

## 소 체외수정란의 배양조건이 동결-융해 배반포의 생존에 미치는 영향

윤종택<sup>†</sup> · 이호준 · 노상호 · 정연길 · 박용습 · 최은주 · 이종완\* · 김용엽\* · 정혜영\*

한경대학교 동물생명자원학과

### Effect of Culture Conditions on Survival of Frozen-Thawed Blastocysts Fertilized *In Vitro*

J. T. Yoon<sup>†</sup>, H. J. Lee, S. Roh, Y. G. Jung, Y. S. Park, E. J. Choi,

J. W. Lee, Y. Y. Kim\* and H. Y. Jung\*

Department of Animal Life and Resources, Hankyong National University, Kyonggi-do 456-749

#### SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of co-culture system (bovine oviduct epithelial cells; BOEC) and defined culture system (modified TALP; mTALP) on the development of IVM-IVF embryos, and survival of *in vitro* produced blastocysts after freezing and thawing. Oocytes from the slaughterhouse ovaries were matured and fertilized using general protocol. The results obtained were as the following: 1. Survival rates of frozen-thawed blastocysts using 10% glycerol as cryoprotectant was higher in Day 7 blastocysts than in Day 8 and 9 blastocysts from co-culture system, but survival rate of frozen-thawed blastocysts was higher in Day 10 blastocysts than in Day 8 and 9 blastocysts from defined culture system. Regardless of their age, survival rate of frozen-thawed blastocysts was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in co-culture system than in defined culture system. 2. The cell number of blastocysts was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in Day 7 blastocysts than in Day 8 and 9 blastocysts from co-culture, but the cell number of blastocysts was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in Day 10 blastocysts than in Day 8 and 9 blastocysts from defined culture system. Regardless of the culture system, blastocysts with higher cell number showed higher survival rates after freezing and thawing.

(Key words : blastocyst, bovine, cryopreservation, *in vitro* culture)

#### 서 론

소 체외수정란의 동결-융해 후 생존성에 관한 연구는 많은 연구자들로부터 이루어졌으며, 결과 체외수정 후 배양조건 (Rorie 등, 1990), 동해방지제의 평형방법 혹은 제거방법 (Voelkel과 Hu, 1992), 동해방지제의 종류 (Suzuki 등, 1993), 수정란의 발

육단계 (Han 등, 1994), 체외 생산 일정 (Takagi 등, 1994), 냉각속도 (Liu 등, 1996) 등에 의해 영향을 받는다고 보고되고 있다. 현재 소 체외수정란의 동결보존 방법에는 완만동결법, 초차화동결법 등이 이용되고 있으며 완만동결법은 소 체내수정란을 동결하기 위하여 개발된 방법으로 소 체외수정란도 동결한 보고가 있다 (Massip 등, 1993). 체외수정란의 냉각에 대한 감수성에 대해서는 여러가지 요

「본 연구는 1997년도 학술진흥재단 자유공모과제 연구비에 의해 수행되었음.」

\* 공주대학교(Kongju University)

<sup>†</sup> 교신저자

인이 작용하는데 (Mahmoudzadeh 등, 1994), Leib-o와 Loskutoff (1993)는 냉각에 대한 감수성의 원인은 체외수정란의 부력밀도가 낮으며 또한 투명대 소화시간이 체내수정란에 비해 짧았다고 하였으며 Pollard와 Leibo (1994)는 체외수정란이 체내수정란에 비해 냉각에 대한 감수성이 매우 민감하며 특히 +10℃~-5℃ 온도에서 더욱 민감하여 손상 받거나 사멸하게 되는데 이것은 수정란의 발육단계와 배양된 조건에 관계된다고 하였다. 따라서 각종 체외조작을 거쳐야 하는 수정란이식 기술의 발전을 위해서는 최적의 동결된 체외수정란의 생존성을 높이는 것이 중요한 연구과제이며 이를 위해 배양 및 동결조건을 확립하는 것이 수정란이식 기술의 효율을 극대화하는 방안의 하나가 된다.

본 연구에서는 상기 연구자들의 보문을 근거로 하여 소에서 체외수정 후 배양조건이 동결-융해 후 생존성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채란 및 체외성숙

도축장에서 도축된 한우난소를 항생제 (penicillin G 100 units/ml, streptomycin 100 $\mu$ g/ml)가 첨가된 35℃의 0.85% 생리식염수에 침적, 2시간 이내에 실험실로 운반하여 생리식염수로 3~4회 세척하고 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 2~6 mm의 난포로부터 난포액과 난자를 흡입, 채취하였다.

