

한우 체외 동결 수정란의 융해후 생존성과 직접이식후 수태률에 관한 연구

양보석 · 오성중 · 박원중
농촌진흥청 축산기술연구소

Studies on the Viability of Frozen-thawed *In Vitro* Produced Blastocysts and Pregnancy Rate by Direct Transfer in Hanwoo Cattle

B. S. Yang, S. J. Oh and W. J. Park

National Livestock Research Institute, R.D.A.

SUMMARY

This study was carried out to increase the viability of bovine frozen-thawed *in vitro* produced (IVP) embryos and pregnancy rate by direct transfer method. Cumulus-oocyte complexes were aspirated from excised Hanwoo ovaries and matured in TCM 199 for 20~22 hours at 38.5°C in 2% CO₂ in air. Matured oocytes were fertilized with capacitated sperm for 6 hours and then co-cultured with cumulus cells for 9 days. 63% of the oocytes cultured was cleaved and 29% out of them developed into blastocysts. Good or excellent grade of blastocysts on D 7 or 8 were frozen with 1.8M ethylene glycol as a cryoprotectant for direct transfer. Frozen embryos were thawed at 20°C water for 10 sec following 4~5 second in air. For the survival assay of frozen-thawed IVP blastocysts, they were cultured in TCM 199 supplemented with 100 μ M β -mercaptoethanol and 20% FCS for 72 hours. The percentage of embryos developed to re-expanded or hatched after 72 hours culture was 95, 5 and 77.3%, respectively. When frozen-thawed IVP embryos were transferred to 43 synchronized recipients by direct transfer method, eighteen recipients (41.8%) was pregnant. The highest pregnant was in naturally synchronized recipients (71.4%), but induced estrus by using PRID(29.2%) and PGF₂ α (20.0%) was showed lower pregnancy rate. The pregnancy rate was higher in day 7 blastocysts(56.0%) than day 8 blastocysts(22.2%).

(Key words: *in vitro* produced, blastocyst, frozen-thawed, direct transfer)

서 론

수정란 이식기술은 소의 능력개량을 목적으로 축산 선진국에서는 이미 산업화된 기술이다. 우리나라에서는 1980년대초부터 여러 대학 및 연구소에서 많은 연구가 수행되어 왔지만 현재까지도 수정란이

식에 의한 이식후 수태률은 인공수정에 비하여 낮으며 특히 체외 생산 수정란은 체내 수정란에 비하여 더욱 낮은 실정이다. 따라서 체외수정란을 이용한 수정란 이식의 산업화의 경우에 수태률 증진연구가 절실한 과제이다.

이러한 수정란이식 수태률을 좌우하는 요인으로 Sreenan과 Diskin (1987) 등은 수정란의 자체 요인

으로 수정란 염색체 이상, 공란우 개체의 유전적 차이 그리고 수정란의 연령 및 질, 동결 유무 및 미세 조작 유무 등이 있으며, 모체 요인으로는 공란우와 수란우의 발정동기화 정도, 수란우의 황체크기나 progesterone 수준, 수정란이식 부위와 방법 그리고 수란우의 영양상태 등이 있으며 이외에도 수정란의 배양 유무, 이식 난이도 등이 있다고 보고하였다. 또한 Hasler 등 (1987)은 수태률을 좌우하는 요인으로 이식 시기, 공란우의 연령, 수정란의 질과 발육단계, 체란일시, 발정동기화 정도와 방법 등이 있으며, 이식 계절, 공란우의 비유상태, 다배란처리 시기, 배양시간 (2~24시간), 공란우의 수정률 및 이식회수에 따른 수태 등 차이가 있다고 보고하였다. 그러나 이들 요인들간의 수태에 미치는 효과는 연구자에 따라 다르며 우리나라에서도 수정란의 발육단계와 질, 공란우와 수란우의 발정동기화 정도, 수정란의 동결 유무 등 여러 요인들에 관한 연구가 다수 수행되었다(고 등, 1981; 김 등, 1985; 양, 1994; 오 등, 1995).

