

韓牛 受精卵의 凍結保存 및 雙仔生産에 관한 研究  
Ⅲ. 二分 體外受精卵의 培養과 凍結

손동수 · 김일화 · 이호준 · 양병철 · 최선호 · 이광원 · 노규진\* · 최상용\*  
농촌진흥청 축산기술연구소

**Studies on Embryo Cryopreservation and Twinning by  
Embryo Transfer of Korean Native Cattle :  
Ⅲ. Culture and Freezing of IVF Bisected Embryos**

**D. S. Son, I. H. Kim, H. J. Lee, B. C. Yang, S. H. Choi, K. W. Lee,  
G. J. Rho and S. Y. Choe\***

*National Livestock Research Institute, Rural Development Administration*

**SUMMARY**

*In vitro* fertilization(IVF) derived morula and blastocyst embryos were bisected by a simple method and cultured *in vitro* without zona pellucida. And also bisected embryos were frozen-thawed and cultured *in vitro* to evaluate the survival rate. The results obtained were as follows :

The average number of grade I or II immature follicular oocytes recovered by slicing method per ovary was 11.9 from 142 ovaries. Following *in vitro* fertilization, the rates of cleavage and *in vitro* development to morula and blastocyst were 61.7 and 32.2%, respectively.

The successful bisection rate of IVF embryos was 67.51%, and the embryos of blastocyst stage were bisected successfully at significantly( $P<0.05$ ) higher rate, compared with the morula stage embryos. The survival rate of bisected embryos following 24 hours culture was 32.19%, and significantly( $P<0.05$ ) higher in blastocyst stage than morula stage. The survival rate of bisected-frozen IVF embryos following post-thaw culture for 24 hours was 16.62%, being no significant difference between embryo stages at bisection.

(Key words : IVF embryo, bisection, without zona pellucida, frozen, survival rate)

**서 론**

소에서 체외수정에 관한 연구는 소 난자의 체외수정에 의한 송아지 생산이 Brackett 등(1982)에 의해 첫 성공례가 보고된 이후 미성숙 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 배양에 대한 연구가 활발히 이

루어져 공배양에 의한 수정란의 생산효율 증대, 수정란 분할에 의한 쌍태 송아지 생산, 핵이식 및 유전자 주입 등의 수정란이식 기술에 발전을 가져왔다(Wilson 등, 1995; Goto 등, 1992; Jiang 등, 1991; Eyestone과 First, 1989; Hill, 1989; Prather 등, 1987; Williams 등, 1984). 체외 수정란의 생산성을 높이기 위해 초음파 진단기를 이용하

\* 경상대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

여 능력이 우수한 소의 난소로부터 직접 난자를 채취하는 기술이 개발되어(Brown 등, 1996; Broussard 등, 1996; Reinders 등, 1996; Scott 등, 1994; Pieterse 등, 1988; Callesen 등, 1987), 체외 수정란이 소의 능력개발에 높게 이용될 것으로 예상되고 있다.

Niemann 등(1986)과 Rorie 등(1986)은 이분 수정란의 동결시에 투명대가 존재하여야 융해 후 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였으며, Takeda 등(1987)은 분할 후 수정란을 동결하는 것보다 동결·융해한 수정란을 분할하는 것이 생존율이 높다고 하였다. 그러나 체외수정된 수정란을 동결하였다가 이식하기 전에 융해하여 이분한다는 것은 실험실내에서는 가능하겠지만 실용화하는데는 많은 문제점이 있다.

따라서 본 연구는 체외 수정란의 이용 효율성 증진을 위해서 micro-blade를 사용하여 간편하게 체외 수정란을 이분 후 투명대 없이 동결하였을 때의 생존율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 체외 수정란의 생산

#### 1) 난포란의 회수

천안시 근교의 도축장에서 도축된 한우의 난소를 분리하여 항생제(100 IU/ml의 penicillin G + 100 µg/ml의 streptomycin sulfate)가 첨가된 25°C의 0.9% 생리식염수에 넣어 4시간 이내에 실험실로 운반하였다. 항생제가 첨가된 생리식염수로 난소를 3~4회 세정하고, 멸균 종이 towel로 난소 표면의 습기를 제거하였다. Gentamicin sulfate(D.S Gentamicin inj.®, Dongshin Pharm. Co., Korea)가 50 µg/ml 첨가된 TCM 199 배양액(Medium 199®, Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A.) 200 ml가 들어 있는 500 ml의 beaker에서 검자로 난소 간막을 고정 한 후 난소 표면을 stainless blade로 얇게 세절(slicing)하여 씻은 다음 상층액을 제거하고, 100×20 mm의 멸균 petri dish에 분주하였다. 배율 20의 실체현미경하에서 난포란을 회수하였으며 위의 TCM 199 배양액으로 3~4회

세정 후 체외성숙에 공시하였다.

