

정액종류 및 배양조건에 따른 체외수정란의 생산 및 동결보존의 효율에 미치는 영향

공 일 근 · 이 상 인
순천대학교 농과대학 동물자원과학과

Effect of Semen Sources and Culture System on Efficiency of IVP Embryo Production and Cryopreservation

I. K. Kong and S. I. Lee

Department of Animal Science and Technology, College of Agriculture, Suncheon National University

SUMMARY

The objective of this study was to optimize the selection of sperm sources, optimal culture systems and vitrification method depends on sperm sources. The oocytes were inseminated with either KPN 105, 114, 191, SNU 101, 102, 103 or epididymis and then embryos inseminated were cultured in oviductal cell co-culture or HECM-6 as defined medium. The blastocysts produced were pooled according to sperm sources as KPN, SNU or epididymis and then vitrified by OPP vitrification method. The results obtained were as follows:

1. The cleavage (86.2 or 84.7%) and development rates to blastocyst (30.6 or 32.0%) were not significantly different between oviductal cell co-culture or HECM-6 culture systems ($P < 0.05$).
2. To determine the optimal sperm sources for using IVF in this system, cleavage rates in KPN 191 and SNU 101 (74.2, 55.8%) were significantly lower rather than those in KPN 105, 114, SNU 102, 103 or epididymis (86.7, 85.1, 89.8, 85.5 or 81.2%), but development rates to blastocyst in KPN 114, SNU 103 or epididymis sperm (30.0, 33.0 or 28.6%) were significantly higher rather than those in KPN 105, 191, SNU 101, 102 (21.4, 15.4, 14.9 or 25.4%), respectively ($P < 0.05$).
3. The blastocysts produced were pooled according to sperm sources as KPN, SNU or epididymis and then vitrified by OPP vitrification method. The survival rates were not significantly different among sperm sources (89.6%: 43/48; 90.1%: 46/51; 83.3%: 20/24).

These results obtained indicate that the defined medium, HECM-6, could be use to produce of IVP bovine embryos. Since the frozen semen must be required to maintain of unvariation data in IVP embryo production system, KPN 114 and SNU 103 produced in our laboratory were useful for this purpose. The blastocysts produced by different sperm

이 논문은 1998년도 순천대학교 공모과제 학술연구비에 의하여 연구되었음

sources as KPN, SNU or epididymis were vitrified by OPP vitrification method and survived very high rates. The OPP vitrification method could be susceptible to use of IVP bovine blastocyst embryos.

(Key words: bovine, culture system, semen, OPP vitrification)

서 론

체외수정란의 생산을 위하여 체외배양체계, 정액의 종류 및 동결보존기법의 정립은 매우 중요한 요인들이다. 체외배양은 일반적으로 체세포와의 공배양(Goto 등, 1992; Rieger 등, 1995; Watanabe 등, 1999) 및 단순배양액(Krisher 등, 1998; McKiernan 등, 1995)에 의한 방법이 개발 이용되고 있다. 특히 체세포와의 공배양은 세포로부터 수정란의 발생을 도와주는 cytokine이나 성장인자의 분비에 의해 cell block의 극복과 아울러 배발달을 촉진하는 것으로 추측되고 있다. 그러나 난관상피세포와 같은 체세포의 분리 및 준비가 번거롭고 오염 가능성이 항상 존재함과 아울러 수정란의 대사에 관련된 많은 연구가 이루어짐으로써 단순배지의 이용 가능성이 많이 보고되고 있다.

체외수정에 이용되는 종모우의 정액에 따른 체외수정란의 생산효율과 체외수정란의 동결보존능력의 차이가 있기 때문에 그러한 변이를 최소한으로 줄여주면서 일정한 결과를 얻기 위하여 많은 연구자들이 동결정액을 이용하였다(Aoyagi 등, 1988; Niwa 와 Ohgoda, 1988). 이와 같은 체외수정에 이용되는 정자에 따른 변이를 줄이고 실험결과의 변이를 줄이기 위하여 가장 적합한 정액의 선택이 무엇보다 우선적으로 요구되고 있다. 본 연구를 위하여 연구실에서 Joe Bearden과 Fuquary (1997)의 방법에 준하여 자체제조한 SNU 101, 102 및 103의 정액은 도축장에서 무작위로 획득한 정소상체 미부에서 정액을 채취하여 동결정액을 제조·이용하였다.

