韓國受精卵移植學會誌(1997) 第 12 卷 第 3 號
Korean J. Emb. Trans. (1997) Vol. 12, No. 3 pp. 293~300

소 난포란의 체외성숙을 위한 미소적 배양체계의 검토

이은송 · 이병천* · 황우석*
강원대학교 수의학과

Microdrop Culture System for *In Vitro* Maturation of Bovine Follicular Oocytes

E. S. Lee, B. C. Lee* and W. S. Hwang*
Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

SUMMARY

Supplementation of maturation medium with additional granulosa cells has beneficial effect on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes and their subsequent cleavage and development *in vitro*. However, maturation system using granulosa cells have some disadvantages that collection of granulosa cells is cumbersome and metabolic activity of the cells is variable according to ovarian cycle or follicular size. We hypothesized that bovine immature oocytes matured without granulosa cell coculture can fertilize and develop normally if the medium volume per oocyte is reduced during *in vitro* maturation.

Immature oocytes were matured for 24 hours in a TCM199 containing 10% fetal calf serum, anterior pituitary hormone (0.02 AU/ml Antrin®) and estradiol with or without granulosa cells *in vitro*. In Group 1, 35 to 40 oocytes were matured in a well of 4-well plastic dish containing 500 μl of maturation medium and granulosa cells, and 9 to 10 oocytes were matured in a 50-μl drop of maturation medium without granulosa cells in Group 2. After maturation, oocytes were coincubated with sperm for 30 hours in a modified Tyrode's medium (IVF). Inseminated oocytes were cultured in a microdrop (30 μl) of a synthetic oviduct fluid medium (SOFM) containing BSA, Minimum Essential Medium essential and non-essential amino acids for 9 days.

As a preliminary experiment, we investigated the beneficial effect of granulosa cells during maturation on subsequent cleavage and development using the same type of culture dishes (4-well dish). Granulosa cells could not increase embryo cleavage after fertilization but significantly improved ($p<0.05$) embryo development to expanding blastocyst (Table 1 and 2). In Group 1, 68 and 80% of inseminated oocytes have cleaved at 30 hours and 2 days after IVF, respectively, which is similar ($p>0.05$) to the result of Group 2 (69% at 30 hours and 78% at 2 days after IVF). The oocytes in Group 2 showed 21 and 11% of developmental rates to expanding and hatching blastocysts, respectively, which was not significantly different ($p>0.05$) from those (20 and 10%, respectively) of oocytes in Group 1.

* 서울대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

In conclusion, it has been clarified that a microdrop culture system without granulosa cells for *in vitro* maturation can support bovine embryonic development to blastocyst *in vitro* as readily as a granulosa cell coculture system.

(Key words : *in vitro* maturation, bovine oocyte, granulosa cell, embryo development)

