

체외에서 생산된 소 수정란의 발생일령별 동결융해 후 생존성과 발생능에 관한 연구

이명식 · 장원경 · 박수봉 · 박진기
축산기술연구소

Survival and Developmental Rates of IVM-IVF Bovine Blastocysts Frozen and Thawed According to the Developmental Days

M. S. Lee, W. K. Chang, S. B. Park and J. K. Park

National Livestock Research Institute

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of equilibration time, sucrose concentration and age of embryo on survival and developmental rates of bovine IVF expanding blastocysts frozen-thawed by direct transfer method. The bovine oocytes were collected from 2~5mm follicles, matured for 20~24hrs in 5% CO₂ incubator and then fertilized with frozen-thawed semen. Expanding blastocysts at day 7, 8, 9, 10 and 11 after IVF were frozen in 1.8M ethylene glycol(EG). Survival and hatching rates of frozen-thawed IVF embryos were examined. The results were as follow : Survival and hatching rate of IVF expanding blastocysts after 10, 20, 30min exposure in 1.8M EG were 100,0, 90.9, 47.1, 85.0, 75.0 and 62.5% respectively. Survival rates of IVF expanding blastocysts frozen with 1.8M EG and various concentration(0, 0.25, 0.5, 1M) of sucrose were 73.3, 25.0, 16.7, 9.1% respectively. Survival and hatching rates of IVF expanding blastocysts frozen-thawed according to age of embryo(Day 7, 8, 9, 10, 11) were 86.1, 84.8, 79.3, 61.4, 51.3, 74.2, 76.9, 71.7, 63.0 and 65.0% respectively.

In conclusion, the age of the embryo(Day 7, 8) is very important for the successful freezing of IVF bovine embryos and 1.8M ethylene glycol not containing sucrose may be effective cryoprotectant for direct transfer method.

(Key words : bovine, IVF, expanding blastocysts, frozen-thawed, direct transfer)

서 론

소에 있어서 수정란 이식기술의 산업적 이용이 현실화됨에 따라 체외성숙된 난포란을 이용한 체외 수정 및 배양에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생식 생리학적인 지식이 축적되면서 최근에는 단순 배양법(Rosenkrans 등, 1990; Fukui 등, 1991) 및

다양한 종류의 체세포를 이용한 공동배양법(Goto 등, 1988; Voelkel & Hu, 1992; Hawk & Wall, 1994) 등을 사용하여 체외성숙, 수정된 소의 수정란을 자궁내로 이식이 가능한 상실기배나 배반포기배까지 생산이 가능하게 되었다. 또한 이와 같은 방법으로 생산된 체외수정란을 대리모에 이식하여 건강한 송아지 생산이 보고됨(Goto 등, 1988; Lu 등, 1990., Xu 등, 1992)에 따라 체외성숙 난포란을 이

용한 소 수정란의 대량생산 기술은 수정란이식 및 핵이식, 외래유전자 도입 등에 의한 가축생산 등 생명공학적인 첨단기술을 연구하는데 있어서 유용한 방법이 되고 있다. 또한 체외성숙, 수정된 수정란의 이용성은 동결보존을 통하여 증대될 수 있으며, 동결보존방법의 정립은 수정란 이식사업을 산업화하는데 있어서도 중요한 요소가 되고 있다.

소 수정란의 동결보존은 주로 체내수정란을 이용한 방법이 개발되었고, 체외수정란을 이용한 연구는 아직까지 미비한 상태이다. 일반적으로 소 수정란의 동결융해 후 생존성은 수정란의 발달단계, 사용된 항동해제, 동결과정중 냉각온도, 평형방법이나 항동해제의 제거 방법에 영향을 받게 된다(Tachikawa 등, 1991; Voelkel & Hu, 1992). 가장 보편화된 소 수정란의 동결방법은 glycerol을 이용한 다단계 평형법으로 융해 후 체외배양이나 자궁내 이식을 위하여 동결의 역순으로 항동해제를 제거해야 하는 복잡한 단계를 거쳐야 했다. 최근에는 이러한 다단계 처리로 야기되는 문제점을 개선하는 방법으로 glycerol(Massip 등, 1987)이나 propylene glycol(Suzuki 등, 1990), ethylene glycol(Voelkel & Hu, 1992) 등의 항동해제를 사용하여 융해 후 희석이나 항동해제의 제거없이 이식하는 직접이식법이 개발되었다. 그러나 아직까지 직접이식을 위한 동결방법에 있어서 적절한 항동해제의 농도나 수정란의 발생 일령에 따른 동결융해 후 생존성과 배발달 가능성에 대해서는 명확한 의견이 제시되고 있지 않다.