채취된 난자는 TCM-199 (Gibco BRL Life Technologies, Inc, USA)을 50  $\mu$ g/ml의 gentamycin (동신제약, 한국)이 첨가된 기본배양액으로 3~4회 세정하여 상층액 및 이물질을 제거한 후 실험현미경하에서 3층 이상의 치밀한 난구세포층을 가진 난포란을 선별하여 10% 우혈청 (fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA), 5  $\mu$ g/ml FSH (Sigma, USA), 1  $\mu$ g/ml estradiol (Sigma, USA) 및 50  $\mu$ g/ml gentamycin이 첨가된 TCM-199 성숙배양액에 1~2회 세정 후 동 배양액이 0.5 ml씩 분주된 4-well dish (Nunc, Denmark)에 40~50개/well의 난포란을 넣고, 39℃ 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 24시간

동안 체외성숙을 유도하였다.

### 2. 정자처리 및 체외수정

한우동결정액을 38℃의 온수에서 15~20초간 용해한 후 90% 및 45% Percoll gradient (Sigma, USA)를 이용하여 600 $\times$ g로 20분간 원심분리하여 sperm pellet을 확보하고 이를 3 ml의 sp-TALP (정자처리용 TALP)로 희석하여 600 $\times$ g로 5분간 다시 원심분리를 하므로 정자세정을 실시하였다. 정자를 처리하는 동안 성숙된 난자는 60 mm dish에 43  $\mu$ l의 IVF-TALP 미소적을 만들고 3  $\mu$ l IVF-TALP에 5~7개씩 난자가 함유되도록 하여 IVF-TALP 미소적에 넣어 체외수정을 준비하였다. 정자의 수정능획득은 100  $\mu$ g/ml의 heparin IVF-TALP에서 15분처리하여 유도하였다. 이후 정자는 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 개/ml의 농도로 조정하여 IVF-TALP drop에 4  $\mu$ l씩 주입, 18시간 동안 39℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 체외수정을 유도하였다.

### 3. 공배양세포 (난관상피세포) 준비

도축장에서 채취한 소의 난관을 5℃로 유지하여 실험실로 옮겨 멸균된 수술기구로 결합조직과 지방조직을 완전히 제거하고 70% 알코올로 소독한 후 난관 전체를 가볍게 문지른 다음 난관누두부에서 자궁-난관접합부 쪽으로 3 ml TCM-199을 관류시켜 난관상피세포 (bovine oviduct epithelial cells; BOEC)를 회수하였다. 회수된 난관상피세포는 200 $\times$ g로 5분간 원심분리 후 BOEC 세포괴만 남기고 상층액을 버렸다. 이후 200 $\times$ g로 5분간 2회 추가 원심분리를 실시, 세정하고 10% FBS 첨가된 배양용 배양액으로 1회 더 원심분리 후 최종 농도가 1 $\times$ 10<sup>6</sup>cell/ml이 되도록 조정한 후 4-well dish에 0.5 ml씩 분주하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양, 단층세포의 형성을 유도하였다.

### 4. 체외배양

#### 1) 공배양

체외수정된 난자를 TCM-199으로 2~3회 세척한 후 1 ml의 배양배지를 35mm dish에 넣고 1000  $\mu$ l의 pipet으로 pipetting을 실시하여 난구 및 과립상체

포를 제거하였다. 이후 수정란을 난관상피세포가  $1 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 조정되어 4-well dish에 배양된 각 well에 신선배양액 0.5 ml을 첨가한 후 15~20개의 수정란을 넣어 공배양을 실시하였으며, 매 48시간마다 0.5 ml의 배지를 제거하고 신선배양액 0.5 ml을 첨가하여 교환하면서 수정 후 7~10일까지 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 배양기에서 배양을 실시하였다.

## 2) 단순배양

수정란의 체외배양을 위해 사용한 m-TALP는 100 mM NaCl (Sigma, USA, 이하 모두 Sigma), 3.2 mM KCL, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na-lactate (60% syrup), 0.5 mM Na-Pyruvate, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM Glucose와 2% EAA (essential amino acid; EAA) 및 1% NEAA (nonessential amino acid; NEAA)를 혼합한 것에 1% ITS와 3 mg/ml BSA를 첨가하고 삼투압을 270~1280 mOsm, pH 7.4로 조정한 후 0.2 µm의 filter로 여과 및 균하여 준비하였다.