서 론

소 난소의 난포로부터 채취된 미성숙난자는 체외에서 성숙, 수정되어 정상적으로 배반포단계까지 발육할 수 있다. 그러나 난자의 핵 및 세포질의 성숙에는 다양한 인자가 관여하여 영향을 미치며, 현재까지 체외에서 성숙, 수정된 소 난포란의 배반포로의 발육률은 체내에서 발생하는 난자에 비해 낮은 실정이다(Leibfried-Rutledge 등, 1987). 소 미성숙난자의 체외성숙에 영향을 미치는 요인으로서 동물혈청(Lu 등, 1987; Schellander 등, 1990), FSH, LH 및 estradiol등의 호르몬(Zuelke와 Brackett, 1990; Yang 등, 1993) 및 난구세포, 과립막세포 등의 체세포와의 공배양(Staigmiller와 Moor, 1984; Critser 등, 1986; Mochizuki 등, 1991)에 대한 연구가 진행되어 왔다. 과립막세포의 작용에 관해서는 많은 연구자들에 의해 검토되어 과립막세포와의 공배양법으로 성숙된 소 난포란에서 수정률과 배반포로의 발생률이 개선되었다는 결과가 보고되었다(Fukui와 Ono, 1989; Mochizuki 등, 1991). 이러한 결과를 바탕으로 현재 소 난포란의 체외성숙에는 과립막세포와의 공배양법이 많이 이용되고 있으나(Fukui 등, 1992; 이원유 등, 1995) 과립막세포를 이용하는 배양체계의 결점으로서는 미생물 오염가능성의 증가 및 세포채취의 번거로움이 있다. 과립막세포는 다른 체세포와 마찬가지로 세포성장인자, 호르몬 등 많은 종류의 물질을 분비하는 것으로 알려져 있으며(Adashi 등, 1991), 난포의 발육주기 또는 크기에 따라 호르몬분비능 및 대사활성이 변화된다(Luck 등, 1990; Spicer와 Geisert, 1992). 따라서 난자성숙에 대한 특정물질의 영향을 검토하기 위하여 반복실험이 필요할 경우 매회의 실험마다 새로운 과립막세포를 채취한다면 배양액의 조성변화로 인해 명확한 결과를 얻지 못할 수도 있다. 한편 정상적인 미성숙난자는 다층의 난구세포에 둘러 싸여 있으며, 난구세포는 과립막세포의 subtype으로서 성선자극호르몬과의 결합능 또는 스테로이드의 분비능에서 과립막세포의 생리적 특성을 가지고 있으며(Rabahi 등, 1991), 난자, 난구세포 및 과립막세포의 상호작용을 통하여 난자의 성숙이 이루어지는 것으로 생각되고 있다(Thibault 등, 1987; Sutovsky 등, 1993).

본 실험에서는 체외성숙과정에 있어서 적은 양의 배양액에 다수의 미성숙난자를 배양할 경우 과립막세포를 추가로 첨가하지 않아도 수정후 정상적인 분할 및 체외발육이 가능할 것이라는 가설을 설정하고, 체외성숙에 있어서 과립막세포와의 공배양법과 과립막세포를 이용하지 않는 미소적 성숙배양법에 따른 체외수정후의 분할 및 배반포로의 발육률을 비교함으로써 체외성숙체계의 간편화에 대한 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

도축장유래 Holstein 경산우 및 미경산우의 난소로부터 상법에 의해 미성숙난자를 채취하였다(Lee와 Fukui, 1996; 노상호 등, 1997). 채취한 미성숙난자로부터 4~5층 이상의 치밀한 난구세포가 부착되어 있고 균질한 세포질을 갖는 난자만을 선발하여 체외성숙에 사용하였다(Kastrop 등, 1990).

미성숙난자의 채취와 동시에 Moor와 Trounson (1977)의 방법에 준하여 과립막세포를 채취하였다. 과립막세포를 세정용 TCM199내에 부유시켜 2회 원심, 세정하였으며(500×g, 5분) 원심후 50×10^6개/ml의 세포부유액을 만들어 과립막세포의 최종농도가 2×10^6개/ml가 되도록 성숙용 배양액내에 첨가하였으며, 성숙배양시작 전 15~30분간 전배양하였다.

체외성숙에는 4-well dish(Nuclon, Denmark) 및 플라스틱 petri dish(60×15 mm, Becton Dickinson Labware, USA)를 이용하였으며, 10%(v/v) fetal calf serum(FCS, Mitsubishi Kasei, Japan),

돼지에서 추출한 뇌하수체 전엽성호르몬 0.02 AU/ml (Antrin®, Denka, Japan) 및 1 μg/ml estradiol을 첨가한 TCM199 (Dainippon, Japan)을 배양액으로 이용하였다. 미성숙난자를 세정용 TCM199으로 3회 세정후 성숙용 TCM199으로 1회 세정하여 4-well dish를 이용하는 경우는 과립막세포가 첨가된 well (500 μl)에 35~40개의 미성숙난자를, 과립막세포가 첨가되지 않은 미소적을 이용하는 경우에는 미소적당 (50 μl) 9~10개의 난자를 넣어 39℃, 5% CO_2, 95% 공기 및 95% 이상의 습도조건을 갖춘 배양기(CO_2 배양기)내에서 24시간 성숙배양하였다.