본 연구는 소 체외 수정란의 직접이식을 위한 동결보존시 적절한 항동해제 및 동결방법과 수정란의 체외배양 일령에 따라 동결융해 후 생존성과 배발생능을 알아보기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채란 및 체외성숙

도축된 한우 암소(임신우 포함)로부터 채취한 난소를 항생제가 첨가된 생리적 식염수로 2~3회 세척한 후 25~32℃의 온도를 유지하여 37℃ 항온 실험실로 운반하였다. 18 gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 직경 2~5mm의 난포로부터

난포란을 흡입채란하여 실험현미경하에서 난구세포층이 충실하게 부착되고 세포질이 응축되지 않은 난포란만을 선별하여 체외성숙배양을 실시하였다.

난포란의 체외성숙은 TCM 199(Gibco, USA)에 5%의 fetal calf serum(이하; FCS)과 1%의 antibiotic antimycotic(Sigma, USA)을 첨가한 후 0.22 μ m millipore filter(Gelman)로 여과된 배양액 400 μ l 소적에 50~70개의 난포란을 넣어 38.5℃, 5% CO₂ 배양기내에서 20~24시간 동안 배양하여 성숙시켰다.

2. 정자처리 및 체외수정

본 연구에서는 체외수정시 축협중앙회 개량사업본부 한우개량부에서 생산된 한우 냉동정액을 사용하였다. 동결, 융해된 정액의 처리는 기본 배양액으로 BO(Brackett & Oliphant, 1975)액을 이용하여 이 등(1993)의 정자처리법에 의거하여 시행하였다. 즉, caffeine 5mM이 첨가된 정자세척용 BO액을 사용하여 정자혼합액을 세척한 후 정자피에 BSA 5mg/ml, heparin 10 μ g/ml, caffeine 2.5mM이 첨가된 수정용 BO액을 추가하여 30분간 swim-up 시켰다. Swim-up 후 체외성숙된 10~12개의 난포란을 함유하고 있는 수정용 BO액(100 μ l)내의 운동성 정자의 최종농도가 1~2 \times 10⁶/ml 되도록 조정하여 38.5℃, 5% CO₂ 배양기내에서 6~12시간 수정시켰다.

3. 체외수정란의 배양

체외수정 후 난구세포(cumulus cell)가 덮여 있는 1세포기 수정란을 5%의 FCS가 함유된 TCM 199 성장 배양액으로 옮겨 38.5℃, 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다. 수정 후 40~42시간 후에 난구세포로부터 수정란을 유리하여 배아의 난할(cleavage of oocyte)을 관찰하였으며, 2세포기 이상으로 발달된 배아만을 선별하여 배양접시 저면에 확산된 난구세포와의 공배양을 실시하였다. 배양액은 48시간 간격으로 신선한 배양액으로 교체하였고 공배양 세포와 수정란과의 과도한 부착을 방지하기 위하여 24시간마다 배양접시를 흔들어서 분리시켰다. 이와 같은 방법으로 11일간 배양하면서 확장배반포(ex-

panded blastocyst) 이상으로 발달한 수정란중 현미경하에서 정상적인 형태의 수정란만을 동결에 사용하였다.