난포란의 선발은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 난구세포층과 세포질의 충실도에 따라 4~5층의 난구세포층이 충실하면서 균일한 세포질을 갖은 것을 I 등급으로, 2~3층의 난구세포층을 갖은 것을 II 등급으로 구분하였으며, I 등급과 II 등급의 난포란을 체외성숙배양에 공시하였다.

#### 2) 난포란의 체외성숙 및 체외수정 배양액

난포란의 체외성숙 배양액은 25 mM의 HEPES(Sigma Chemical Co., U.S.A.)가 첨가된 TCM 199 배양액으로 이에 5 µg/ml의 FSH(Sigma Chemical Co., U.S.A.), 10 µg/ml의 hCG(Chorulon®, Intervet, Holland), 1 µg/ml의 estradiol-17β(Sigma Chemical Co., U.S.A.), 0.1 ml/ml의 FBS 및 50 µg/ml의 gentamicin sulfate를 첨가한 후 0.2 µm cellulose acetate membrane filter(MFS®, Sierra, U.S.A.)로 여과하였다.

정자세정용 BO 배양액은 기본 BO 배양액(Brackett 등, 1975)에 10 mM의 caffeine(Sigma Chemical Co., U.S.A.)을 첨가하여 제조하였고, 기본 BO배양액에 5 mM의 caffeine, 10 µg/ml의 heparin(Sigma Chemical Co., U.S.A.) 및 bovine serum albumin(BSA, Sigma Chemical Co., U.S.A.)을 0.5% 첨가하여 정자의 수정능 획득 및 체외수정용 BO배양액을 제조 후 0.2 µm filter로 여과하였다.

모든 배양액은 CO<sub>2</sub> incubator(39°C, 98~99% humidity, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>)에서 12시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

#### 3) 난포란의 체외성숙

체외성숙 배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)에 0.5 ml씩 분주하고 선별된 난포란을 각각 20~30 개씩 넣었으며 이때 직경 10~20 mm의 난포로부터 회수하여 원심, 세정한 과일막세포를 1~2×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 전후 공배양을 실시하여 체외성숙을 유도하였다.

#### 4) 정자의 처리 및 체외수정

축협중앙회 개량사업본부 한우개량부에서 생산된 한우 동결정액을 38°C의 온수에서 30초간 융해

시킨 후 정자 세정용 BO 배양액과 혼합하여 희석한 다음 200×g으로 5분간 2회 원심하여 만든 정자 pellet을 수정능획득용 BO 배양액으로 정자농도가 1~2×10<sup>6</sup> 마리/ml가 되게 하였다. 이것을 멸균 glass wool이 들어 있는 1 ml 주사기에 주입하여 여과되는 생존 정자를 성숙난자의 체외수정에 사용하였으며, 70 μl의 미소적을 30×15 mm의 tissue culture dish에 적하한 후 멸균 mineral oil로 피복하였다.

성숙된 난자를 체외수정용 BO 배양액 5 ml로 희석하여 vortex(Vortex-Genile 2 Mixer<sup>®</sup>, Scientific Industries, Inc., U.S.A.)에서 속도를 5로 하여 30초간 진탕 후, 체외수정용 BO 배양액으로 2~3회 세정하여 정자 미소적당 20~30개씩 넣어 10시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 체외수정을 유도하였다.

### 5) 공배양용 난관 상피세포의 준비

도축장에서 배란 후 2~3일경의 난소를 보유하고 있는 소의 난관을 채취하여 5℃가 유지되는 보온병에 담아 실험실로 옮겼다. 멸균 접자와 가위를 이용하여 난관 주위의 결합조직과 지방조직을 제거하고 외층(장막층)을 70% alcohol로 소독한 후 난관채에서 난관-자궁 연결부쪽으로 TCM 199 기본배양액 3 ml를 관류시켜 난관 상피세포를 회수하였다. 회수한 난관 상피세포는 200×g으로 5분간 2회 원심분리하여 세정하고, 체외성숙 배양액으로 부유시켜 농도가 1~2×10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 조정한 후 4-well dish에 0.5 ml씩 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양시켜 monolayer cells의 형성을 유도하였다.