그러나 이들 수태와 관련된 요인에 관한 연구들은 과배란처리에 의하여 생산된 수정란을 이용하여 수행되었으므로 최근 산업화 단계에 있는 체외수정 기술에 의하여 생산된 수정란을 이용한 수정란 이식시 수태률을 좌우하는 요인에 관한 연구가 요구되고 있다.

따라서 본 연구는 체외수정에 의하여 생산되는 배반포 이상의 수정란을 이용 금후 산업화를 목적으로 직접이식법에 의하여 수정란을 동결하여 융해 후 체외 생존률 뿐만 아니라 직접이식후 수태률을 수란우의 발정동기화 방법과 체외 배반포 발생 일시와 같은 요인을 중심으로 수태률의 차이를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 수정란의 체외생산

본 시험에 사용된 난포란의 체외성숙·수정 및 배반포의 유도는 축산기술연구소의 관행법 (오 등, 1995; 오, 1997)에 준하였다. 즉 난포란의 체외성숙은 TCM-199 배양액 (Gibco, 미국)에 1ml의 anti-biotic-antimycotic (Gibco, 미국)와 5%의 FCS를

첨가된 성숙배양액을 이용하여 500 μ l의 소적을 만들어 소적당 미성숙 난포란을 각각 70~80개를 넣고 2% CO₂의 38.5 $^{\circ}$ C 배양기에서 20~22시간 동안 배양하였으며 정자의 수정능획득과 체외수정의 기본 배지는 B.O. (Blackett와 Olyphant, 1975)액으로 하여 정자 세척액에는 5mM caffeine-sodium-benzoate (Sigma, 미국)와 10 μ g/ml의 heparin (Sigma, 미국)을 첨가하여 한우 동결정액을 융해후 1,800rpm로 5분간 2회 원심세척하고 체외수정용 B.O.액인 2.5mM caffeine-sodium-benzoate, 10 μ g/ml의 heparin 그리고 20mg/ml의 BSA가 첨가된 B.O.액으로 최종농도가 5 \times 10⁶/ml 되게 조정하여 100 μ l의 소적을 만들어 성숙배양된 난자를 소적당 20개씩 넣고 체외성숙시와 동일한 조건(2% CO₂)하에서 6시간 동안 배양하여 체외수정을 하였다. 또한 체외수정된 난자는 10%의 FCS가 함유된 TCM-199 발생배양액으로 난구세포 주변에 붙어 있는 정자세포를 3~4회 세척하여 제거하고 발생 배양액에서 체외 성숙·수정시와 동일한 조건으로 수정후 9일까지 배양시켰다. 수정란의 정상 발달을 도와주기 위하여 수정란과 난구세포 monolayer를 24시간마다 분리시켜 주었으며 매 48시간마다 신선한 발생 배양액을 이용하여 1/2씩을 교체하여 주었고 수정란의 발달단계는 실제현미경하에서 수정후 48시간째에 관찰하여 난할률을 조사하였으며 배반포 발생률은 체외수정후 9일까지 조사하였고 동결에는 수정후 7일과 8일에 생산된 형태학적으로 정상인 배반포 및 확장배반포배를 (Fig. 1) 선별하여 이용하였다.

2. 체외 수정란의 동결 및 융해

수정란의 동결은 체외수정 후 7~8일에 생산된 형태학적으로 정상인 배반포 이상의 수정란만을 이용하였다. 기본 동결배지로 embryo transfer freezing media (Gibco, 미국)에 20%의 FCS를 첨가한 배양액을 이용하였으며 항동해제로는 융해후 제거 없이 직접이식을 할 수 있는 분자량이 적은 ethylene glycol (Sigma, 미국)을 이용하였다. 수정란은 동결전 기본 배지로 3회 세척을 한 후 1.8M의 ethylene glycol이 첨가된 동결배지를 이용하여 실온 (20 $^{\circ}$ C)에서 15~20분간 평형하여 수정란의 탈수를