2. 체외수정

정자처리 및 체외수정은 modified Tyrode's medium (Parrish 등, 1985; Fukui, 1990; mTALP)을 기본배양액으로 하여 Parrish 등(1986)의 방법에 준하여 실시하였다.

난자의 성숙배양 22시간후에 Holstein종 동결정액을 37℃의 온수에 융해하여 정자의 운동성을 확인한 후 Pasteur pipette으로 1 ml의 수정능획득용 mTALP가 들어 있는 9~10개의 플라스틱 시험관 (Becton Dickinson Labware, USA)에 약 0.2 ml의 정액을 분주하여 CO_2 배양기내에서 1시간 swim-up처리하였다. Swim-up 종료후 시험관 상층액 약 0.8 ml를 흡인하여 15 ml의 원심관에 모은 후 2회 원심, 세정하였으며(500×g, 5분), 혈구계산판으로 정자의 수를 산정하여 50×10^6 sperm/ml가 되도록 정자부유액을 작성하였다. 수정능획득을 위하여 정자부유액과 동량의 200 μg/ml heparin (Sigma Chemical Co., USA) 용액을 첨가하여 CO_2 배양기내에서 15분간 정치하였다.

체외수정을 위한 drop은 플라스틱 petri dish (60×15 mm, Becton Dickinson Labware, USA)에 수정용 mTALP로 43 μl의 미소적을 만든 후 미네랄 오일 (Sigma Chemical Co., USA)을 도포하여 CO_2 배양기내에 정치하였다. 성숙배양 23시간째에 체외성숙난자를 회수하여 세정용 mTALP로 3회 세정한 후 4~6개의 난자를 3 μl의 배양액과 함께 흡인, 미리 작성해 둔 수정용 미소적내에 주입하였으며 여기에 정자농도가 2×10^6 sperm/ml가 되도록 정자부유액 4 μl를 첨가하여 5% CO_2 배양기내에서 30시간 체외수정하였다 (Lee 등, 1996).

3. 체외배양

체외배양액은 BSA농도를 8 mg/ml로 조정한 합성난관배양액 (Tervit 등, 1972; SOFM)을 기초배지로 여기에 2% (v/v) Minimum Essential Medium (MEM) 필수아미노산 및 1% (v/v) MEM 비필수아미노산 (Life Technologies Inc., USA)을 첨가하여 사용하였다. 체외수정 30시간후 난자를 회수하여 10 mM HEPES 및 2 mM sodium bicarbonate가 포함된 세정용 SOFM내에서 가볍게 pipetting함으로써 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였으며, 1세포기 난자 및 분할된 수정란을 구분하여 체외수정 30시간후의 분할율을 산정하였으며, 분할란 및 미분할란의 구분없이 체외배양에 이용하였다. 체외배양은 미리 작성해 둔 30 μl의 SOFM 미소적에 4~6개의 수정란을 넣어 39℃, 5% CO_2, 7% O_2, 88% N_2 및 습도가 포화상태인 배양기내에서 수정후 9일간 배양하였으며 체외배양후 2일, 7일 및 9일째에 수정란을 관찰하여 분할율, 확장배반포 및 부화배반포로의 발생률을 산정하였다.

4. 실험설계

실험 1에서는 플라스틱 4-well dish를 이용하여 과립막세포의 첨가유무가 체외수정후 난분할 및 체외발육에 미치는 영향을 검토하였고, 실험 2에서는 플라스틱 4-well dish에 과립막세포를 첨가하는 성숙배양방법과 과립막세포를 첨가하지 않고 미소적을 이용하는 체외성숙방법이 수정후 분할 및 배반포로의 체외발육에 미치는 영향을 조사하였다.