### 6) 수정란의 체외배양

체외 수정된 난자는 체외성숙 배양액 5 ml로 희석하고, vortex에서 속도를 5로 하여 1분 30초간 진탕 후 2~3회 세정함으로써 난구세포와 정자를 제거하였다. 난관 상피세포로 monolayer cells이 형성된 4-well dish에 1 well당 20개의 수정된 난자를 넣어 9일간 CO<sub>2</sub> incubator에서 공배양하였다. 배양 중 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며 24시간마다 수정란의 난할율과 상실배기 및 배반포기의 발달율을 조사하였다.

## 2. 수정란의 분할, 배양 및 동결

### 1) 수정란의 분할

분할에 사용된 수정란은 1~2등급의 상실기 및 배반포기의 수정란이었으며, 수정란을 멸균 mineral oil 아래 Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A.)가 20% 첨가된 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS, Gibco BRL Life Technologies, Inc., U.S.A.) 배양액 50 μl의 미소적에 옮겼다.

수정란 분할은 손 등(1997)이 실시한 방법에 준하였다.

### 2) 이분 수정란의 배양

이분된 수정란은 체외성숙 배양액으로 2~3회 세정하고 난관 상피세포의 monolayer cells이 형성된 체외성숙 배양액에 옮겨 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다.

### 3) 이분 수정란의 동결 및 융해

이분수정란의 동결은 분할 후 체외배양 중 배반포기 이상으로 발달한 수정란을 대상으로 하였다. 동결전 수정란은 FBS가 20% 첨가된 D-PBS 배양액으로 옮겨 10분간 평형시킨 후 ethylene glycol (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 1.8 M과 FBS가 20% 첨가된 D-PBS 동결액에서 20분간 평형하여 0.25 ml straw에 주입하였다. 수정란 동결은 -6℃로 냉각된 수정란 동결기(CL863<sup>®</sup>, Cryogenic, Australia)의 cryochamber에 straw를 넣고 2분 후 식빙(seeding)하여 8분간 정지한 후 -6℃에서 -30℃까지 -0.3℃/분 속도로 냉각시켜 액체질소에 침지하여 보존하였다. 동결 수정란의 융해는 수정란이 주입된 straw를 액체질소통에서 꺼내어 실온의 공기 중에 5초간 두었다가 20℃의 온수에서 15초간 급속융해하였다. Straw를 절단하여 tissue culture dish에 수정란을 회수하고 FBS가 20% 첨가된 D-PBS 배양액으로 옮겨 10분간 ethylene glycol을 제거하였다. 이 수정란을 TCM 199 성숙배양액으로 2~3회 세정하고 난관 상피세포의 monolayer cells이 형성된 TCM 199 성숙배양액으로 옮겨 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 배반포장이

정상적으로 재형성되고 확장배반포기로 발육되는 것을 생존 수정란으로 판정하였다.

### 3. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 General Linear Models Procedure(SAS, 1988)를 이용하여 least square means을 구하고 요인간의 유의차를 검정하였다. 최소자승평균을 구하기 위하여 설정한 선형 모형은 다음과 같다.

#### 1) 체외 수정란의 이분 성공율

$$y_{ij} = \mu + d_i + e_{ij}$$

여기서  $y_{ij}$  : 이분 성공율

$\mu$  : 이분 성공율의 평균

$d_i$  : 발육단계의 효과( $i=1,2$ )

$e_{ij}$  : 오차 합계

#### 2) 이분 수정란의 배양 후 생존율

$$y_{ij} = \mu + d_i + e_{ij}$$

여기서  $y_{ij}$  : 배양 후 생존율

$\mu$  : 배양 후 생존율의 평균

$d_i$  : 발육단계의 효과( $i=1,2$ )

$e_{ij}$  : 오차 합계

#### 3) 이분 수정란의 동결 후 생존율

$$y_{ij} = \mu + d_i + e_{ij}$$

여기서  $y_{ij}$  : 동결 후 생존율

$\mu$  : 동결 후 생존율의 평균

$d_i$  : 발육단계의 효과( $i=1,2$ )

$e_{ij}$  : 오차 합계

## 결 과

### 1. 체외수정란의 생산 성적

도축 한우 암소의 난소로부터 미성숙 난포란을 채취하여 체외성숙, 수정 및 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 즉 142개의 난소를 slicing하여 회수한 I ~ II등급의 미성숙 난포란은 평균 11.9개였으며, 체외수정 후 난할율은 61.7%였고 상실배기와배반포기까지 발달된 난자는 32.2%였다.

