

체외성숙, 수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우이식에 의한 산자 생산

박충생 · 공일근 · 노규진* · 주영국 · 송상현 · 황영균* · 박준규 · 조성근 · 전병균 · 이경미 ·
윤희준* · 최민철* · 광대오** · 이효종* · 최상용*
경상대학교 농과대학 축산학과

Production of Korean Native Calf by *In Vitro* Maturation, Fertilization, Cultivation and Transfer of Embryos into Holstein Cows

Park, C. S., I. K. Kong, G. J. Rho*, Y. K. Joo, S. H. Song, Y. K. Hwang*, J. K. Park, S. K. Cho,
B. G. Jeon, K. M. Lee, H. J. Yun*, M. C. Choi*, D. O. Kwock**, H. J. Lee* and S. Y. Choi*
Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

The objective of this study was to produce Korean native calves following transfer of *in vitro* matured, fertilized and cultured embryos into Holstein cows. The ovaries of Korean native cows or heifers were obtained from an abattoir and kept on 25 to 28°C and transported to laboratory within 2 hrs. The oocytes were matured *in vitro* (IVM) for 24 hrs in TCM-199 supplemented with 35 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH, 1 µg/ml estradiol-17β and granulosa cells at 39°C under 5% CO₂ in air. They were fertilized *in vitro* (IVF) by epididymal spermatozoa treated with heparin for 24 hrs., and then the zygotes were co-cultured *in vitro* (IVC) with bovine oviductal epithelial cells for 7 to 9 days. Late morulae and blastocysts produced *in vitro* were nonsurgically transferred to recipient cows by unilateral. Recipients were monitored for estrus and for pregnancy by rectal palpation in 60 days after embryo transfer. One of them was pregnant to term and produced a female weighing 42.5 kg at birth.

Key words : bovine, *in vitro* fertilization, embryo transfer, IVF calf

I. 서 론

소 난포란의 체외수정에 의한 최초의 산자는 체내 성숙난자(Sirard 등, 1985; Brackett 등, 1982)와 체외성숙난자(Utsumi 등, 1988; Crister 등, 1986)를 체외수정 후 다른 축종의 난관에서 배발달을 시켜 이를 수란우에 이식하여 산자를 얻었다. 현재와 같은 체외배양조건으로 체외성숙, 수정 및 배발달한 체외수정

란을 이식하여 산자 생산의 보고는 다수 있었다(Van Soom 등, 1994; 황 등, 1993; Reichenbach 등, 1992; Jiang 등, 1991; Xu 등, 1990; Lu 등, 1990; Kajihara 등, 1990; Eyestone과 First, 1989; Goto 등, 1988). 이와 같은 체외수정란의 생산기법을 정립함으로써 저렴한 가격으로 대량생산이 가능하게 되었다. 이렇게 생산된 체외수정란을 이용하여 복제동물의 생산, 형질전환동물의 생산 및 발생공학적인 분야에 매우 유익하게 활용할 수 있을 것이다(Keefer 등,

* 경상대학교 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

** 경상대학교 과학교육과(Department of Science Education, Gyeongsang National University)

*** 이 연구는 1992년도 한국과학재단에서 지원한 목적기초 연구사업비(KOSEF:92-24-00-10)의 일부 지원으로 수행되었음.

1994; Koyama 등, 1994; Rexroad, 1989; Seidel과 Peter, 1989; Leibfried-Rutledge 등, 1986). 또한 저능력 유우에 경제성이 높은 고능력우 및 한우 등을 이식하여 산자를 생산함으로써 경제성을 도모할 수 있을 것이다. Jiang 등(1991)은 66%의 임신율과 임신된 것 중에서 50%의 쌍둥이로 수태되어 실용화를 앞당겨 놓았다. Van Soom 등(1994)은 벨기에의 육우 생산을 위하여 유우에 육우의 체외수정란을 이식하여 약 55.6%의 임신율과 33.3%의 산자생산을 보고하였다. 그들은 유우와 유우와의 가격차이가 4배 정도 나기 때문에 경제적인 측면에서 충분히 가치가 있다고 보고하였다. 세계적인 UR 개방화 시대에서 우리의 현실에서도 유우고기의 가격하락을 예상할 수 있으며, 이러한 낙농가의 염려를 줄여줄 수 있는 방안이 저능력 유우의 자궁에 한우 체외수정란을 이식하여 산자를 생산할 수 있다면 낙농가의 소득증대에 상당히 기여할 것으로 사료된다.