4. 수정란의 동결 및 융해

동결액은 20%의 FCS가 포함된 embryo transfer freezing medium(Gibco, USA)에 항동해제로서 ethylene glycol(EG) 1.8M과 sucrose를 농도별(0, 0.25, 0.5, 1M)로 첨가하여 사용하였다. 이들 중에서 수정란의 생존율이 가장 높은 항동해제를 선택하여 다음 실험들의 기본 항동해제로 사용하였다. 동결방법은 신선한 성장배양액으로 2~3회 세척된 확장 배반포기 수정란을 20℃로 유지된 동결액으로 옮겨 10~20분간 평형시킨 후 0.25ml straw에 주입하고, 세포동결기를 이용하여 -7℃에서 2분간 정지한 후 식빙하고 10~20분간 평형시킨 후 -31℃까지 분당 -0.3℃로 냉각하여 직접 액체질소에 넣는 방법으로 하였다. 융해는 동결보존 2~3일 후 액체질소에서 바로 20℃ 증류수로 옮겨 실시하였고 회수된 수정란을 신선한 성장배양액으로 5~6회 세척하여 항동해제를 제거하였다. 이 후 항동해제가 제거된 수정란을 상기의 배양방법에 따라 72시간 이상 CO₂ 배양기내에서 배양하면서 배반포강이 정상적으로 재형성되고 확장배반포로 발육되는 수정란을 생존한 것으로 판단하였다.

결 과

Embryo transfer freezing medium(Gibco, USA)에 20% FCS와 1.8M EG이 첨가된 동결액에서 노출시간별 소 체외수정 확장배반포의 생존율은 10, 20, 30분 노출 후 각각 100.0, 90.9, 47.1%이었으며, 난구세포와의 7일간 공배양 후 부화율은 각각 85.0, 75.0, 62.5%로서 노출시간 10분 처리에서 가장 높게 나타났다 (Table 1).

동결액에 sucrose의 첨가 농도에 따른 동결 융해 후 생존율은 0, 0.25, 0.5, 1M 첨가에서 각각 73.3, 25.0, 16.7, 9.1%로서 무첨가군에서 가장 높은 생존율을 나타냈다(Table 2).

항동해제로 1.8M EG만을 사용하여 평형시간을 20℃에서 10분간 실시한 후 동결 융해된 소 체외수

Table 1. Survival and hatching rates of bovine IVF blastocysts according to exposure time of 1.8M EG

Time of Exposure (min)	No. of blastocysts ^a	Survival rates ^b (%)	Hatching rates ^c (%)
10	20	20 (100.0)	17 (85.0)
20	22	20 (90.0)	15 (75.0)
30	17	8 (47.1)	5 (62.5)

Experiments were contemporaneously repeated 3 times in each group.

^a Expanding blastocysts.

^b No. of embryos reformed blastocoele / No. of embryos.

^c No. of embryos hatched / No. of embryos reformed blastocoele.

Hatching rates were assessed 5 days post-treatment.

Table 2. Survival rates of bovine IVF blastocyst frozen on various concentration of sucrose

Conc. of sucrose (M)	No. of embryo ^a	Survival rates ^b (%)
0	15	11 (73.3)
0.25	12	3 (25.0)
0.5	12	2 (16.7)
1	11	1 (9.1)

Experiments were contemporaneously repeated 3 times in each group.

Basic solution was composed of 1.8M EG, 20% FCS in embryo transfer freezing medium.

^a Expanding blastocysts.

^b No. of embryos reformed blastocoele / No. of embryos frozen.

정 확장 배반포(Fig. 1)의 발생일령별 생존율은 7, 8, 9, 10, 11일령 배반포에 있어서 각각 86.1, 84.8, 79.3, 61.4, 51.3%이었고, 동결 융해하여 난구세포와의 5일간 공배양 후 관찰된 난부화율(Fig. 2)은 7, 8, 9, 10, 11일령 배반포에 있어서 각각 74.2, 76.9, 71.7, 63.0, 65.0%이었다 (Table 3).