### 2. 수정란의 분할, 배양 및 동결 성적

한우 체외수정란 187개를 micro-blade로 분할한

Table 1. Result of *in vitro* fertilization of follicular oocytes and *in vitro* culture of IVF embryos of Korean Native cattle

No. of ovaries used	142
No. of oocytes collected ovary	
Grade I	8.6±3.2
Grade II	3.3±1.6
Total	11.9±2.9
No. of oocytes inseminated	1,680
No. of embryos cleaved(%)	1,036(61.7)
No. of embryos developed to(%)	
Morula	266(15.8)
Blastocyst	275(16.4)
Total	541(32.2)

Table 2. Successful bisection of *in vitro* produced Korean Native cattle embryos of morula and blastocyst stage\*

Embryo stage	No. of embryos bisected	No. of demi-embryos produced	Rate(%)
Morula	52	58	55.76±3.14 <sup>a</sup>
Blastocyst	135	214	79.25±1.94 <sup>b</sup>
Total	187	272	67.51±1.84

\* Least square means and standard errors. Means with different small and capital superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ) within between sub-groups, respectively.

결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 수정란의 이분 성공률은 67.51%였으며, 수정란의 발육단계별로는 배반포기가 79.25%, 상실배기가 55.76%로 배반포기가 상실배기보다 유의적으로 높은 이분 성공률을 나타냈다( $P < 0.05$ ).

한우 이분 체외수정란 201개를 24시간 배양한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 이분 체외수정란의 24시간 배양 후 발달율은 32.19%였으며, 수정란의 발육단계별로는 배반포기가 36.12%, 상실배기가 28.26%로 배반포기가 상실배보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다( $P < 0.05$ ).

한우 이분 체외수정란 69개를 24시간 배양 후 동결·융해하여 생존율을 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 동결·융해하여 24시간 배양 후 생존율은 16.62%였고, 발육단계에 따른 생존율은 상실배기가 15.38%, 배반포기가 17.85%였으며, 상실배기와 배반포기간에 생존율의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

## 고 찰

수정란이식의 실용화를 위하여는 우수한 유전력을 보유하고 있는 수정란의 다량 확보가 이루어져

야 하나 과배란처리에 의한 고능력우로부터의 체내 수정란의 생산은 한정되어 있어 미성숙난포란을 이용한 체외수정란 기술이 급진적인 발전을 보이고 있다.

국내에서도 1993년 황 등(1993)이 최초로 체외수정란 유래 송아지를 생산하면서 많은 연구자들에 의해 보고되고 있으나 아직까지 체외수정란은 도축되는 소의 난소를 이용하여 생산하기 때문에 혈통과 능력의 확인이 곤란하여 개량의 측면에서 활용되지 못하고 있다(박 등, 1994; 손 등, 1994; 한 등, 1994). 그러나 초음파를 이용한 직접난자채취 기술이 개발되면서 체외수정란을 이용한 능력개량의 가능성을 나타내었고, Lohuis(1995)는 어린 송아지로부터 채취한 난자를 이용한 체외수정란을 생산하여 능력개량에 활용하게 되면 개량효율을 22% 증가할 수 있다고 하였다. 따라서 소의 능력개량에 체외수정란의 이용도가 많아짐에 따라 체외수정란의 분할, 성감별, 유전자 이식 등의 수정란 조작시 생존율을 높일 수 있는 기술의 확립이 요구되고 있다.

본 연구에서는 수정란의 이분, 배양 및 동결시험에 이용하기 위하여 도축되는 한우 암소의 난소를 수거, 미성숙 난포란으로 체외수정란을 생산하여 활용하였다. 회수한 미성숙 난포란은 난소당 평균

Table 3. *In vitro* survival rate of Korean Native cattle embryos cultured for 24 hours following bisection\*

Embryo stage	No. of demiembryos cultured	No. of embryos survived	Rate(%)
Morula	46	13	28.26 ± 7.06 <sup>a</sup>
Blastocyst	155	56	36.12 ± 3.85 <sup>b</sup>
Total	201	69	32.19 ± 4.02

\* Least square means and standard errors. Means with different small and capital superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ) within between sub-groups, respectively.