본 연구는 한우 체외수정란의 생산기법을 정립하고 아울러 이 기법으로 생산된 체외수정란을 저능력유우에 이식하여 한우의 산자를 생산하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시난자의 채취

난소는 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 함유된 생리식염수(25~28℃)에 넣어 2 시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포란은 중난포(직경 2~6 mm)에서 채취하였으며 4~5 회 기본용액(TCM-199 + 10% FCS)으로 세척하여 난포란의 선발은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 난구세포층과 세포질의 충실도에 따라 실시하였다. 즉, 도립현미경(Olympus, 일본) 하에서 4~5 층의 난구세포층이 충만하면서 균일한 세포질을 가진 것을 Grade I, 2~3 층의 난구세포층을 가진 것을 Grade II, 부분적으로 나뉘어진 것을 Grade III으로 구분하였으며, Grade I 과 II의 난포란만을 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙 배양액 과 체외성숙

체외성숙 배양액은 TCM-199 배양액에 sodium

pyruvate(56 µg/ml), streptomycin(100 µg/ml), penicillin G(100 units/ml)와 hormone으로는 LH(10 µg/ml), estradiol-17β(1 µg/ml), FSH(35 µg/ml)를 첨가하였고 혈청으로는 10% FCS를 첨가하였다. 이와 같이 준비된 체외성숙 배양액은 4-well dish에 1 ml씩 분주하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ CO₂ incubator에서 18 시간 이상 전배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 체외성숙시 과립막세포도 2~3 × 10⁶ cells/ml의 농도로 난포란과 같이 약 24~26 시간 동안 공배양을 실시하여 난구세포의 팽창과 세포질의 충실도 등으로 체외성숙을 판정하여 체외수정에 공시여부를 판단하였다.

3. 정자준비 와 체외수정

체외수정을 위한 정자의 준비는 정소상체미부 정자로서 caffeine(10 µM)이 첨가된 세척용 B. O. medium으로 60 분 동안 swimming-up을 유도하여 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500×g로 1 회 원심분리한 후, 수정능획득을 위하여 BSA(5 mg/ml), caffeine(5 mM) 및 heparin(10 µg/ml)이 첨가된 수정용 B. O. medium을 5 ml 첨가하여 다시 500×g로 원심분리한 후 약 1 ml의 수정용 B. O. medium을 첨가하여 CO₂ incubator에서 10~15 분간 수정능획득을 유도하였다. 체외수정은 성숙된 난포란을 수정용 B. O. medium으로 3~4 회 세척한 다음 수정용 B. O. medium 100 µl drop 당 10~15 개의 난자를 옮긴 후 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 2~3 × 10⁶ sperms/ml이 되게 첨가시켜 약 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 수정을 유도하였다.

4. 수정란의 체외배양

체외수정 후 회수된 수정란을 TCM-199 배양액으로 4~5 회 세척하여 잔여 난구세포와 정자를 제거한 후에 단층을 형성하고 있는 난관상피세포와 공배양시키면서 48 시간마다 신선배양액으로 교환하였으며, 5 일이 경과한 monolayer cells은 신선한 monolayer cells로 교환하면서 이식 가능한 후기배로의 배발달을 유도하였다.

5. 공배양을 위한 난관상피세포와 과립막세포의 준비

1) 과립막세포의 준비

대난포(직경 10 mm 이상)에서 난포액과 함께 과립막세포를 채취하여 TCM-199 배양액으로 500×g에서 5 분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 나머지 pellet 부분은 다시 2 회 이상 세척하여 pellet 부분을 재부유시켜 2~3 × 10⁶ cells/ml의 최종농도로 조정하여 48 시간동안 배양시켜 monolayer cells 형성을 유도하였다.