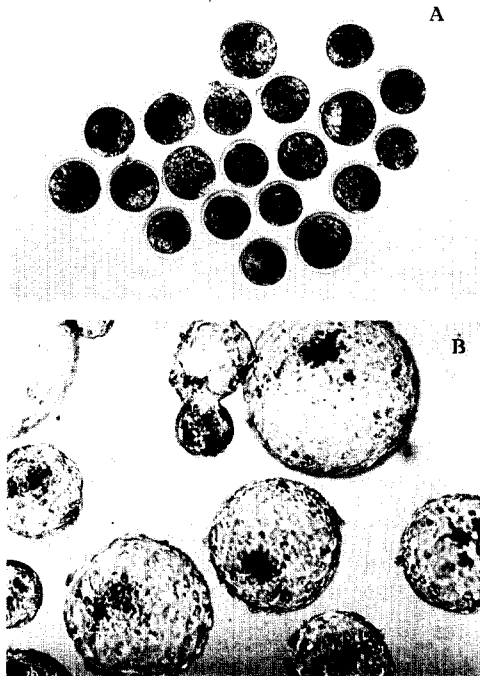


Fig. 1. *In vitro* produced Hanwoo blastocysts on day 7 (A) and re-expanded or hatched frozen-thawed blastocysts after 72 hours culture (B).

Fig. 2. The production rate of cleavage and blastocyst produced by *in vitro* matured and fertilized. () means number of oocytes and embryos.

유도한 후 0.25ml의 straw (FHK, 일본)에 수정란을 1개씩 충전하였다. 항동해제의 평형이 끝난 수정란은 -7°C 로 냉각되어 있는 수정란동결기 (산천기술산업, 한국)의 냉각조에 옮긴 후 과냉각(-196°C)된 핀셋을 이용하여 식빙을 유도하고 10분간 정지하였다. 이후 분당 -0.3°C 씩 -31°C 까지 온도를 하강시킨 후 액체질소에 침적 보존하였다.

액체질소에 보존 중인 동결수정란은 공기 중에서 4~5초간 정지 후 20°C 의 항온수조에서 10~20초간 용해하였다. 용해 후 straw를 절단하여 38.5°C 로 가온된 20% FCS가 함유된 PBS액으로 직접 수정란을 옮긴 후 30분간 배양기에서 배양 후 수정란을 20% FCS와 $100\mu\text{M}$ 의 β -mercaptoethanol (β -ME)을 첨가한 TCM 199 배양액에 옮겨 CO_2 배양기에서 72시간 배양을 하여 배반포강의 재형성과 수

정란이 투명대로부터 부화되는 비율로 생존성을 조사하였다 (Fig. 1).

3. 동결용해 수정란의 직접이식

본 연구에 공시된 수란우는 정상적인 발정주기를 가진 경산우중 자연적으로 발정이 동기화되었거나 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Iliren[®]; Hoechst, 독일) 또는 progesterone releasing intravaginal device (PRID; Sanofi, 프랑스)를 이용하여 인위적으로 발정을 동기화한 수란우를 이용하였다. 수란우는 수정란 이식일에 직장검사법에 의하여 난소내 황체를 촉진하여 황체가 분명히 존재하고 자궁상태가 정상인 수란우만을 이용하였고 황체가 없는 암소는 이식에서 제외하였다. 수정란이식은 수정란이식기 (FHK, 일본)에 개구부가 측면에 위치한 (횡혈식) 수정란이식 피복기 (FHK, 일본)를 씌우고 질내의 오염원이 자궁내로의 유입을 방지하기 위하여 외부피복기 (FHK, 일본)를 이용하여 용해 후 2분 이내에 항동해제를 제거하지 않고 수정란을 비외과적으로 양쪽 자궁각의 선단에 각각 1개씩의 수정란을 이식을 하였으며 수정란이식 후 60일에 직장검사법에 의하여 임신을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 체외수정란의 생산

도축된 한우 암소의 난포란을 이용하여 체외 성숙·수정·배양한 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 총 447개의 난포란을 체외 성숙 및 수정시켜 48시간 후의 난할률은 63.1%였으며 그중 배반포로의 발생은 202개인 28.5%

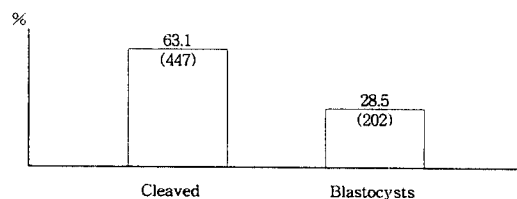


Fig. 2. The production rate of cleavage and blastocyst produced by *in vitro* matured and fertilized. () means number of oocytes and embryos.