체외수정란의 동결보존은 수정란이식을 위하여 반드시 해결되고 높은 생존율을 얻을 수 있는 효과적인 동결보존방법이 정립되어야 한다. 동결보존시 동결/융해속도, 동결보존액의 종류 및 수정란의 질적인 차이 등이 동결보존 후 생존율에 영향을 미치는 조건들로 보고되고 있다 (Leibo 등, 1993; Vajta

등, 1998; Hurtt 등, 1999; Kong 등, 1999a). 동결속도의 높이기 위하여 LN₂ 직접침지방법(Landa와 Tepla, 1990; Riha 등, 1991), electron microscopy grid의 이용(Martino 등, 1996; 김 등, 1998), OPS 방법(Vajta 등, 1998; Hurtt 등, 1999) 및 OPP 방법(Kong 등, 1999b) 등이 보고되었다. 또한 각종 동결보존액 중에서 VS3a 방법(Rall과 Wood, 1994), EFS 방법(Kasai 등, 1990; Hurtt 등, 1999), ethylene glycol/PVP 방법(Leibo와 Oda, 1993) 및 EDS(Vajta 등, 1998)이 보고되었다.

이상에서 논의한 바와 같이 체외수정란의 생산을 위하여 요구되는 체외배양체계, 정액의 종류 및 동결보존 등에 관하여 적합한 방법을 선택하여 효율적인 체외수정란을 생산하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 체외수정란의 생산

채란된 미성숙난자는 25 mM Hepes TCM-199 (Sigma, USA)에 100 µg/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin G, 10 µg/ml LH, 35 µg/ml FSH, 1 µg/ml estradiol-17β 및 10% FCS를 첨가하여 24시간 체외성숙을 유도한다. 정자는 한우 동결정액을 용해후 10 ml D-PBS에 5분간 1,600 rpm으로 원심분리하여 세척하여 상층액은 제거하고 400 µl의 50 ng/ml heparin을 첨가하여 5% CO₂, 39°C incubator에서 15분간 배양함으로써 수정능획득을 유도하였다. 수정능획득된 정자는 TL-FERT medium으로 1~2×10⁶ sperms/ml으로 희석한 후 체외성숙배지를 제거한 후 약 600 µl의 정자를 주입함으로써 체외수정을 유도하였다. 체외수정후 24시간째에 체외수정란은 TL-Hepes로 2분간 vortexing하여 과립막세포와 정자 등을 제거한 후에 3~4회 세척하여여여여여여여% CO₂, 39°C incubator에 전배양이 되어있는 배지에 배배를 실시하였다.

2. 체외배양액의 비교

체외수정란의 생산효율을 향상시키고 배양액의 종류에 따른 체외수정란의 동결보존에 미치는 영향을 조사하기 위하여 공배양 방법으로 난관상피공배양(TCM-199 + oviductal cell; Gandolfi 등, 1993) 및 단순배양배지(HECM-6 + amino acids; McKiernan 등, 1995; Krisher 등, 1998)에 옮겨서 배양을 실시하였다. 체외수정 후 약 48시간대에 2-세포기 이상으로 분할된 수정란만을 선발하여 체외수정란으로 판정하여 계속 신선배지로 옮겨서 약 7일간 배양을 실시하였다. 이때 HECM-6의 경우에는 수정후 72시간까지만 배양하고 10% FCS TCM199으로 옮겨 배양을 실시하였다.

3. 종모우의 정액동결 및 개체비교

도축장에서 채집한 정소상체 미부 정액을 채취하여 Tris-egg yolk diluter(diluter)로 동결을 실시하여 본 연구에 이용하였다. 동결정액의 제조는 Joe Bearden과 Fuquay(1997)의 방법에 준하여 실시하였는데 간단히 설명하면 채취된 정액은 39°C diluter I (No glycerol)에 4×10^6 sperms/ml의 농도로 희석하여 39°C 온수가 담긴 500 ml beaker에 담아 5°C 냉장고에서 약 2~3시간에 걸쳐 5°C까지 냉각을 유도하였다. 이때 같은 용량의 diluter II (14% glycerol)도 냉각을 유도하여 냉각된 diluter II를 10, 20, 30 및 40% 용량으로 diluter I에 20분간격으로 첨가/희석하여 4시간동안 평형을 유도후 0.25 ml straw에 주입하여 LN₂ vapour에서 예비동결후 LN₂에 침지/동결을 실시하였다. 이때 냉각 후부터는 모든 작업을 5°C 항온실에서 수행하여 온도변화에 의한 손상을 최대한 방지하였다.