2) 난관상피세포의 준비

도축장에서 수집한 난관을 생리식염수에 담아 오염방지를 위하여 얼음위에서 실험실로 운반하여 항생제가 함유된 생리식염수로 세척하여 멸균된 휴지로 난관 표면을 닦고 멸균된 수술기구로 결합조직과 지방덩이를 철저히 제거한 다음 다시 생리식염수로 세척하여 오염 가능성이 있는 양 끝부분의 약 1 cm 정도를 절단한 후에 난관협부에서 누두부쪽으로 10 ml syringe에 TCM-199 medium으로 약 1 ml을 관류시킨 후 핀셋으로 난관을 압착하면서 난관상피세포를 채취하였다. 채취한 상피세포는 500 × g에서 5 분간 원심분리시켜 상층액을 제거하고 나머지 pellet 부분을 2 회 이상 세척하여 2~3 × 10⁶ cells/ml의 최종농도로 조정하여 48 시간동안 배양시킴으로써 monolayer cells의 형성을 유도하였다.

6. 수정란이식을 위한 수란우의 준비

수정란이식을 위한 수란우는 Holstein 유우(이하 수란우)로서 경남 합천군 가야 소재의 강태옥씨 소유의 농장에서 사육되고 있는 수란우를 이용하였다. 수란우의 선발조건으로는 정상적인 발정발현과 임상적 소견으로 번식장해가 없다고 인정되는 저능력유우를 대상으로 하였다. 농가에서 발정발현 즉시 본 연구실에 신고하면 신고받은 후 7~8일 후에 이식을 실시하였으며, 이식전에 직장검사를 실시하여 황체의 존재유무와 크기, 위치 및 자궁과 난소의 상태를 점검 기록하였다. 또한 임상적 진단결과 수란우로서 적합하다고 판단되는 소를 수란우로 선발 이용하였다.

7 체외수정란의 이식

이식할 수정란은 체외성숙, 수정 및 배발달시킨 배

반포기배를 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 0.25 ml straw에 장착시켜 봉한 후 30℃ 전후의 보온병에 넣어 이식장소까지 수송하였다. 이때 수정란이 장착된 straw는 출발전 충분히 gashing시켰으며 보온병의 물과 직접 접촉되지 않게 straw를 다른 용기에 넣어 밀봉하여 보온병에 넣어 수송하였다. 수정란 이식을 위하여 수란우에게 먼저 2% lidocaine액 10 ml을 경막외마취를 실시하였으며, 오염방지를 위하여 외음부와 주위를 70% alcohol sponge로 세정하였다. 이식방법은 Curtis(1990)의 방법에 준하여 straw가 장착된 수정란이식 기구를 이용한 비외과적 자궁경관 경유법으로 황체가 존재하는 자궁각 선단부의 상부에 이식하였다. 이때 이식기구의 자궁경관 통과시 출혈과 자궁상피조직의 상처를 방지하기 위하여 격심한 자극은 삼가하고 부드럽게 조작하여야 한다. 수태여부의 판정은 이식후 재발정여부를 관찰하여 재발정발현이 없는 수란우는 예외 주시하면서 약 60일경에 직장검사법으로 수태여부를 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

한우 난포란의 체외성숙, 수정 및 배양하여 얻은 체외수정란을 Holstein 유우에 이식하여 293일만에 42.5 kg의 건강한 한우 암소를 분만하는데 성공하였다(Fig. 1). 한우 난포란의 체외성숙, 수정 및 배양은 공동(1994)의 방법에 준하여 이식 가능한 후기배의 생산을 시도하였다. 난포란의 체외성숙율은 약 93%의 성숙율과 이를 정소상체미부 정자와 약 12~24 시간 정도 체외수정을 유도하여 약 7~8일 동안 난관상피세포와 공배양으로 배발달을 유도하면 약 85%이상의 분할율과 약 38%의 이식 가능한 후기배로의 발달율을 보여 안정적인 생산기반을 확립하였다. 체외수정란의 체외배양시 8~16 세포기의 "cell block"현상을 극복하기 위하여 난관상피세포와의 공배양을 실시하여 이의 극복을 유도하였다. Rexroad(1989)는 공배양시 monolayer cells의 역할은 분명하지 않지만 필요한 대사물질, 성장촉진 인자의 제공 및 배양액 내의 독성 물질의 제거 등과 같은 역할을 한다고 하였으며, Kane 등(1992)은 공배양이 배 발달에 유리한 점으로는 helper cells들이 배의 유사분열 촉진물질을 생산하며 세포의 물질들은 배분화를 촉진하는데 도움을 주

며 또한 배양액에서 생성될 수 있는 독성물질들을 제거하는 역할을 한다는 가설을 제시하였다.