Table 4. *In vitro* survival rate of IVF bisected-frozen embryos of Korean Native cattle\*

Stage of embryos	No. of bisected embryos frozen-thawed	No. of embryos survived	Rate(%)
Morula	13	2	15.38 ± 10.66 <sup>a</sup>
Blastocyst	56	10	17.85 ± 5.13 <sup>a</sup>
Total	69	12	16.62 ± 5.91 <sup>a</sup>

\* Least square means and standard errors. Means with different small and capital superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ) within between sub-groups, respectively.

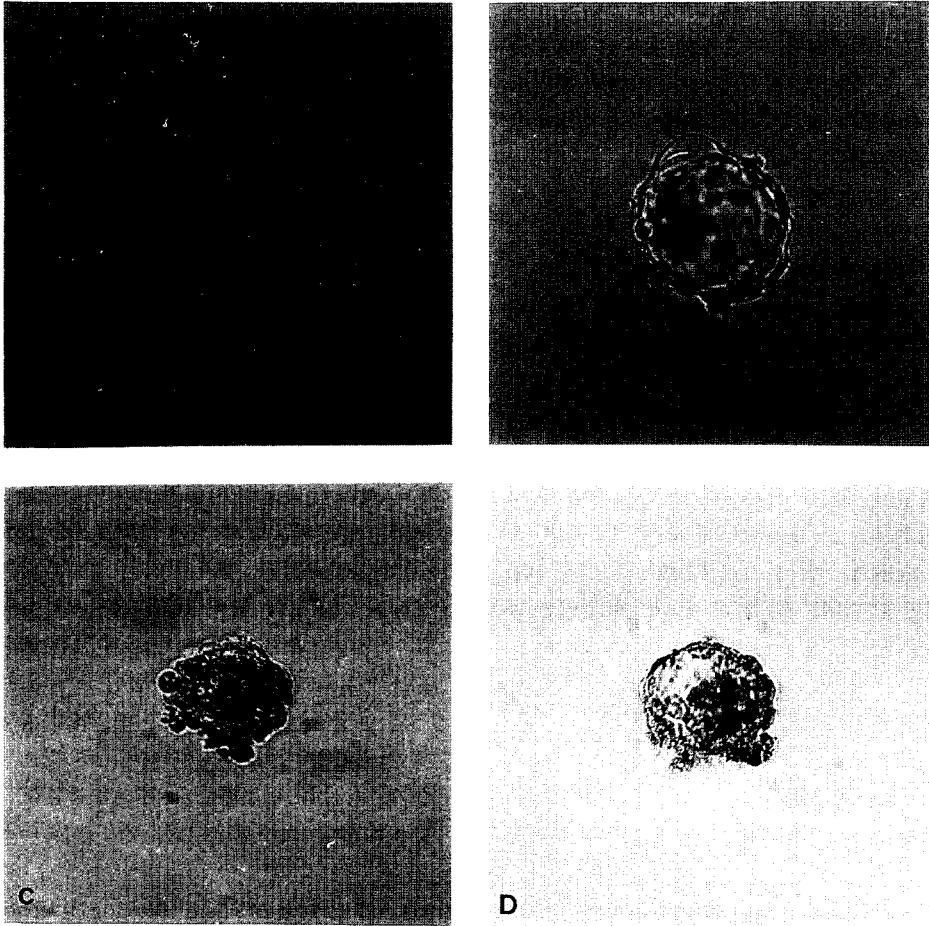


Fig. 1. Bisected, cultured and frozen-thawed bovine IVF embryos ( $\times 200$ ).

- A : A bisected embryo before *in vitro* culture.
- B : A blastocyst embryo developed *in vitro* for 24 hours after bisection.
- C : A frozen-thawed embryo following bisection.
- D : A bisected embryo cultured *in vitro* for 24 hours after thawing.