체의 수정된 난자는 세정용 mTALP 배양액으로 2~3회 세정 및 난구세포를 제거한 후 25~30 µl씩 분주된 mTALP 미소적에 소적당 5~10개의 수정란을 넣고 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 배양기에서 7~10일 동안 배지 교환없이 배양을 실시하여 배발달을 유도하였다.

## 5. 동결 및 융해용액의 준비

동결액 (conventional slow freezing solution)은 FBS가 50% 첨가된 D-PBS 보존액에 10% glycerol을 첨가하여 제조하였다 (이하 10% glycerol). 융해액은 D-PBS 보존액에 0.3 M sucrose (Sigma, USA)를 첨가한 후 8%, 4%와 0%의 glycerol을 첨가하여 준비하였다.

## 6. 수정란의 동결

완만동결 (conventional slow freezing)은 체외 수정 후 7~10일에 확장배반포 (expanding blastocyst)로 발육된 수정란을 10% glycerol에 10분간 평형시킨 후 0.25 ml 스트로에 수정란을 1~2개씩 주입하여 -5°C로 냉각된 수정란 동결기의 Cryo chamber에 넣었다. 동결은 -5°C에서 시작하여 5분 동안 정지 후 식빙 처리하고 -30°C까지 -0.5°C/min의 속도로 냉각시킨 뒤 액체질소에 침지하여

실시하였다.

## 7. 동결 수정란의 융해 및 배양

완만동결로 동결된 체외수정란은 액체질소통에서 수정란이 들어있는 스트로를 꺼내 공기 중에 5초간 방치한 후 35°C의 온수에서 15~20초간 급속융해하였으며 융해 후 8%, 4%와 0%의 glycerol이 첨가된 배지에서 단계별 5분씩 침지하여 동결보호제를 제거하였으며 동결-융해된 체외수정란은 TCM-199 배양액으로 2~3회 세정한 후 난관상피세포로 단층이 형성된 4-well dish에 10% FBS를 첨가된 TCM-199 0.5 ml을 첨가한 후 12~18시간 동안 배양을 실시하여 확장을 재개하거나 확장된 배반포 또는 탈출배반포를 생춘 수정란으로 판정하였다.

## 8. 세포수 산정을 위한 수정란의 고정 및 염색

### 1) Giemsa 염색

체외배양으로 생산된 배반포를 1% (w/v) trisodium citrate (Sigma, USA) 수용액에 옮겨 실온에서 15분간 저장액처리 (hypotonic treatment)를 한 후 1% (w/v) trisodium citrate (Sigma, USA) 수용액 400 µl에 methanol, acetic acid, 증류수를 각각 3:2:1로 혼합한 고정액 20 µl를 혼합한 수용액에 10~20초 동안 침지하여 처리가 완료된 배반포를 slide glass에 옮겨 놓고 고정액 1~2방울을 낙하시키고 불어주어 고정하였다. 고정된 배반포는 20% Giemsa액으로 15~20분간 염색하였으며 여분의 염색액을 증류수로 세정, 건조 후 위상차현미경 하에서 200~400배의 배율로 표본을 관찰하여 염색된 핵의 수를 세어 세포수를 산정하였다.

### 2) 형광염색

형광염색은 5 µg/ml의 Hoechst 33342 (Sigma, USA) 형광염색액에서 5분동안 전배양 후 형광현미경에서 발광하는 세포의 핵 수를 산정하였으며 산정 후 수정란은 TCM-199으로 2~3회 세척하여 배양기에서 1시간 이상 배양 후 동결에 공시하였다.

## 9. 통계처리

본 실험의 결과는  $\chi^2$ -test를 실시하여 각 처리구 간의 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

동결보호제로 10% glycerol을 사용하여 동결하였을 때 공배양 유래 배반포기 수정란의 동결-융해 후 생존율은 7일령의 수정란이 55.0%로 8, 9일령의 44.6%와 43.6%보다 다소 높게 나타났으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 이는 Tagagi 등 (1994)의 결과보다는 낮은 수준이었으나 Voelkel과 Hu (1992) 결과보다는 높았으며 단순배양액인 mTALP 유래 배반포 수정란의 동결-융해 후 생존율은 10일령의 수정란이 46.2%로 8과 9일령의 27.3%와 23.8%에 비하여 높게 나타나 공배양 유래란과 다소 상반된 결과를 나타내었다 (Table 1). 공배양인 경우 7일령 배반포의 동결-융해 후 생존율이 가장 높은 것에 비하여 mTALP에서는 10일령의 수정란에서 가장 높게 나타나 공배양과 mTALP에서의 일령에 따른 동결-융해 후 생존율에서 상이한 결과를 보였다. 생산 일령에 따른 동결성은 Takagi 등 (1994)이 과립막세포와 공배양하여 생산된 수정란의 동결-융해 후 생존율이 7일령과 8일령에 비하여 9일령에서 생존율이 유의적으로 낮았다고 한 보고와 Han 등 (1994)이 SOF에서 생산된 배반포의 동결-융해 후 생존율이 8일령에 비하여 7일령이 더 좋았다는 보고는 본 실험의 공배양군의 일령별 동결-융해 후