대부분의 체외세포들의 배양시 자연상태에서는 필요치 않은 비특이적 growth factor들을 분비하는데 이러한 물질들이 다양한 세포들의 체외발달을 촉진하는 역할을 하는 것이라고 하였다(Gandolfi 등, 1989; Menezes 등, 1990; Rexroad와 Powell, 1991). 또한 helper cells들의 산물은 배의 분할을 자극하는 것이 아니고 적당한 체외 배분화를 지원하는 세포외 물질들을 생산한다고 하는 가설인데, 그러한 요인들은 다른 세포들보다 특히 난관과 자궁의 생식기관 세포들로부터 쉽게 이용 가능할 것이다. 여러가지의 상피세포들과 공배양을 실시해 본 결과 분할율에는 비슷한 결과를 얻었지만 이식 후 임신율에는 난관, 자궁 상피세포들과의 공배양이 다른 상피세포들과의 공배양보다 유의적으로 높은 결과를 얻었다(Rexroad, 1989; Gandolfi 등, 1989).

체외수정란의 이식은 Curtis(1990)의 방법에 준하여 비외과적인 자궁경관 경유법으로 자궁각 선단부의 상부에 이식하였다. 이때 이식기구의 자궁경관 통과시 출혈과 자궁상피조직에 상처를 방지하기 위하여 격심

한 자극은 삼가하고 부드럽게 조작하였다. 수태여부의 판정은 이식후 재발정 여부를 관찰하여 재발정발현이 없는 수란우는 예의 주시하면서 약 60일경에 직장검사 방법으로 수태여부를 판정하였다.

소의 체외수정란 이식에 의한 최초의 산자생산은 Brackett 등(1982)에 의하여 보고되었으나 이때는 8~16 cell block 현상때문에 수술적인 방법으로 이식하였으며, 그 이후 수정란을 이중인 면양 및 토끼의 난관에서 배양 후 이식하여 산자생산을 보고하였다. 그 이후 현재와 같은 체외성숙, 수정 및 배발달을 유도한 체외수정란을 비외과적으로 이식하여 생산된 최초의 산자는 Goto 등(1988)에 의해서였다. 이후 체외수정란을 이용한 산자생산은 많은 연구기관에서 보고되었다(Fukuda 등, 1990; Kajihara 등, 1990; Xu 등, 1990; Takeda 등, 1991; Jiang 등, 1991; Kajihara 등, 1992; Reichenbach 등, 1992; Van Soom 등, 1994). 국내에서도 황 등(1993)에 의한 최초의 산자를 생산한 바 있으나 일대잡종(한우♂ × 유우♀)이었으나 본 연구진에서는 비외과적인 이식방법으로 순수 한우(한우♀ × 한우♂)를 생산하였다.

Jiang 등(1991)은 66%(22/32)의 임신율과 임신



Fig. 1. A birth of calf after of bovine embryos produced by IVM-IVF-IVC.

Table 1. Pregnancy after transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization, culture

| Recipient cows | Day of estrus | Day of embryo transfer | Side of uterine horn(CL) | Stage of embryos transferred | Diagnosis |
|----------------|---------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------|
| 1 | 18 April '93 | 24 April '93 | Right | Blastocyst | Non-pregnant |
| 2 | 22 April '93 | 30 April '93 | Right | Blastocyst | Non-pregnant |
| 3 | 24 April '93 | 1 May '93 | Right | Blastocyst | Non-pregnant |
| 4 | 9 May '93 | 16 May '93 | Left | Blastocyst | Non-pregnant |
| 5 | 3 June '93 | 11 June '93 | Right | Blastocyst | Non-pregnant |
| 6 | 6 June '93 | 13 June '93 | Right | Morula | Non-pregnant |
| 7 | 2 Aug. '93 | 10 Aug. '93 | Left | Blastocyst | Non-pregnant |
| 8 | 5 Aug. '93 | 13 Aug. '93 | Right | Blastocyst | Pregnant |