였다.

본 연구에서 얻어진 난할률 63.1%는 Solti 등 (1992)이 변형 Parker액에 20%의 발정혈청을 첨가하여 난구세포와 과립막세포의 조건에서 얻어진 난할률 41%, Fukui와 Ono (1988)가 TCM199에 10%의 소 태아 혈청을 첨가한 배양액을 이용 난관 상피세포와 공배양하여 얻은 난할률 52.4%보다는 다소 높은 성적이었으나 Eystone과 First (1989)가 TCM199에 10%의 소 태아 혈청을 첨가한 배양액을 이용 난관 상피세포와 공배양하여 얻은 난할률 65.0%와는 비슷하였다. 그러나 Bavister 등 (1992)이 SFRE(Sigma, 미국), TCM 199 그리고 3종류의 MEM을 함유한 배양액을 이용하여 얻어진 난할률 76~82%, 그리고 Rehman 등(1994)의 76.1%와 Durnford 등(1994)의 75%보다는 상당히 낮은 성적이었다. 그러나 본 연구에서 얻어진 28.5%의 배반포 발생률은 Fukui와 Ono (1988), Goto 등 (1988), Eystone과 First (1989), Fukuda 등 (1990) 및 Solti 등 (1992)이 보고한 상실배 이상의 배발생률인 10.5~20.3%보다 높은 결과였으며 Kajihara 등 (1990)과 김 등 (1992)이 보고한 34~39.4%와 직접 비교는 할 수 없으나 비슷한 결과라 사료된다. 이러한 연구자들간의 난할률의 차이는 연구자들간의 기술적인 차이뿐만 아니라 난포란의 성숙, 정자의 수정능 획득, 공배양 세포 및 배양 조건의 차이에서 기인된 것으로 사료되며 또한 공시되는 소의 품종 등 여러 가지 난소의 상태 등이 연구자들간에 차이가 있었기 때문으로 사료된다.

본 연구에서 체외배양시 배양조건이 나쁠 때 나타나는 8~16 세포기의 발육중지 현상은 나타나지 않았는데 이러한 결과는 Crister 등 (1989)과 Fukui와 Ono(1989) 등이 보고한 체외수정란을 체세포와 같이 공배양하면 발육중지 현상을 극복할 수 있다는 결과와 같이 본 연구에서도 체세포인 난구세포와 공배양하였기 때문에 이를 극복한 결과로 설명할 수 있다.

2. 동결 체외수정란의 용해후 체외배양

체외수정후 7~8일째에 생산된 배반포를 1.8M의 ethylene glycol을 이용 동결 용해 후 72시간동안 CO₂ 배양기에서 체외배양한 결과는 Fig. 3과 같다.

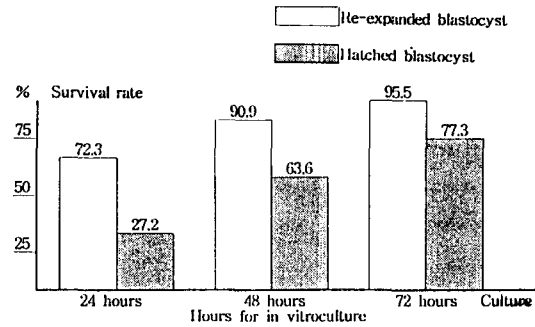


Fig. 3. Survival rate of bovine IVF frozen-thawed blastocysts.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 동결배지에 1.8M의 ethylene glycol을 첨가하여 동결한 수정란을 용해 후 100 μ M의 β -mercaptoethanol과 20% FCS가 첨가된 TCM199에서 배양한 결과 배양 24시간째에 72.3%가 배반포강이 재형성되었으며 그 중 27.2%는 부화를 하였다. 배양 시간대별 배반포강의 재형성률과 부화율은 48시간째와 72시간째에 각각 90.9%와 63.6% 및 95.5%와 77.3%로서 체외수정 배반포를 1.8M의 ethylene glycol을 이용하여 동결용해 후 생존성 평가를 위한 배양시에는 최소한 48시간 배양을 하여야 정확한 생존성을 평가할 수 있었다.