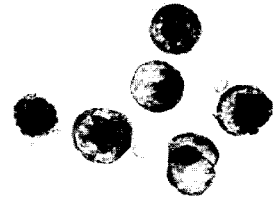


Fig. 1. Frozen-thawed blastocysts after 12 h of culture.

생존율의 결과는 유사하였으나 mTALP의 결과와는 상이하였다. 한편, 일령에 상관없이 공배양으로 배양하여 생산된 수정란이 mTALP로 생산된 수정란보다 동결-융해 후 생존율이 유의적으로 높게 나타나 (Table 1, <0.05) Rorie 등 (1990)이 난관상피세포와 자궁상피세포를 이용하여 공배양하거나 체내배양 후 회수한 수정란의 동결-융해 후 생존성에 대한 결과와 유사하여 배양조건이 동결-융해 후 생존에 중요한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

배양배지와 생산일령에 따른 동결성과 세포수와의 상관관계를 조사한 결과 공배양 7일령의 배반포가 119 (119.0±29.67)개로 8, 9일령의 92.8(92.8±

Table 1. Survival rates of frozen-thawed blastocysts using 10% glycerol as cryoprotectant

Group*	Day of IVC**	No. of blastocysts	
		Frozenthawed	Re-expanded(%)
Coculture	7	20	11 (55.0) <sup>a</sup>
	8	56	25 (44.6) <sup>ab</sup>
	9	39	17 (43.6) <sup>ab</sup>
	Total	115	53 (46.1) <sup>A</sup>
mTALP	8	44	12 (27.3) <sup>b</sup>
	9	42	10 (23.8) <sup>b</sup>
	10	39	18 (46.2) <sup>ab</sup>
	Total	125	40 (32.0) <sup>B</sup>

\* mTALP: modified Tyrode's with albumin, lactate, pyruvate; Co-culture: culture with bovine oviduct epithelial cell.

\*\* *In vitro* culture (*in vitro* fertilization = Day 0)

<sup>AB</sup> Different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

<sup>abd</sup> Different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.06$ .

Table 2. Cell number (Mean  $\pm$  SD) of *in vitro* produced bovine blastocysts cultured in two different culture systems

Group*	Day of IVC**	No. of	
		Blastocysts examined	Nuclei per blastocysts Mean ( $\pm$ SD)
Co-culture	7	10	119.0 ( $\pm$ 29.7) <sup>a</sup>
	8	10	92.8 ( $\pm$ 23.1) <sup>bc</sup>
	9	10	76.4 ( $\pm$ 15.7) <sup>c</sup>
	Total	30	96.1 ( $\pm$ 28.9)
mTALP	8	10	85.2 ( $\pm$ 16.1) <sup>bc</sup>
	9	10	82.5 ( $\pm$ 17.9) <sup>bc</sup>
	10	10	101.9 ( $\pm$ 20.6) <sup>ab</sup>
	Total	30	89.9 ( $\pm$ 19.7)

\* mTALP: modified Tyrode's with albumin, lactate, pyruvate; Co-culture: culture with bovine oviductepithelial cell.

\*\* *In vitro* culture (*in vitro* fertilization = Day 0)

<sup>a-c</sup> Different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.01$ .

23.05)과 83.8 (76.4 $\pm$ 15.73)개 보다 유의적으로 높았으며 mTALP 배지에서는 10일령의 배반포가 102.9 (101.9 $\pm$ 20.57)개로 8, 9일령의 85.2 (85.2 $\pm$ 16.08)와 82 (82.5 $\pm$ 17.87)개 보다 유의적으로 높게 나타났다 (Table 2,  $p < 0.01$ ). 이러한 결과를 토대로 배반포의 세포수가 동결-융해 후 생존율에 미치는 영향을 규명하기 위해 체외생산된 배반포 수정란을 형광염색하여 형광현미경하에서 관찰하여 세포수를 산정한 후 세포수가 90개 이상, 90~70개와 70개 이하로 나누어 동결-융해 후 생존율에 미치는 영향을 살펴본 결과 세포수가 90개 이상인 군에서의 동결-융해 후 생존율이 41.6%로 90개 이하 군의 0%보다 유의적으로 높게 나타났다 (Table 3,  $p < 0.05$ ).