Table 2. Sex, weight and characteristics of Korean native calf produced by *in vitro* maturation, fertilization and culture

| Sex of calf | Birth weight (kg) | Day of transfer / Day of parturition | Gestation length (days) | Coat color |
|-------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------------|------------|
| Female | 42.5 | '93, 8, 13 / '94. 5.26 | 293 | Yellow |

한 것 중에서 50%(11/22)의 쌍둥이의 임신율을 보고하여 실용화 단계까지 이루었다고 보고하였다. 이와 같이 높은 수태율을 얻기 위하여는 우선 양질의 체외 수정란을 생산할 수 있는 기반의 정립과, 수란우의 선발기준을 엄격히 적용하여 적합한 수란우의 선발이 선행되어야 할 것이며 아울러 이식시 수란우에 최소한의 자극으로 이식할 수 있는 능숙한 이식기술자가 요구된다. 현실적으로 우리나라의 여건에서 가장 어려운 문제는 적합한 수란우의 선발이라고 사료된다. 대단위 목장 등에서 실험적으로 제공하지 않는 실정에서 연구기관에서 보유하고 있는 소에서 수란우의 선발은 별 의미가 없으며 또한 중·소규모의 목장에서 제공되는 수란우는 선발기준을 엄격히 적용할 수 없는 현실이라 상당히 어려움이 뒤따른다고 사료된다.

본 연구진에서 수정란이식에 이용한 수란우는 당시 약 3세 가량의 1산차였으며 직장검진 결과 오른쪽의 난소에 황체가 존재하였으며 자궁과 난소 등에서도 수란우로서의 조건에 적합하였다. 수정란이식시 꼬리의

흔들림 등으로 작업의 방해가 없애기 위하여 lidocaine으로 경막외마취를 실시한 후 이식기구의 오염방지를 위하여 외음부와 그 주위를 깨끗하게 세척 및 소독하여 마취 후 약 10분경에 이식을 시작하였다. 이때 자궁경관과 자궁내막의 상처로 인한 출혈을 방지하기 위하여 세심한 주의를 기울리면서 주입하였다. 이식은 상실배 및 배반포기배 2개를 황체가 촉진되는 쪽의 자궁각 상단부위에 이식한 결과는 Table 1에서와 같이 8마리째 임신되었고, 이것이 분만까지 성공되었다. 이렇게 실시하여 생산된 한우 송아지는 Table 2에서와 같이 293일의 임신기간만에 생시체중 42.5 kg의 건강한 암컷이었다. 한우의 평균 임신기간 285일보다 약 7일정도 임신기간이 길었으며, 생시체중도 평균 25 kg보다 훨씬 많았다. 임신기간의 연장은 체외수정란이었기 때문에 착상 가능한 할구수까지 체내에서의 발달에 의한 착상지연때문이라고 판단되며, 체중의 증가도 수란우가 젖소이었기 때문에 상대적으로 한우의 자궁용적보다 더 크기 때문이라고 사료된다.

IV. 적 요

한우 난포란의 체외성숙, 수정 및 배양시킨 체외수정란을 유우에 이식하여 한우를 생산하였다. 체외수정란을 안정적으로 생산하기 위하여 난포란의 채취시 부터 철저히 등급별로 구분하여 이용하였으며, 후기배로의 발달율을 높이기 위하여 난관상피세포 등과 공배양을 실시하여 이식 가능한 후기배로의 발달율을 향상시킬 수 있었다. 수란우는 Holstein으로 발정 7~8일째에 상실배 및 배반포기배 2개를 황체가 존재하는 쪽의 자궁에 이식한 결과 8마리째에 임신이 되었으며, 약 293일의 임신기간만에 생시체중 42.5 kg의 건강한 한우 암컷 송아지를 분만하였다.

사 사

본 연구를 위하여 수란우들을 제공하여 주신 서부경남 여러 낙농가들에게 깊은 감사를 드리며 특히, 경남 함천군 가야의 강태욱씨께 감사드리고, 아울러 난소 채취를 위하여 협조하여 주신 김해, 진주, 하동 도축장의 관계자 분들께도 감사를 드립니다.