11.9개였으며, 체외수정 후 난할율은 61.7%였고 상실배기와 배반포기까지 발달된 난자는 32.2%로서, Durnford 등(1994)이 체외성숙 난자의 수정 후 난할율은 75%라고 한 보고와 Eyestone과 First (1989)가 난관 상피세포와 공배양한 초기배 수정란의 상실배기 및 배반포기의 발달율은 43%이라고 한 보고보다 저조한 성적을 보였다. 이러한 원인은 본 실험이 주로 하절기에 이루어졌기 때문에 난자의 질과 체외배양 조건이 양호하지 못하였던 결과

에 기인한 것으로 추정된다.

정 등(1992)은 holding pipette과 microblade를 이용하여 체외수정란을 이분하였을 때의 이분 성공률은 81.2%이었으며, 수정란의 발육단계에서는 상실배기와 배반포기간에 차이는 거의 없었다고 하였다.

본 연구에서 체외수정란의 이분 성공률은 67.51%였으며, 배반포기 수정란이 79.25%로 상실배기 수정란 55.76%보다 유의적으로 높은 이분 성공

를 나타냈다( $P < 0.05$ ). 배반포기 수정란이 상실배기 수정란보다 좋은 것은 배반포기의 세포수가 상실배기보다 많기 때문인 것으로 사료된다.

정 등(1992)은 투명대가 없는 이분 체외수정란을 4~6시간 체외배양하였을 때에 수정란의 생존율은 상실배기가 57.1%, 배반포기가 66.6%로 배반포기가 높았다고 하였다.

본 연구에서 이분한 체외 수정란을 투명대 없이 24시간 체외배양하였을 때에 생존율은 32.19%였으며, 수정란의 발육단계별에서는 배반포기가 36.12%로 상실배기 28.26%보다 유의적으로 높은 생존율을 나타내어( $P < 0.05$ ), 다른 연구자들의 보고와 다소 차이를 보이는 것은 수정란의 배양조건이 다르기 때문인 것으로 추정된다.

Niemann 등(1986)은 수정란을 분할하여 동결하는 것이 동결·융해한 수정란을 분할하는 것보다 생존율이 높다고 하였으나 Rorie 등(1986)은 수정란을 분할하여 동결하는 것보다는 동결·융해한 수정란을 분할하는 것이 효율적이라고 했다.

이분 수정란의 동결시 투명대 존재 유무가 생존율에 미치는 영향에 대하여는 연구자간에 다소 차이가 있으며, 동결시 세포의 손상을 방지하기 위하여 이분 수정란을 한천배지에 매몰하여 동결하고 있다(Picard 등, 1984). Lehn-Jensen과 Willadsen(1983)은 이분 수정란을 돼지 난자의 투명대에 넣어 한천배지칩에 매몰하여 면양의 난관에서 1~2일 배양 후 상실배기 또는 초기 배반포기를 회수하여 동결 융해하였을 때 생존율은 70%였다고 했다.

Blakewood 등(1986)은 투명대 유무가 이분 수정란의 동결·융해 후 생존율에는 영향을 미치지 않는다고 하였으나, Rorie 등(1986)은 투명대가 없는 이분 수정란을 동결하였을 때 생존되는 수정란은 없었다고 하였다.

본 연구에서는 이분 체외수정란을 동결·융해하여 24시간 배양 후 생존율은 16.62%였고, 배반포기 수정란과 상실배기 수정란간에 유의적인 차이는 없었다.

따라서 체외수정란을 이분하여 투명대 없이도 동결보존이 가능함을 보여 주었다.

## 적 요

미성숙난포란을 이용하여 체외수정으로 배양된 상실배기 및 배반포기 수정란을 간편하게 이분하여 투명대없이 체외배양 및 동결보존 후 생존율을 조사한 결과는 다음과 같다.

난소 142개를 세절하여 회수한 I 및 II등급의 미성숙 난포란은 난소당 평균 11.9개였으며, 체외수정 후 난화율은 61.7%였고, 상실배기와 배반포기까지 발달된 난자는 32.2%였다.

체외 수정란의 분할 성공률은 67.51%였으며, 수정란의 발육단계별로는 배반포기가 상실배기보다 유의적으로 높은 이분 성공률을 나타냈다( $P < 0.05$ ). 수정란을 이분하여 24시간 배양 후 배발달율은 32.19%였으며, 수정란의 발육단계별로는 배반포기가 상실배기보다 유의적으로 높은 배발달율을 나타내었다( $P < 0.05$ ). 이분 체외 수정란을 동결·융해하여 24시간 배양 후 생존율은 16.62%였으며, 발육단계에 따른 유의적인 차이는 없었다.