본 연구에서 나타난 동결용해 후 최종적인 생존률인 배반포강의 재형성률 95.5%와 부화율 77.3%로서 생존할 수 있었던 결과는 Szell 등 (1989)의 보고와 같이 항동해제로서 ethylene glycol을 이용할 때에는 glycerol을 이용한 경우와 달리 ethylene glycol의 분자량이 적어 세포막 투과성이 양호하여 동결 용해 후 생존이 높다는 보고로 설명될 수 있다. 또한 본 연구에서 얻어진 생존률 95.5%는 Iwasaki 등 (1994)이 체외수정란을 이용 1.36M glycerol을 이용 동결 후 0.25M sucrose액으로 glycerol을 제거하여 배양한 결과 71.9%가 발육하였다는 보고보다 생존성이 높았던 결과는 동결시 이용된 항동해제의 차이에 의하였던 것으로 사료되며 또한 본 연구에서 용해후 배양시에 100 μ M의 β -ME를 첨가하였기 때문으로 사료된다. 즉, β -ME를 세포의 배양시 첨가하면 세포의 redox state를 유지시켜 주며 oxidative injury의 나쁜 영향에 대하여 세포를 보호하여 주는 작용이 있으며(Meister, 1983) 또한 분자량이 적은 thiol 화합물인 cystine을 cysteine으로 환

원시시키고 glutathione 합성을 향상시키는 cysteine의 흡수를 촉진시키며 산화물에 의한 세포손상에 대한 보호하여 주는작용이 있어 (Ishii 등, 1981) 수정란의 발육에 있어서도 β -ME를 첨가하면 초기배의 발육을 촉진한다는 Takahash 등(1993)의 보고와 같이 본 연구에서도 β -ME의 첨가가 동결 용해 수정란의 생존에 유리하게 작용한 것으로 사료된다.

3. 발정동기화 방법에 따른 수태률

수란우의 발정동기화 처리 방법에 따른 수정란이식 수태률은 Table 1에서 보는 바와 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 수정란이식 수태률은 자연발정 동기화된 수란우가 71.4%로서 PGF_{2 α} 또는 PRID를 이용하여 발정 동기화된 수란우에서 얻어진 20.0과 29.2%의 수태률보다 높았다. 또한 전체적으로 43두의 수란우에 체외 동결수정란을 용해후 직접이식하여 18두가 임신이 되어 41.8%의 수태률을 얻었다.

본 연구에서 수란우의 발정동기화는 자연적으로 동기화된 경우가 인위적으로 동기화시킨 경우에 비하여 수태률이 높았던 결과는 Church와 Shea (1976)와 Godkin 등 (1987)이 보고한 수정란이식 수태률은 수란우가 자연적으로 발정이 동기화된 경우가 그렇지 않은 경우보다 높았다는 결과와 일치하는 결과였으나 Sreenan (1975)과 Hasler 등 (1987)이 보고한 인위적으로 발정동기화된 수란우가 수태률이 높다는 결과와는 상이한 결과였다. 한편 Wright (1981)와 Coleman 등 (1987)은 수란우의 발정동기화 유도 방법간에 수정란이식 수태률이 차이가 없다고 하였다. 이와 같이 연구자들간에 그 결과가 다른 것은 연구자들간에 공시한 수란우의

Table 1. Effect of synchronization methods on pergnancy rate in cattle

Estrus	No. of recipients	No. of pregnants	Pregnancy rate (%)
Natural	14	10	71.4
PGF _{2α}	5	1	20.0
PRID	24	7	29.2
Total	43	18	41.8

품종과 같은 유전형질 및 수란우의 산차, 영양상태 등 환경요인의 차이에서 기인된 것으로 사료된다. 그리고 수정란 이식시 사용한 수정란의 질 및 이식 시술자에 따라 수태률의 차이를 나타낼 수 있다. 또한 본 연구에서 자연발정이 동기화된 수란우는 1차로 인위적으로 발정동기화 처리후 수정란이식을 하고 임신이 되지 않아 발정이 재귀된 개체를 다시 이식하였으며 이식시 문제가 있는 수란우는 제외하였던 것도 수태률이 높았던 원인으로 사료된다.