5. 통계학적 분석

각 실험에 있어서 분할율, 확장배반포 및 부화배반포로의 체외발육률은 Statistical Analysis System(SAS, 1990)의 General Linear Model (GLM) procedure를 이용하여 각 처리군간의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 체외성숙과정에 있어서 과립막세포의 첨가효과 (실험 1)

체외성숙과정에 있어서 배양액내에 과립막세포의 첨가가 소 난포란의 분할 및 체외발육에 미치는 영향을 조사하였다. 과립막세포 첨가군에서 체외수정 30시간후의 분할율 및 2일후의 분할율은 각각 68 및 85%로 무첨가군의 64, 80%와 유사한($p>0.05$) 결과를 보였다(Table 1). 확장배반포로의 체외발육률은 과립막세포첨가군에서 21%로 무첨가군의 10%에 비해 유의적으로 높은($p<0.05$) 결과를 나타내었으나 부화배반포로의 발육률은 두 군간에 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다(Table 2).

2. 과립막세포의 첨가 여부 및 성숙배양방법에 따른 소 난자의 체외발육 (실험 2)

과립막세포를 첨가한 4-well plastic dish를 이용하는 체외성숙방법 (1군)과 과립막세포가 첨가되지 않은 미소적배양방법(2군)이 소 난포란의 체외발육에 미치는 영향을 조사하였다. 1군 및 2군에서의 체외수정 30시간, 2일후의 분할율은 각각 68, 80% 및 69, 78%로 두 군간에 유의적인 차이가 인정되지 않았다(Table 3). 확장배반포 및 부화배반포로의 체외발육률도 1군에서 20 및 10%, 2군에서 21 및 11%로 유의적인 차이가 없었다(Table 4).

Table 1. Effect of granulosa cells added to maturation medium on subsequent cleavage and development of bovine oocytes cultured in a well of 4-well dishes

Granulosa cells	No. of oocytes inseminated[a]	Oocytes cleaved at (%±SEM)	
		30 hours after IVF	2 days after IVF
Yes	158	68±9	85±11
No	163	64±8	80±10

[a] Three replicates.

Table 2. Effect of granulosa cells added to maturation medium on subsequent *in vitro* development of bovine embryos

Granulosa cells	No. of embryos cultured[a]	Oocytes developed to (%±SEM)[b]	
		ExBL	HBL
Yes	150	21±7[c]	14±6
No	157	10±3[d]	8±3

[a] Three replicates.

[b] ExBL; expanding blastocyst, HBL; hatching blastocyst.

[cd] Different superscripts in the same column differ significantly ($p<0.05$).

Table 3. Effect of two culture systems for *in vitro* maturation on subsequent cleavage rates of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*

Culture system for IVM[a]	No. of oocytes matured[b]	Oocytes cleaved at (%±SEM)	
		30 hours after IVF	2 days after IVF
Well with Gr-cell	551	68±7	80±6
Drop without Gr-cell	539	69±7	78±4

[a] Gr-cell; granulosa cells.

[b] Five replicates.

Table 4. Subsequent *In vitro* development of bovine embryos matured *in vitro* by two different maturation systems

Culture system for IVM[a]	No. of oocytes cultured[b]	Embryos developed to (%±SEM)[c]	
		ExBL	HBL
Well with Gr-cell	503	20±3	10±4
Drop without Gr-cell	480	21±5	11±5

[a] Gr-cell; granulosa cells.

[b] Five replicates.

[c] ExBL; expanding blastocyst, HBL; hatching blastocyst.

고 찰

소 난포란의 체외성숙 및 수정에 있어서 난자의 핵 및 세포질 성숙은 그 후의 체외발육에 영향을 미치는데 과립막세포는 난자-난구세포복합체와의 상호작용을 통하여 난자의 발생능획득에 관여하는 것으로 알려져 있다(Thibault 등, 1987; Sutovsky 등, 1993). 미성숙난자의 체외성숙에서 배양액중에 첨가되는 과립막세포는 수정후의 배 발육을 촉진시키는 작용이 있다고 보고되었으나(Fukui와 Ono, 1989; Suh 등, 1993) 이와는 반대로 과립막세포가 체외에서 소 난자의 성숙분열 재개를 억제한다는 보고도 있다(Sirard와 Bilodeau, 1990). 실험 1에서 소 난자의 성숙배양시에 첨가된 과립막세포는 확장배반포로의 발육률을 개선하였는데 이는 과립막세포가 체외성숙, 수정 및 그 후의 발생을 촉진시켰다는 선인들의 보고 (Critser 등, 1986; Mochizuki 등, 1991; Suh 등, 1993)와 일치하는 결과이다. 그러나 실험 2에서 과립막세포를 첨가하지 않고 50 μl의 미소적에 9~10개의 미성숙난자를 넣어 성숙배양 (1군)한 결과 500 μl의 배양액에 35~40개의 미성숙난자를 넣고 과립막세포와 공배양하는 방법 (2군)에서와 유사한 분할율 및 배반포로의 발육률을 나타내었다. 1군 및 2군에서 미성숙난자 1개당 성숙배양액은 각각 약 5 μl와 13 μl로서 1군에서 난자의 배양밀도가 높았다.