4. OPP vitrification 동결보존 및 융해

OPP (open pulled capillary glass pipette) straw는 Kong 등 (1999b)의 방법에 준하여 제조하였다. 외경 1 mm의 glass pipette을 0.3 mm의 외경으로 뽑아서 70% alcohol로 소독 후 실험에 이용하였다. 동결보존액의 제조는 기본액 (TCM-199 plus 20% FCS)에 7.5% ethylene glycol, 7.5% DMSO를 첨가한 VS1과 16.5% ethylene glycol, 16.5%

DMSO, 0.5 M sucrose를 첨가한 VS2를 제조하였다. 체외수정 후 8일째에 배반포기까지 발달한 것 중에서 형태학적으로 우수한 수정란만을 골라 동결을 실시하였는데 선발된 수정란을 VS1에 1분간 노출시킨 후 20 μl VS2에 옮겨 OPP straw에 주입하여 30초 이내에 LN₂에 직접 침지하였다. 융해는 0.25 M sucrose 용액에 OPP straw를 직접 담그면서 반대편 끝부분을 손가락으로 막으면서 OPP straw내 용적의 평창에 의하여 수정란을 포함하고 있는 동결보존액이 누출되게 하였다. 약 5분후 0.15 M sucrose 용액, 기본액으로 각각 5분간씩 희석후 배양액으로 옮겨 배양을 실시하였다.

5. 동결융해란의 생존성 조사

동결/융해된 배반포기때는 다시 배양액에서 24시간 동안 배양을 실시하여 재확장배반포기까지의 배발달을 조사하였다.

6. 통계처리

각 실험결과와 통계분석은 SAS (Statistical Analysis System) package에 의한 chi-square test를 실시하여 처리군과의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 체외수정란의 생산을 위한 체외배양액의 비교

체외수정란의 체외배양을 위하여 단순배지로서 HECM-6 medium과 난관상피세포 공배양 (TCM-199)의 비교를 실시한 결과는 Table 1에서와 같다. 이때 이용된 정자는 2마리 이상의 수소 정소상체 미부 정자를 이용하여 체외수정을 실시하였다. HECM-6와 난관상피세포 공배양에서 분할율 (84.7 및 86.2%) 및 배반포기 발달율 (32.0 및 30.6%)로서 유의적 ($P < 0.05$)인 차이를 보이지 않았다. 또한 7일째 및 8일째에서도 배양액의 종류에 따른 배발달율에는 유의차가 없었다.

난관상피세포를 비롯한 많은 체세포와의 공배양에 의한 체외수정란의 생산에 이용되어 많은 연구자에 의해 공배양시 배양액내의 독성물질의 억제효과 및 성장촉진인자의 배출 등과 같은 이점에 대하여 보고된 바 있다 (Wierner 등, 1991; Goto 등,

Table 1. Effect of culture systems on *in vitro* development of bovine IVP embryos

Types of culture system	No. of		No. & (%) of blastocyst developed at /cleaved		
	Oocytes used	Embryos cleaved(%)	Day 7	Day 8	Total
Defined medium with HECM-6	184	156(84.7) ^a	28(17.9) ^a	22(14.1)	50(32.0) ^a
Co-culture with TCM-199	167	144(86.2) ^a	23(16.0) ^a	21(14.6)	44(30.6) ^a

* Values with same superscripts in column were not significantly different (P<0.05).

Table 2. Effect of semen kinds for fertilization on development of IVP bovine embryos

Kinds of semen	No. of		No. & (%) of blastocyst developed at /cleaved		
	Oocytes used	Embryos cleaved(%)	Day 7	Day 8	Total
KPN 105	135	117(86.7) ^a	15(12.8) ^{abc}	10(8.5)	25(21.4) ^{bc}
KPN 114	141	120(85.1) ^a	24(20.0) ^{ab}	12(10.0)	36(30.0) ^{ab}
KPN 191	105	78(74.3) ^b	7(8.9) ^c	5(6.4)	12(15.4) ^c
SNU 101	120	67(55.8) ^c	6(8.9) ^c	4(5.9)	10(14.9) ^c
SNU 102	127	114(89.8) ^a	20(17.5) ^{abc}	9(7.9)	29(25.4) ^{abc}
SNU 103	124	106(85.5) ^a	23(21.7) ^a	12(11.3)	35(33.0) ^a
Epididymis fresh	138	112(81.2) ^{ab}	19(16.9) ^{abc}	13(11.6)	32(28.6) ^{ab}

* Values with different superscripts in the same column were significantly different (P<0.05).