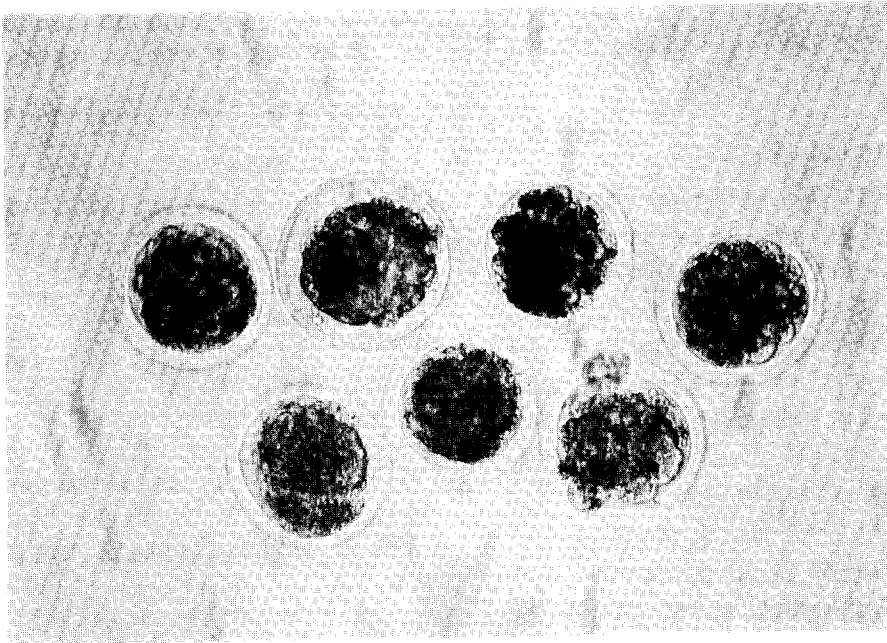


Fig. 1. Bovine IVF blastocysts after frozen-thawed($\times 100$).

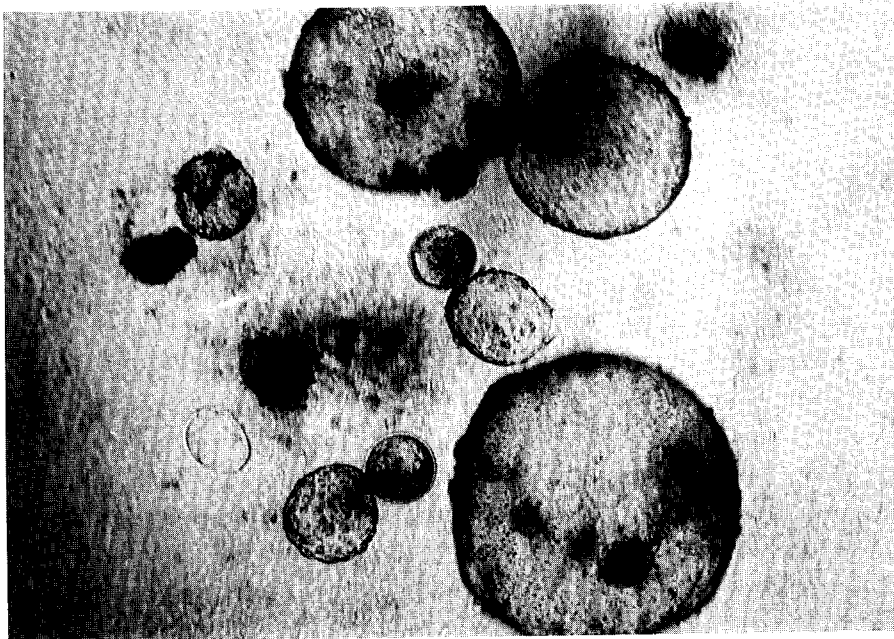


Fig. 2. Hatched bovine IVF blastocysts after culture for 5 days post-thawing($\times 40$).

Table 3. Survival and hatching rates of frozen-thawed bovine IVF blastocysts according to developmental days

Days ^a of culture	No. of frozen blastocysts ^b	No. of normal morphologic blastocysts post thawing	Survival rates ^c (%)	Hatching rates ^d (%)
Day 7	36	35 (97.2)	31 (86.1)	23 (74.2)
Day 8	46	46 (100.0)	39 (84.8)	30 (76.9)
Day 9	58	55 (94.8)	46 (79.3)	33 (71.7)
Day 10	44	41 (93.2)	27 (61.4)	17 (63.0)
Day 11	39	37 (94.9)	20 (51.3)	13 (65.0)

Experiments were contemporaneously repeated 7 times in each group.

^a Day 0 = day of IVF.