4. 체외 배반포 발생일에 따른 수정란이식 수태률

체외수정후 7일 과 8일째 생산된 배반포를 동결 용해하여 발정동기화된 수란우에 직접이식한 결과는 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 보는 바와 같이 체외수정후 7일째에 생산된 배반포가 8일째 생산된 배반포를 이용하여 동결하여 용해 후 직접이식시 수태률이 높았다(56.0% vs. 22.2%).

본 연구에서 얻어진 체외수정 후 7일째 생산된 배반포가 8일째 생산된 배반포보다 수정란이식 수태률이 높았던 결과는 Del Campo (1993)가 체외수정 후 6, 7, 8 및 9일째 생산된 배반포를 항동해제로서 glycerol을 이용하여 동결 후 용해 배양을 한 결과 부화 배반포로의 발생률이 각각 8, 33, 8 및 9%로서 동결용해 후 생존률은 체외수정후 7일째 생산된 배반포가 가장 좋았다는 결과와 Han 등 (1994)과 Takagi 등 (1994)이 보고한 체외수정 후 7일과 8일에 생산된 배반포의 동결용해 후 생존성은 7일째 생산된 배반포가 좋았다는 결과와 일치되는 결과였다. 이러한 동결용해 후 생존성이 체외수정 후 7일째 생산된 배반포에서 가장 좋았던 결과는 체외생산 배반포의 질은 난할이 빠른 경우가 늦은 경우에 비하여 내세포괴의 수가 많아서 질이 좋다는 보고

Table 2. Effect of age(day) of blastocyst produced by IVF on pregnancy rate in cattle

Days	No. of recipients	No. of pregnants	Pregnancy rate (%)
Day 7	25	14	56.0
Day 8	18	4	22.2
Total	43	18	41.8

(Iwasaki 등, 1990, 오, 1997) 및 체내 수정란의 수정 후 7일에 배반포로 발생함으로 체외수정 후 7일째 생산된 배반포는 체내 난할 속도와 비슷하였다는 것을 의미함으로 늦은 경우와 비교시 질이 우수하였기 때문이라고 사료되나 향후 이에 대한 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 체외수정에 의하여 생산되는 배반포이상의 수정란을 직접이식법을 위하여 동결하고 융해 후 생존성과 이식 수태률을 조사하였다.

1. 도축되는 한우 난소로부터의 난포란을 이용하여 체외수정 후 수정한 결과 난할률은 63.1%였으며 체외배양 후 비외과적 이식이 가능한 단계인 배반포로의 발생률은 28.5%였다.
2. 체외수정 후 7~8일에 생산된 배반포를 1.8M ethylene glycol을 이용 직접이식법에 의하여 동결융해 후 항동해제를 제거하지 않고 β -ME를 첨가 TCM 199에 72시간동안 배양한 결과 배반포강의 재형성률은 95.5%였으며 부화 배반포로의 발생률은 77.3%였다.
3. 수란우의 발정동기화 방법에 따른 수정란이식 수태률은 자연발정 동기화된 수란우가 71.4%로서 인위적으로 발정 동기화시킨 20.0~29.2%보다 높았으며 전체적인 수태률은 51.8%였다.
4. 배반포의 체외수정 후 발생일에 따른 동결융해 후 수태률은 7일째 생산된 배반포가 56.0%로서 8일째 생산된 배반포의 22.2%보다 높았다.