1992; Rieger 등, 1995; Watanabe 등, 1999). 또한 Watanabe 등 (1999)은 과립막세포와의 공배양시 배반포기배의 발달율이 훨씬 높은 배발달율을 보고하여 체세포와의 공배양에 의한 결과는 연구자에 따른 차이가 있는 것으로 판단된다. HECM-3에 11 종류의 amino acids의 첨가한 HECM-6의 단순배지에 수정 후 72시간동안 배양 후 10% FCS TCM-199에 배양하는 단순배양법이 보고된 바 있다 (Krisher 등, 1998; McKiernan 등, 1995). 초기의 과영양공급과 난관상피세포와의 공배양에 의해 해당 작용이 훨씬 높아져 인위적인 대사작용에 의해 체외수정란의 이식 후 생존력이 낮아지는 결과를 보고한 바가 있다.

본 연구에서는 난관상피세포와의 공배양 및 HECM-6에 의한 단순배양법에 따른 배발달율에는 유의적인 차이가 없었다. 그러나, 난관상피세포의 준비과정 등에 의한 오염과 시간적인 불편함 등을 고려하여 HECM-6의 단순배지를 선택하게 되었다.

2. 한우 정액간에 체외수정란의 생산효율의 비교

한우 체외수정란의 생산을 위하여 이용되는 한우 정액의 질적인 차이뿐만 아니라 lot number에 따른 오염원의 존재때문에 실제로 대학 및 연구소에서 이용하는데 상당히 많은 어려움을 겪고 있다. 그리하여 본 연구에서 한우개량사업소에서 공급되고 있는 한우정액 KPN 105, 114, 191, SNU 101, 102, 103 및 정소상체 미부 정자를 구입 및 자체동결정액을 제조하여 체외수정을 유도하여 이식 가능한 배반포기배 발달율을 비교/조사하였다. KPN 198은 정액의 오염에 의해 본 실험에 이용하지 못하여 제외하였다. 체외수정란의 체외배양은 단순배지인 HECM-6에 72시간동안 배양 후 10% FCS TCM-199에 옮겨 이후 계속 배양하였다. 분할란을 기준으로 수정능력을 판단하였을 때 KPN 191 및 SNU 101 (74.2, 55.8%)은 KPN 105, 114, SNU 102, 103 및 신선 정소상체 미부 정자 (86.7, 85.1, 89.8, 85.5 및 81.2%)보다 유의적 (P<0.05)으로 낮은 분할율을 보였다. 그러나, 8일째까지의 배반포기배 발달율

Table 3. Effect of semen kinds on post-thaw survival of IVP bovine blastocyst cryopreserved by OPP vitrification

Kind of semen	No. of blastocyst			No. & (%) of blastocyst to re-expanded / recovered
	Vitrified	Recovered	Replicated	
KPN	48	48	12	43(89.6) ^a
SNU	52	51	13	46(90.1) ^a
Epididymis	24	24	6	20(83.3) ^a

* Values with same superscripts in column were not significantly different ($P < 0.05$).

에는 KPN 114, SNU 103 및 정소상체미부정자 (30.0, 33.0 및 28.6%)가 KPN 105, 191 및 SNU 101, 102 (21.4, 15.4, 14.9 및 25.4%)보다 높은 발달율을 보여 종모우의 개체간에 유의적 ($P < 0.05$)인 차이를 보였다.

이와 같이 종모우의 개체 차이에 따라 분할을 및 배발달율이 유의적인 차이로 나타나는 것은 수정과 정뿐만 아니라 배발달에도 영향을 미친다고 보고하였다 (Shi 등, 1990; Barandi 등, 1993). 본 연구에서도 종모우 개체 차이에 의한 배발달율에 유의적인 차이를 보였다.