체세포와 공배양하지 않은 수정란은 품질이 불량하다고 Xu 등 (1992)과 Eyestone과 First (1989)은 보고하였으며 Iwasaki와 Nagahara (1990)는 체외 수정란과 체내수정란의 세포수를 비교한 실험에서 체내수정란이 체외수정란에 비해 2배 정도 높은 세포수를 나타내었다고 보고하였다. 또한 Stojkovic 등 (1998)은 Menezos's B2와 TCM-199에 난구세포와 공배양하여 생산된 배반포의 세포수가 TCM-199보다 Menezos's B2에서 유의적으로 높았다고 보고하였다. 본 실험의 경우 배양액 간의 세포수의 차이보다는 배양기간에 따른 세포수의 차이가 나타났

Table 3. Survival rates of frozen-thawed blastocysts with different cell number

	No. of blastocysts	
	Frozen-thawed	Re-expanded (%)
90cell <	12	5 (41.6) <sup>a</sup>
70~90 cell	7	0 <sup>b</sup>
70 cell >	8	0 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

다. 공배양의 경우 배양 7일에 생산된 이후의 배반포는 품질이 급격히 저하되는 양상을 나타내었으나 단순배양의 경우 공배양에 비해 상대적으로 배양기간이 길어질수록 세포수가 증가하는 것으로 나타났다. 특히 단순배양의 경우 배반포 생산 자체가 지연되는 결과를 나타내어 mTALP로 단순배양을 실시할 경우 공배양에 비하여 배양기간을 연장하는 것이 수태 가능한 우량수정란을 획득하는 방법일 것으로 판단된다. 동결융해 후의 생존성은 배양조건에 관계없이 세포수에 비례하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 배반포의 세포수가 동결-융해 후 수정란의 생존에 영향을 주는 것으로 판단되며 동결에 이용하기 가장 적합한 배반포는 공배양시스템하에서 7일째 생성된 배반포인 것으로 사료된다.

## 적 요

1. 체외에서 생산된 배반포의 동결-융해 후 생존율은 7일령의 공배양 유래 배반포가 8 및 9일령 배반포보다 높게 나타났으나, mTALP 유래 수정란에서는 8일과 9일에 비하여 10일령에서 높게 나타나 두 배양체계간에 상반된 결과를 보였다. 공배양으로 배양하여 생산된 수정란은 일령에 관계없이 mTALP 배양액에서 생산된 수정란보다 동결성이 유의적으로 높게 나타났다 ( $p < 0.05$ ).
2. 공배양으로 생산된 배반포의 세포수는 배양 7일째 생산된 군에서 높게 나타났으나 mTALP에서는 배양 10일째 생산된 군에서 가장 높게 나타났으며 배반포의 형성시기가 공배양에 비하여 지연되는 양상을 나타내었다. 배반포 수정란을 형광염색하여 세포수가 동결성에 미치는 영향을 살펴본 결과 세포수가 90개 이상인 처리군의 동결-융해 후 생존성이 90개 이하보다 유의적으로 높았다.

## 참고문헌

- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
- 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.
- Iwasaki S and Nakahara T. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. *Theriogenology*, 33:669-675.
- Leibo SP and Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:81-94.
- Liu Y, Wang S, Holyoak GR and Bunch TD. 1996. Survival rates of *in vitro* produced bovine embryos cryopreserved by controlled slow-freezing, fast-freezing and vitrification. *Theriogenology*, 45:177.
- Mahmoudzadeh AR, Soom A, Ysebaert MT and Kruif A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 42:1389-1397.
- Massip A, Mermillod P, Wils C and Dessy F. 1993. Effect of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 97:65-69.
- Pollard JW and Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41:101-106.
- Rorie RW, Xu KP and Betteridge KJ. 1990. Effects of culture on the post-thawed viability of cryopreserved, *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 33:311.
- Stojkovic M, Buttner M, Zakhartchenko V, Brem G and Wolf E. 1998. A reliable procedure for differential staining of *in vitro* produced bovine blastocysts: comparison of tissue culture medium 199 and Menezo's B2 medium. *Animal Reprod. Sci.*, 50:1-9.
- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H and Ooe 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.
- 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. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, 37:23-37.

Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ 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.

---

(접수일 : 1999. 12. 1 / 채택일자 : 1999. 12. 20)