^b Expanding blastocyst.

^c No. of embryos reformed blastocoele / No. of embryos frozen.

^d No. of embryos hatched / No. of embryos reformed blastocoele. hatching rates were assessed 5 days post-thawing.

고 찰

소에 있어서 체외수정란의 동결보존은 수정란 이식사업의 산업화와 발생공학적인 연구수행에 있어서 필수적인 기술로 요구된다. 일반적으로 가장 이상적인 수정란의 동결방법은 시행이 간편하고, 경제적이며 효율성이 있는 방법이라 할 수 있다. 최근에는 냉동생물학의 활발한 연구를 통하여 동결시 삼투압 충격(osmotic shock)이나 세포내 독성이 적은 항동해제가 개발되었고 이를 이용한 소의 수정란 이식시 인공수정과 같은 방법으로 동결수정란을 간편하게 이식하는 직접이식법이 개발되었다(Suzuki 등, 1990). 그러나 체내 및 체외수정란을 이용한 동결 용해 후 직접이식방법을 통하여 높은 임신율이 보고되고 있지만 아직까지 수정란에 미치는 독성을 최소화할 수 있는 항동해제의 조성 및 동결방법에 있어서는 여러 연구자들간에 있어서 이견이 보고되고 있다(Suzuki 등, 1990; Voelkel & Hu, 1992; Suzuki 등, 1993; 오성종 등, 1995).

직접이식을 위한 소 수정란의 동결시 수정란에 미치는 독성(embryotoxicity)은 항동해제 자체의 유해성, 사용농도 및 세포내 침투율에 따른 삼투압 충격에 의해 야기된다(Friedler 등, 1988). 동결시 수정란의 생존성에 영향을 미치는 항동해제의 세포내 침투율과 유해성 정도는 평형과정 중의 온도, 시간

및 항동해제의 자체 특성에 의하여 영향을 받는다. 일반적으로 수정란의 동결시 항동해제의 침투율을 높이고 동결과정을 간소화하기 위하여 상온에서 항동해제의 평형을 실시한다. 이와 같은 방법은 삼투압 변화에 따른 세포내 독성(embryotoxicity)이 증가될 수 있으므로 평형시간을 최소화 하고 침투율이 높은 항동해제의 사용이나 비침투 항동해제를 병행으로 사용하는 방법이 제안되고 있다(Friedler 등, 1988). 최근 소 수정란의 직접이식을 위한 동결방법으로 Suzuki 등(1990)은 항동해제로서 propylene glycol과 sucrose를 사용하여 61%의 수태율을 보고하였고, Voelkel과 Hu(1992)는 소의 체내수정란을 이용하여 1.5M EG, 1.5M propylene glycol, 1.5M DMSO, 1.4M glycerol 등을 각각 처리한 결과 EG 처리에서 가장 높은 생존율(70~75%)을 보고했다. 또한 소의 체외수정란을 이용한 연구에서는 Suzuki 등(1993)이 여러 가지 항동해제를 비교한 결과 EG 처리에서 가장 높은 수태율을 보였고 EG처리시 농도별 차이에 있어서는 1.5, 2.1M 처리와 비교하여 1.8M EG에서 89.8%의 생존율과 가장 높은 수태율(74%)을 보고하였다.

본 연구에서 1.8M EG를 사용하여 20℃에서 노출 시간별 소 체외수정 배반포의 생존율은 10, 20, 30분 처리에서 각각 100.0, 90.0, 47.1%로 30분 처리에서 급격히 감소됐다. 추가 배양을 통한 탈출 배반포율에서도 처리 시간별 각각 85.0, 75.0, 62.5%로

30분 처리에서 가장 낮은 결과를 나타냈다. 이상의 결과에서 항동해제의 세포내 독성(embryotoxicity) 정도는 노출 시간에 따라 생존율뿐만 아니라 생존 후 수정란의 발생에도 유해한 영향을 미치는 것으로 생각된다.