2. OPP vitrification에 의한 배반포기배의 동결보존

배반포기배까지 발달한 체외수정란을 OPP vitrification 방법에 의한 동결보존을 실시하여 얻은 결과는 Table 3에서와 같다. 이때 동결보존에 이용한 배반포기배는 형태학적으로 우수한 것만을 수정 후 8일째에 KPN, SNU, epididymis 처리군의 것을 pooled 하여 선발/이용하였다. OPP vitrification 동결시 straw당 4개의 수정란만을 주입하여 동결보존액 및 수정란이 wide column까지 주입되지 않도록 매우 세심하게 실시하였다 (Kong 등, 1999a). 체외수정란을 KPN, SNU 또는 정소상체 미부 정자로만 구분하여 선발하였기 때문에 한우 종모우의 개체차에 의한 data는 얻을 수 없었지만 KPN, SNU 및 정소상체미부정자의 차이에 의한 동결보존 후 생존율을 살펴보았다. 이에 정자의 근원에 다른 유의차이는 보이지 않았지만 OPP vitrification 동결보존방법이 매우 효과적이며, 높은 용해 후 생존율을 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 실제로 어떤 처리구에서는 용해 후 100% 생존율을 보인 경우도 있었다.

OPS vitrification 동결보존방법이 Vajta 등 (1998)에 의해 보고된 이후 vitrification 동결속도, 보존액의 volume이 용해 후 생존율에 절대적인 영향을 미친다고 알려져 있다 (Leibo 등, 1993; Kasai 등, 1996; Vajta 등, 1998). Kong 등 (1999a, b)은 OPP vitrification 방법에 의한 생쥐 수정란의 동결보존에서 OPS대 OPP straw의 용적 비교 및 OPP straw의 특성, 즉 적은 volume과 액체질소에 침지 시 다시 부유되지 않는 장점에 대하여 보고하였다. 또한 straw당 주입되는 수정란의 수가 straw loading volume에 절대적인 영향을 미침으로써 용해후 생존율에도 지대한 영향을 미치므로 4개 이하로 하는 것이 적당하다고 하였다. 그리하여 본 연구에서도 straw 당 loading되는 수정란의 수를 4개로 동결을 실시한 결과 높은 생존율을 얻을 수 있었다. 이와 같이 vitrification의 방법은 동결/용해속도의 증가에 의한 세포의 손상을 최소한으로 줄이는 방법으로 발전되어오면서 액체질소에 직접 침지하는 방법 (Riha 등, 1991), electron microscopy grid의 이용 (Martino 등, 1996; 김 등, 1998), OPS 방법 (Vajta 등, 1998; Lewis 등, 1999) 및 OPP 방법 (Kong 등, 1999a) 등이 보고되었다. 그러나 이와 같은 방법에서도 액체질소에 직접 침지에 의한 액체질소로부터의 오염을 완전히 방지할 수 없는 단점이 여전히 남아있어 이의 해결방법이 개발되어야 할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 체외수정란의 생산효율을 향상시키기 위하여 배양조건, 적당한 정액의 선택 및 동결보존 기법을 정립하기 위하여 실시하였다. 체외수정란의 배양은 난관상피세포와의 공배양 및 HECM-6의 단

순배양법을 비교하였고, 정액의 선발을 위하여 KPN 105, 114, 191, SNU 101, 102, 103 및 정소상체 미부 정자를 비교하였다. 이렇게 생산된 수정란은 OPP vitrification 동결보존법으로 동결/융해하여 생존율을 조사였다.

1. 체외수정란의 배양조건으로 난관상피세포와의 공배양 및 HECM-6 단순배양법 간에는 분할율 (86.2 및 84.7%) 및 배반포기 발달달을 (30.6 및 32.0%)에 유의적인 차이가 없었다 ($P < 0.05$).
2. 적당한 정액을 선발하기 위하여 KPN 105, 114, 191, SNU 101, 102, 103 및 정소상체 미부 정자로 체외수정란을 생산하였던 바 KPN 191 및 SNU 101 (74.2, 55.8%)이 KPN 105, 114, SNU 102, 103 및 정소상체 미부 정자 (86.7, 85.1, 89.8, 85.5 및 81.2%)보다 유의적으로 낮은 분할율을 보였고, 배반포기 발달율에서는 KPN 114, SNU 103 및 정소상체 미부 정자 (30.0, 33.0 및 28.6%)에서 KPN 105, 191, SNU 101, 102 (21.4, 15.4, 14.9 및 25.4%)보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다 ($P < 0.05$).
3. KPN, SNU 및 신선 정소상체 미부 정자에 의하여 생산된 배반포기배를 OPP vitrification 방법으로 동결보존을 실시한 결과 유의적인 차이 없이 89.6% (43/48), 90.1% (46/51) 및 83.3% (20/24)의 높은 생존율을 보였다.