참고문헌

- Bavister BD, Rose-Haiekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morula and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*. 37: 127-146.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12: 260-274.
- Church RB and Shea B. 1976. Some aspects of bovine embryo transfer. *In: Egg transfer in cattle*, ed. Rowson, LEA, Commission of the European Community. Luzembuty. EUR 5491. pp73-86.
- Coleman DA, Dailey RA, Leffel RE and Baker RD. 1987. Estrus synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipient. *J. Dairy Sci.* 71:858-866.
- Crister ES, Leibfried-Rutledge ML, Eystone WH, Northey DL and First NL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology*. 25:150 (Abstr.)
- Del Campo MR, Donoso MX, Palasz AT, Garia A and Mapletoft RJ. 1993. The effect of days in co-culture on survival of deep frozen bovine IVF blastocysts. *Theriogenology*. 39: 208
- Durnford RR, Stubbings B and Ainsworth L. 1994. Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to matures and maintain the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*. 42:261-272.
- Eystone EH and First NL. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *J. Reprod. Fert.* 85:715-720.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K and Toyoda Y. 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.
- Fukui Y and Ono H. 1988. *In-vitro* development to blastocyst of *in-vitro* matured and fertilized bovine oocyte. *Vet. Rec.* 122:202.
- Godkin AM, Leslie KE, Wain EM and Leslie BE. 1987. Factors affecting pregnancy rate following non-surgical transfer of frozen bovine embryos. *Theriogenology*. 27:230(Abstr.)

- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakaniski Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured oocytes. J. Reprod. Fert. 83:753-758.
- Han YM, Yamashima 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.
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Footte RH. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. Theriogenology. 27:139-168.
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Footte RH. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. Theriogenology. 27: 139-169.
- Ishii T, Hishimura I, Bannai S and Sugita Y. 1981. Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L1210 cells *in vitro* by feeder layer or 2-mercaptoethanol. J. Cell Physiol. 107: 283-293.
- Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S and Nakahara T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. J. Reprod. Fert. 90: 279-284.
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y, Koshiba Y, Shiraiwa K and Goto K. 1990. Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. Theriogenology. 3:264(Abstr.)
- Kane MT, Carner EW and Ellington JE. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. Theriogenology. 38:297-313.
- Meister A. 1983. Selective modification of glutathione metabolism. Science. 220: 472-477.
- Rehman NA, Collins R, Suh TK and Wright RW Jr. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes co-cultured with buffalo rate liver cells. Theriogenology. 41:1453-1462.
- Solti L, Macháty Z, Bãrãndi Zs, Török M, and Vajta G. 1992. IVF embryos of known parental origin from the endangered Hungarian Grey cattle breed. Theriogenology. 37:201 (Abstr.)
- Sreenan JM. 1975. Successful non-surgical transfer of fertilized cow eggs. Vet. Rec. 96: 490-491.
- Sreenan JM and Diskin MG. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. Theriogenology. 27: 99-113.
- Szell A, Shelton JN and Szell K. 1989. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. Cryobiology. 26: 297-301.
- Takagi M, Otoi T, Boediono A, Saha S and Suzuki T. 1994. Viability of frozen-thawed bovine IVM /IVF embryos in relation to ageing using various cryoprotectants. Theriogenology. 41: 915-921.
- Wright JM. 1981. Non-surgical transfer in cattle: embryo-recipient interaction. Theriogenology. 15:43-46.
- 고광두, 정길생, 이기만. 1981. 한우의 수정란이식에 관한 연구. 제3보. 수정란의 비외과적 채취와 이식. 한축지. 23: 331-337.
- 김정익, 한상익, 박춘근, 임석기, 김종배, 정병현, 정길생. 1992. 우수 포유동물 수정란 이용 효율 제고에 관한 연구. I. 우 난포란의 체외성숙, 수정 및 발육. 한국가축번식학회지. 16:55-62.
- 김희석, 오성중, 양보석, 이근상, 정길생. 1985. 소

에 있어서 이식 수정란의 생존성에 영향을 주는 요인에 관한 연구. 한축지. 28: 578-583.

양보석. 1994. 체내 및 체외 소 수정란의 임신율에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문.

오성종, 양보석, 이명식, 백광수, 성환후, 정진관, 임경순. 1995. 직접이식을 위한 소 체외수정란

의 동결융해후 생존성 및 수태율에 미치는 영향. 한국가축번식학회지. 19:49-54.

오성종. 1997. 소 체외수정란에 있어서 PCR 기법에 의한 성판별과 발달단계와 프리마틴 혈청침가가 성비에 미치는 효과에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문.