Paria와 Dey (1990)는 마우스 수정란의 체외배양실험에서 수정란을 집단으로 배양하는 것이 수정란의 체외발육을 증가시키며, 수정란당 배양액의 양을 증가시킬 경우 발육이 저하된다고 보고함으로써 수정란 자체가 분비하는 물질에 의해 발육이 증가하는 autocrine 작용을 시사하였으며, Kato 등 (1994)도 마우스 수정란의 배양밀도를 증가시킬 경우 배반포로의 발육이 개선되었다고 하였다. 난구세포는 과립막세포의 subtype으로서 성선자극호르몬과의 결합능 또는 스테로이드의 합성능에서 과립막세포와 유사한 생리적 특징을 가지는 것이 보고되었다(Rabahi 등, 1991). 과립막세포의 분비능에 관해서 Adashi 등 (1991)은 과립막세포가 IGF-1을 분비하며 이로 인해 과립막세포 자신의 증식 및 스테로이드 합성능이 자극을 받는다고 하였고, Lobb와 Dorrington (1992)은 돼지 난포액에서 EGF와 유사한 활성을 관찰하였으며, 소 난소의 협막세포에서 TGF-α와 TGF-β의 존재를 확인하였다. 난구세포의 분비능에 관해서는 아직 명확히 밝혀진 바가 없어 구체적인 설명은 불가능하나 난자를 둘러싸고 있는 난구세포가 자신의 증식 및 난자의 성숙을 촉진시키는 물질을 분비한다면 실험 2에서 난자의 배양밀도가 높은 2군에서 autocrine factor에 의한 성숙작용이 강하게 나타났을 것으로 생각되며, 이로 인해 과립막세포를 첨가하지 않고 미소적내에서 성숙배양된 난자가 공배양된 난자와 유사한 결과를 나타냈을 가능성이 있다. 미소적을 이용한 체외성숙에 있어서 과립막세포의 첨가효과 및 미성숙난자의 배양밀도에 따른 배발생능에 관해서는 더욱 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과로부터 소 난포란의 성숙배양에 있어서 소량의 미소적에 다수의 난자를 배양할 경우 과립막세포를 첨가하지 않고도 정상적으로 수정, 분할 및 체외발육이 가능하다는 것이 밝혀졌다.

적 요

소 난포란의 체외성숙에 있어서 과립막세포와의 공배양법과 과립막세포를 이용하지 않는 미소적 성숙배양법에 따른 체외수정후의 분할 및 배반포로의 발육률을 비교함으로써 체외성숙체계의 간편화에 대한 가능성을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 체외성숙 배양액에 첨가된 과립막세포는 소 난자의 체외수정 30시간 및 2일후의 분할율을 증가시키지는 못하였으나 과립막세포를 첨가하지 않고 체외성숙된 난자에 비해 확장배반포로의 체외발육을 유의적으로 개선하였다 ($p<0.05$).
2. 소량의 배양액 미소적에 다수의 난자를 넣어 배양하는 체외성숙법은 플라스틱 4-well dish에 과립막세포를 첨가하여 사용하는 성숙법에 필적하는 분할율 및 배반포로의 발육률을 보여, 과립막세포를 첨가하지 않고도 소 난포란의 정상적인 성숙, 수정 및 체외발육을 가능하게 하였다.

