1aa배양액에서 얻은 결과는, Fukui 등 (1991), Choi 등 (1991)이 Synthetic Oviduct Fluid (SOF)에서 배양하여 얻은 결과인 83개, 78.5개 보다는 세포수가 현저하게 많았으며, Takahashi와 First (1992)가 필수아미노산, 비필수아미노산 및 비타민이 첨가된 mSOF배양액에서 얻은 결과인 115.2개 와는 유사한 세포수를 나타냈다.

Table 3. The number of cells in expanded blastocysts developed in two different culture systems

Culture system	No. of embryos examined	No. of cells in blastocysts	
		Mean \pm SEM	Range
Cumulus cell	14	122.6 \pm 8.5	81 ~ 175
CR1aa	13	117.9 \pm 5.9	84 ~ 149

Blastocyst의 세포수에 대한 보고에서, Iwasaki 등 (1990)은 체외발생된 수정란의 낮은 임신율은 적은 세포수에 기인한다고 보고하였고, Papaioannous와 Ebert (1986)는 세포수가 착상전 수정란의 생존성에 대한 정확한 지표가 된다고 보고하였다.

본 실험결과에서 배양액 내에 필수아미노산과 비필수아미노산의 첨가는 체외성숙, 수정된 수정란의 체외 발생 뿐만 아니라 blastocyst의 세포수에 대해서도 유효한 것으로 나타났다. 따라서 배양액 내에 필수아미노산과 비필수아미노산 첨가가 blastocyst의 세포수에 미치는 영향에 대해서도 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 체외성숙된 난포난을 체외수정후, 난구세포 공동배양체계와 semi-chemically defined medium (CR1)에 필수, 비필수아미노산에 첨가된 배양액(CR1aa) 배양체계에서 배양을 실시하여 배 발생능을 비교조사하였다.

원정액과 동결정액에 따른 체외성숙 난포난의 체외수정후 난할율과 blastocyst 및 hatched blastocyst까지의 체외발달율은 원정액군이 70.1%, 27.4%, 14.9%로서 동결정액군의 52.7%, 18.3%, 11.8%보다 높게 나타났으나 통계적 유의차는 없었다.

체외배양체계에 따른 체외수정란의 blastocyst 발달율은 CR1aa배양액군이 22.1%로서 난구세포 공동배양군 16.8%보다 높게 나타났으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 그리고 체외배양체계에 따른 체외수정란의 hatched blastocyst 발달율은 CR1aa배양액군이 12.1%로서 난구세포 공동배양군 5.1%보다 유의하게 높게 나타났으며 ($P < 0.05$), 체외배양체계에 따른 expanded blastocyst의 세포수는 난구세포 공동배양군이 122.6 \pm 8.5개 로서 CR1aa배양액군 117.9 \pm

5.9개 보다 다소 높게 나타났다.

따라서 본 연구의 결과는 난구세포 공동배양체계 뿐만 아니라 CR1aa배양액 배양체계도 체외성숙, 수정된 수정란의 체외발생에 효과적인 배양체계인 것으로 입증되었으며, 오히려 본 실험에서는 CR1aa배양액 배양체계가 더 좋은 결과를 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Aoyagi, Y., Y. Fukui, Y. Iwazumi, M. Urakawa., and J. Ono. 1990. Effects on culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, 34:749-759.
2. Behbooli, E., G. B. Anderson and R. H. BonDurant. 1992. Development of *in vitro* fertilized oocytes from pregnant and nonpregnant cows in oviductal epithelial and cumulus cell co-culture systems. *Theriogenology*, 38:1077-1084.
3. Choi, Y. H., Y. Fukui and H. Ono. 1991. Effects of media and the presence of bovine oviduct epithelial cells during *in vitro* fertilization on fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, 36:868-878.
4. Eyestone, W. H., D. L. Northey and M. L. Leibfried-Rutledge. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.* 32(suppl. 1):100(Abster.).
5. Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:

- 715-720.
6. Eyestone, W. H. and N. L. First. 1986. A study of the 8- to 16- cell developmental block in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, 25:152(Abstr.)
 7. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42:114-119.
 8. Fukui, Y., L. T. McGowan, R. W. James, P. A. Pugh and H. R. Tervit. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 92: 125-131.
 9. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effects 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.
 10. Goto, K., Y. Kajihara, M. Koba, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 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.
 11. Goto, K., Y. Kajihara, M. Koba, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.*, 67:2181-2185.
 12. Iwasaki, S. and T. Nakahara. 1990. Cell number and incidence of chromosomal abnormalities in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit. *Theriogenology*, 33:669-675
 13. Kajihara, Y., N. Kometani, S. Kobayashi, Y. Shttanaka and K. Goto. 1991. Pregnancy by bovine blastocysts developed in co-culture with cumulus/uterine endometrial cells after *in vitro* fertilization. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 37:177-183.
 14. Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Crister, J. J. Parrish and N. L. First. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31:61-74.
 15. Nakao, H. and N. Nakatsuji. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 33:591-600.
 16. Papaioannous, V. E. and K. M. Ebert. 1986. Development of fertilized embryos transferred to oviduct of immature mice. *J. Reprod. Fert.*, 76:603-608.
 17. Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish and M. L. Leibfried-Rutledge. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
 18. Rosenkrans, C. F. Jr., G. Z. Zeng, P. K. Schoff and N. L. First. 1990. A simple medium for *in vitro* development of bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, 68(Suppl):430 abstr.
 19. Rosenkrans, C. F. Jr. and N. L. First. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 35:266(Abstr.)
 20. Takahashi, Y. and N. L. First. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37: 963-978.
 21. Takagi, Y., K. Mori, M. Tomizawa, T. Takahashi, S. Sugawara and J. Masaki. 1991. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology*, 35:1197-1207.
 22. Tervit, H. R., D. G. Whittingham., and L. E. A. Rowson. 1972. Successful culture *in*

- vitro* of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fert., 30:493-497
23. Younis, A. I., B. G. Brackett. T. and R. A. Fayrer-Hosken. 1989. Influence of serum and Hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Gamete Research, 23:189-201.
24. Younis, A. I. and B. G. Brackett. 1991. Importance of cumulus cells and insemination intervals for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts *in vitro*. Theriogenology, 36:11-21.
25. Wiemer, K. E., A. J. Watson, V. Polanski, A. I. Mckenna, G. H. Fick and G. A. Schultz. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev., 30:330-338.
26. Xu, K. P., T. Greve, H. Callssen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 81:501-504.
27. Xu, K. P., B. R. Yadav, R. W. Rorie, L. Plante, K. F. Betteridge and W. A. King. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. J. Reprod. Fert., 94:33-43.
28. Yang, X., S. Jiang., and R. H. Foote. 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. Mol. Reprod. Dev., 34:94-100.