## 참고문헌

- Blakewood EG, Rorie RW, Pool SH and Godke RA. 1986. Freezing bovine embryos without a zona pellucida. *Theriogenology*, 22(1):141.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27:147-158.
- Broussard JR, Rocha A, Lim JM, Blair RM, Roussel JD and Hansel W. 1996. The effect of environmental temperature and humidity on the quality and developmental competence of bovine oocytes obtained by transvaginal ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology*, 45(1):351.
- Brown RT, Brogliatti GM and Adams GP. 1996. Postpubertal fertility subsequent to repeated transvaginal oocyte collection in calves. *Theriogenology*, 45(1):358.
- Callesen H, Greve T and Christensen F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine

- follicular oocytes. *Theriogenology*, 27(1):217.
- Durnford R, Stubbings RB and Ainsworth L. 1994. Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42(2):261-272.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85(2):715-720.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y and Nakanishi Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70(5):1449-1453.
- Hill DJ. 1989. Growth factors and their cellular actions. *J. Reprod. Fert.*, 85(2):723-734.
- Jiang HS, Wang WL, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1991. Roles of different cell manolayers in the co-culture of IVF bovine embryos. *Theriogenology*, 35(1):216.
- Lehn-Jensen H and Willadsen SM. 1983. Deep-freezing of half and quarter embryos. *Theriogenology*, 19(1):49-54.
- Lohuis MM. 1995. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*, 43(1):51-60.
- Niemann H, Brem G, Sacher B, Smidt D and Krusslich H. 1986. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. *Theriogenology*, 25(4):519-524.
- Picard L, King WA and Betteridge KJ. 1984. Cytological studies of bovine half-embryos. *Theriogenology*, 21(1):252.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruij Th. AM and Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30(4):751-762.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37:859-866.
- Reinders JMC and van Wagtenonk-de Leeuw AM. 1996. Improvement of a MOET program by addition of *in vitro* production of embryos after ovum pick up from pregnant donor heifers. *Theriogenology*, 45(1):354.
- Rorie RW, Pendleton RJ, Youngs CR and Godke RA. 1986. Viability of demi-embryos produced before vs. after deep freezing. *Theriogenology*, 25(1):192.
- Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Paterson C and Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet. Rec.*, 134:440-443.
- Takeda T, Henderson WB and Hasler JF. 1987. Deep freezing of split and intact bovine embryos. *Theriogenology*, 27(1):285.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- Williams TJ, Elsden RP and Seidel GE, Jr. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 22(5):521-531.
- Wilson JM, Williams JD, Bondiol KR, Looney CR., Westhusin ME and McCalla DF. 1995. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:73-83.
- 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 광대오, 이효중, 최상용. 1994. 체외성숙,



- 수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우이식에 의한 산자 생산. 한국가축번식학회지, 18(1):47-54.
- 손동수, 김선정, 김일화, 서국현, 이광원, 상병돈, 박무균, 이철상, 한용만, 이경광, 정상원. 1994. 사람 성장호르몬 유전자가 미세주입된 체외수정란 유래의 송아지 생산. 한국수정란이식학회지, 9(3):229-234.
- 손동수, 김일화, 이동원, 서국현, 이호준, 이광원, 안병석, 신철두, 박노웅, 최상용. 1997. 한우 수정란의 동결보존 및 쌍자생산에 관한 연구 II. 이분 수정란의 이식과 쌍자 생산. 한국수정란이식학회지, 12(1):91-102.
- 정길생, 김정익, 김종배, 정병현, 이훈택, 정형민. 1992. 우수 포유동물 수정란의 이용효율 제고에 관한 연구 III. 미세조작에 의한 수정란의 이용효율 증진에 관한 연구. 건국대학교 동물자원연구지, 17:3-9.
- 한용만, 이철상, 이정호, 김선정, 신상태, 김동훈, 이훈택, 정병현, 정길생, 김영수, 김영훈, 이곤세, 김교국, 황윤식, 이경광. 1994. 체외수정란 유래의 송아지 생산. 한국가축번식학회지, 18(1):7-13.
- 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신억익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 8(2):143-149.

---

(접수일자: 1997. 7. 8 / 채택일자: 1997. 8. 10)