참고문헌

Adashi EY, Resnick CE, Hurwitz A, Ricciarelli E, Hernandez R, Roberts CT, Leroith D and Rosenfeld R. 1991. Insulin-like growth factors: the ovarian connection. Hum. Reprod. 6:1213-1219.

Critser ES, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1986. Influence of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryonic development. Biol. Reprod., 34(Suppl. 1):286 (abstr).

Fukui Y and Ono H. 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.

Fukui Y, Lee ES and Araki N. 1996. Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from *in vitro* produced early bovine embryos. J. Anim. Sci., 74:2752-2758.

Fukui Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 26:40-46.

Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ and Kruip ThAM. 1990. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 26:222-226.

Kato Y, Ohno H, Fukuyama K and Tsunoda Y. 1994. Effect of the culture density of mouse zygotes on the development *in vitro* and *in vivo*. J. Mamm. Ova Res., 11:98-99.

Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acids uptake by *in vitro* produced bovine morulae and blastocysts. Biol. Reprod., 55:1383-1389.

Lee ES, Fujii Y and Fukui Y. 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. Theriogenology, 45:1151-1162.

Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL and First NL. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. Biol. Reprod., 36:376-383.

Lobb DK and Dorrington HWG. 1992. Intraovarian regulation of follicular development. Anim. Reprod. Sci., 28:343-354.

Lu KH, Gordon I, Gallagher M and McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. Vet. Rec., 121:159-260.

Luck MR, Rodgers RJ and Findlay JK. 1990. Se-

cretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during the *in vitro* differentiation of bovine granulosa cells. Reprod. Fertil. Dev., 2:11-25.

Mochizuki H, Fukui Y and Ono H. 1991. Effect of number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. Theriogenology, 36:973-986.

Moor RM and Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert., 49:101-109.

Paria BC and Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87:4756-4760.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL and First NL. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. Theriogenology, 24:537-549.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 5: 591-600.

Rabahi F, Monniaux D, Pisselet C, Chupin D and Durand P. 1991. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis of bovine follicular cells during the preovulatory period. Mol. Reprod. Dev., 30:265-274.

SAS. 1990. User's Guide: Statistics, Version 6, Cary, NC: Statistical Analysis System Institute Inc.

Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H and Schleger W. 1990. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. Theriogenology, 33:477-485.

Sirard MA and Bilodeau S. 1990. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. Biol. Reprod., 43:777-783.

Spicer LJ and Geisert RD. 1992. Concentrations of insulin-like growth factor-I, estradiol and progesterone in follicular fluid of ovarian follicles during early pregnancy in cattle. Theriogenology, 37:749-760.

Staigmiller RB and Moor RM. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Research, 9:221-229.

Suh TK, Rehman A, Collins A and Wright RW. Jr. 1993. Effects of granulosa cells from different size follicles in co-culture with bovine oocytes on maturation, fertilization and cleavage. Theriogenology, 39:323 (abstr).

Sutovky P, Flechon JE, Flechon B, Motlick J, Peynot N, Chesne P and Heyman Y. 1993. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture of cattle oocyte cumulus complexes. Biol. Reprod., 49: 1277-1287.

Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fert., 30:493-497.

Thibault C, Szollosi D and Gerard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. Reprod. Nutr. Dev., 27:865-896.

Yang X, Jiang S and Foote RH. 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. Mol. Reprod. Dev., 34:94-100.

Zuelke KA and Brackett BG. 1990. Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. Biol. Reprod., 43:784-787.

노상호, 이병천, 황우석. 1997. Glucose가 소 초기배의 분할 및 발육에 미치는 영향. 한국수정란

이식학회지 12:161-169.
이원유, 신태영, 이병천, 황우석. 1995. 배양기내 GAS분압의 조성이 소 체외수정란의 체 외발육에 미치는 영향에 관한 연구. 한국수정란이식학회지 10:121-129.

(접수일자 : 1997. 11. 17 / 채택일자 : 1997. 12. 20)