체외수정 후 9일째 생산된 배반포를 이용하여 동결시 항동해제의 병행처리 효과를 조사한 결과에서는 1.8M EG와 sucrose 첨가 농도별 동결융해 후 생존성은 sucrose 0, 0.25, 0.5, 1M 첨가에서 각각 73.3, 25.0, 16.7, 9.1%로 1.8M EG 단독 처리에서 가장 높았다.

본 연구와 다른 연구자들(Voelkel & Hu, 1992; Suzuki 등, 1993)의 결과를 비교할 때 직접이식을 위한 항동해제로서 EG 단독 처리가 가장 높은 생존율을 얻은 결과와 일치했으며, Suzuki 등(1993)이 체외수정 후 7일째 소 배반포를 이용한 동결 융해시 1.8M EG 사용에서 보고한 생존율(89.8%)과 본 연구에서 동일 일령의 배반포 사용시의 생존율(86.1%)간에 유사한 결과를 나타냈다. 본 연구에서 Sucrose 첨가에 따른 동결 융해 후 생존율이 저하됐던 요인은 EG 자체가 침투성이 높은 제제이며 sucrose의 추가로 인해 동결액의 삼투압이 증가됨에 따라 삼투압 충격(osmotic shock)에 의한 것으로 사료된다.

이식을 위한 수정란의 동결에 있어서는 동결시 사용되는 수정란의 발생단계가 중요한 요소가 된다. 일반적으로 수정란의 발달이 진행된 단계에서는 할구들의 크기가 작고 할구의 수가 많기 때문에 동결시 항동해제의 침투가 용이하며, 어느 정도의 할구들이 손상을 받더라도 온전한 다른 많은 세포들의 분열(mitosis)로 인하여 극복될 수 있다는 점에서 발달이 진행된 수정란의 유용성이 제시되고 있다(Bongso, 1995). 인간 수정란의 동결 융해시 배반포기에 있어서도 초기 배반포배 보다는 더욱 발달이 진행된 확장배반포기에서 더욱 높은 생존율을 보고하고 있으며(Cohen 등, 1985), 소의 수정란에 있어서도 동일한 결과가 보고되고 있다(Takagi 등, 1994; Han 등, 1994).

본 연구에서 체외수정 후 체외배양 일령에 따라 7~11일간 배양된 확장배반포의 동결 융해 후 생존성은 7일령에서 86.1%로 가장 높았으며, 탈출배반

포율도 일령이 낮았던 수정란에서 가장 높게 나타났다. 본 연구에서 나타난 결과는 Takagi 등(1994)이나 Han 등(1994)의 보고와 같이 발생일령별 동결 융해 후 7일령 배반포에서 생존율이 가장 좋았다는 보고들과 일치하는 결과였다. Hardy 등(1994)은 인간의 체외수정란에 있어서 발생일령별 총세포수(total cell number)의 비교시 5와 6일령 배반포에 있어서 각각 평균 60, 85개를 나타냈으며 7일령 배반포에서는 평균 120개로 많은 세포수를 관찰하였다. 그러나 7일령부터 체외배양조건의 부적합 혹은 배반포 내인자(intrinsic factors) 등의 원인으로 죽은 세포의 수가 급격히 증가됨을 보고하였으며, 본 연구에서도 이 같은 원인으로 발생일령이 진행될수록 확장배반포의 동결 융해 후 생존율이 저하된 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 발생속도에 따른 수정란의 질과 연관된 결과로 이식을 위한 동결융해시 양질의 수정란을 선별 이용하는 것이 중요한 점으로 생각된다.

본 연구 결과 소 체외수정란의 직접이식을 위한 동결방법에 있어서는 발생속도가 빠른 양질의 7~8일령 확장배반포의 이용이 효율적이며, 항동해제로서 1.8M EG를 이용한 동결법이 유용한 방법이라 사료된다. 또한 앞으로 소 체외수정란의 직접이식법을 실용화 하기 위해서는 효율적인 동결방법의 개발은 물론 양질의 확장 배반포를 생산하기 위한 개선된 배양체계가 개발되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

소 체외수정란의 직접이식을 위한 동결보존에 있어서 적절한 항동해제와 동결방법 및 수정란의 체외발생일령에 따른 동결 융해 후 생존성과 배발생능을 알아보려고 본 연구를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Embryo transfer freezing medium(Gibco, USA)에 20% FCS와 1.8M EG이 첨가된 동결액에서 노출시간별 소 체외수정 확장 배반포의 생존율은 10, 20, 30분 노출 후 각각 100, 0, 90.9, 47.1%이었으며, 난구세포와의 7일간 공배양 후 부화율은 각각 85.0, 75.0, 62.5%로써 노출시간 10분 처리에서 가장 높게 나타났

다(Table 1).