V. 인용문헌

1. Brackett, B. G., D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans and M. A. Dresel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27:147-158.
2. Critser, E. S., M. L. Leibfried-Rutledge, W. H. Eyestone, D. L. Northey and N. L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology 25:150(Abstract).
3. Curtis, J. L. 1990. Cattle embryo transfer procedure. ISBN. U. S. A.
4. 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.
5. 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.
6. Gandolfi, F., T. A. L. Brevini and R. M. Moor. 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development. J. Reprod. Fert. Suppl. 38:107-115.
7. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, 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.
8. Hanada, A. 1986. *In vitro* fertilization of bovine oocytes. Consultant for Animal Science. 258:10-15(in Japanese).
9. Jiang, H. S., W. L. Wang, K. H. Lu, I. Gordon and C. Polge. 1991. Roles of different cells monolayers in the co-culture of IVF bovine embryos. Theriogenology 35:216(Abstract).
10. Kajihara, Y., N. Kometani, S. Kobayashi, Y. Shitanaka, Y. Koshihara, L. Hishiyama, K. Shiraiwa and K. Goto. 1990. Pregnancy rate and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. Theriogenology 33:264(Abstract).
11. Kajihara, Y., N. Kometani, Y. Shitanaka, S. Saito, Y. Yamaguchi, K. Hishiyama and M. Endo. 1992. Pregnancy rates and births after the direct transfers of frozen-thawed bovine IVF embryos. Theriogenology 37:233(Abstract).
12. Kane, M. T., E. W. Carney and J. E. Ellington. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in devel-

- opment of preimplantation embryos *in vitro*. Theriogenology 38:298-313.
13. Keefer, C. L., S. L. Stice and D. L. Matthews. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. Biol. Reprod. 50:935-939.
 14. Koyama, H., H. Suzuki, X. Yang, S. Jiang and R. H. Foote. 1994. Analysis of polarity of bovine and rabbit embryos by scanning electron microscopy. Biol. Reprod. 50:163-170.
 15. Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Crister and N. L. First. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biol. Reprod. 35:850-857.
 16. Lu, K. H., H. S. Jiang, W. L. Wang and I. Gordon. 1990. Pregnancies established in cattle by transfer of fresh and frozen embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of oocytes and their subsequent culture. Theriogenology 33:278(Abstract).
 17. Menezo, Y. Z. R., J. F. Guerin and J. C. Czyba. 1990. Improvement of human early development *in vitro* by co-culture on monolayers of vero cells. Biol. Reprod. 42:301-306.
 18. Reichenbach, H. D., J. Leibrich, U. Berg and G. Brem. 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 95:363-370.
 19. Rexroad, C. E. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. Theriogenology 31:105-114.
 20. Rexroad, C. E., Jr and A. M. Powell. 1991. Effect of serum-free co-culture and synchrony of recipients on development of cultured sheep embryos to fetuses. J. Anim. Sci. 69:2066-2072.
 21. Seidel, G. E. Jr. and R. Peter Elsdén. 1989. Embryo transfer in dairy cattle. Hoard's Dairyman, U. S. A.
 22. Sirard, M. A. and R. D. Lambert. 1986. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. Vet. Rec. 119:167-169.
 23. Sirard, M. A., R. D. Lambert, D. P. Menard and M. Bedoya. 1985. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in the rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. J. Reprod. Fert. 75:551-556.
 24. Takeda, N., N. Ohisa, T. Numabe and Y. Ishikawa. 1991. Production of twin calves by transfer of embryos *in vitro*. Vet. Rec. 128:307.
 25. Utsumi, K., H. Katoh and A. Iritani. 1988. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. Theriogenology 29:320(Abstract).
 26. Van Soom, A., P. Mijten, I. Van Vlaenderen, J. Van den Branden, A. R. Mahmoudzadeh and A. de Kruif. 1994. Birth of double muscled belgian blue calves after transfer of *in vitro* produced embryos into dairy cattle. Theriogenology 41:855-867.
 27. 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.
 28. Xu, K. P., J. W. Pollard, R. W. Rorie, L. Plante, W. A. King and K. J. Betteridge. 1990. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. Theriogenology 33:351(Abstract).
 29. 공일근, 주영국, 이효중, 꺾대오, 박충생. 1994. 초기배의 발달속도에 따른 후기배로의 배 발달율.

수정란이식학회지. 9:15-21.

30. 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지. 8:143~149. 수정자