이상의 결과로부터 체외수정란의 체외배양시 HECM-6에 의한 단순배양의 이용은 공배양보다 간편하며 오염원을 줄일 수 있을 판단된다. 체외수정시 이용되는 정자는 실험의 변이를 최소한으로 줄이기 위하여 동결정액의 이용이 필수적으로 요구되고 있어 자체 제조한 SNU 103과 KPN 114의 정액이 본 연구실의 조건에 적합한 것으로 사려된다. 이와같은 방법으로 생산된 배반포기배를 OPP vitrification 방법으로 동결보존을 실시한 결과 매우 높은 융해 후 생존율을 보여 이의 동결보존방법이 매우 적합한 것으로 판단된다.

참고문헌

- Aoyagi Y, Fujii K, Irazumi Y, Furudate M, Fukui Y and Ono H. 1988. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*, 30:973-985.
- Barandi ZL, Solti S, Cseh ZS, Varga Z, Machaty and Vajta G. 1993. Comparison of the *in vitro* fertilizing ability of sperm from endangered Hungarian Grey bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 31:13-19.
- Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S, Bianchi R and Passoni L. 1993. Role of the oviduct during early embryogenesis. *Reprod. in Domestic Anim.*, 28:189-192.
- Goto K, Niwa N, Takuma Y and Nakanishi Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
- Hurt AE, Squires EL and Seidel, Jr. RE. 1999. Vitrification of equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open pulled straws. *Theriogenology*, 51:166 (abstr).
- Joe Bearden H and Fuquay JW. 1997. Applied animal reproduction. Prentice Hall, Inc., 4th (edi). pp 171-191.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsunoda H, Sakurai T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.*, 89:91-97.
- Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T and Edashige K. 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology*, 33:459-464.
- Kim EY, Kimn NH, Yi BK, Yoon SH, Park SP, Chung KS and Lim JH. 1998. Developmental capacity of bovine follicular oocytes after ultra-rapid freezing by electron micro-

- scope grid. II. Cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocytes. Korean J. Anim. Reprod., 22:1-9.
- Kong IK, Cho SK and Cho SK. 1999. Effect of cryoprotectant kinds and cell stages on the viability of mouse embryos cryopreserved by OPP vitrification. Korean J. Anim. Reprod., 23: (submitted).
- Kong IK, Cho SK, Lee SI and Cho SK. 1999. Comparison of open pulled straw (OPS) vs open pulled capillary glass pipette (OPP) vitrification in mouse embryos. 32nd Annual Meeting of SSR at Washington State Univ, Pullman, Washington, USA, 1999 (in press).
- Krisher RL, Lane M and Bavister BD. 1998. Influence of semi-defined and defined culture media on the development, cell number and metabolism of bovine embryos. Theriogenology, 49:207 (abstr).
- Leibo SP and Oda K. 1993. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. Cryo-Letters, 14:133-144.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod., 54:1059-1069.
- McKiernan SH, Clayton MK and Bavister BD. 1995. Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 42:188-199.
- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology, 30:733-741.
- Rall WF and Wood MJ. 1994. High *in vitro* and *in vivo* survival of Day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. J. Reprod. Fertil., 101:681-688.
- Rieger D, Grisart B, Semple E, Van A, Langendonck , Betteridge KJ and Dessy F. 1995. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. J. Reprod. Fertil., 105:91-98.
- Riha J, Landa V, Kneissl J, Matus J, Jindra J and Kloucek Z. 1991. Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after nonsurgical transfer. Zivoc. Vir., 36:113-120.
- Shi DS, Lu KH and Gordon I. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. Theriogenology, 33:324 (abstr).
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callesen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol. Reprod. Dev., 51: 53-58.
- Watanabe YF, Watanabe MR, Vila RA, Galerani MAV and Lobe RB. 1999. The influence of B2 and a modified CR-2 medium on the *in vitro* production of bovine embryos with cumulus and oviduct co-culture. Theriogenology, 51:259 (abstr).
- Wiemer KE, Watson AI, Polanski V, McKenna AI, Fick CH 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.

(접수일 : 1999. 1. 26 / 채택일자 : 1999. 3. 11)