2. 동결액에 sucrose의 첨가 농도에 따른 동결 용해후 생존율은 0, 0.25, 0.5, 1M 첨가에서 각각 73.3, 25.0, 16.7, 9.1%로서 무첨가군에서 가장 높은 생존율을 나타냈다(Table 2).
3. 항동해제로 1. 8M EG만을 사용하여 평형 시간을 20℃에서 10분간 실시한 후 동결 용해된 소 체외수정 확장 배반포의 발생일령별 생존율은 7, 8, 9, 10, 11일령 배반포에 있어서 각각 86.1, 84.8, 79.3, 61.4, 51.3%이었고, 동결 용해하여 난구세포와의 7일간 공배양 후 관찰된 난부화율은 7, 8, 9, 10, 11일령 배반포에 있어서 각각 74.2, 76.9, 71.7, 63.0, 65.0%이었다 (Table 3).

이상의 결과로서 소 체외수정란의 직접이식을 위한 동결방법에 있어서는 발생속도가 빠른 양질의 7~8일령 확장배반포의 이용이 효율적이며, 항동해제로서 1.8M EG를 이용한 동결법이 유용한 방법이라 사료된다.

참고문헌

- Bongso A. 1995. Blastocyst transfer and freezing : Can this help us to improve the success of assisted reproduction? Singapore J. Obstet. Gynaecol., 26:13-17.
- Brackett B and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
- Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB and Fishel SB. 1985. Pregnancies following the frozen storage of expanded human blastocysts. J. *In Vitro* Fertil. Embryo Transfer., 2:59.
- Friedler S, Giudice LC and Lamb EJ. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil. Steril., 49 : 743-764.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 92:125-131.
- Goto K, Kajihara Y, Koga M, Kosaka S, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fertil., 83:753-758.
- Han YM, Yamashina H, Koyama N, Lee KK and Fukui Y. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. Theriogenology, 42: 645-654.
- Hardy K. 1994. Development of human blastocysts *in vitro*. Ed Bavister BD. Sero Symposium USA, Norwell, Massachusetts, SpringerVerlag, 184.
- Hawk HW and Wall RJ. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. II. Media and co-culture cells. Theriogenology, 41:1585-1594.
- Lu KH, Jiang HS, Wang WL and Cordon I. 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 *in vitro*. Theriogenology, 33:278.
- Massip A, Van Der Zwalmen P and Ectors F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology, 27: 69-79.
- Renard JP, Nguyen BX and Garnier V. 1984. Two-step freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J. Reprod. Fertil., 71:573.
- Rosenkrans CF Jr, Zeng PK, Schoff PK and First NL. 1990. A simple medium for *in vitro* development of bovine embryos. J. Anim. Sci., 68(Suppl):430.
- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H and Oe M. 1993.

- Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology*, 40:651-659.
- Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata A, Matsuoka M, Nishikata Y and Okamoto K. 1990. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryo refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*, 34:1051-1057.
- Takagi M, Otoi T, Boediono A, Saha S and Suzuki T. 1994. Viability of frozen-thawed bovine IVM /IVF embryos in relation to aging using various cryoprotectants. *Theriogenology*, 41:915-921.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology*, 37:1117-1131.
- Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KF and King WA. 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.
- 오성종, 양보석, 이명식, 백광수, 성환후, 정진관, 임경순. 1995. 직접이식을 위한 소 체외수정란의 동결 용해 후 생존성 및 수태율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 19(1):49-54.
- 이명식, 양보석, 정진관, 오성종, 최화식, 박성재, 이근상. 1993. 이식 가능한 소 체외수정란 생산에 관한 연구. *농업과학논문집*, 35:513-516.