

## 한우에 있어서 초음파기기를 이용한 생체내 개체별 난자 채취 빈도 및 수정란 생산효율에 관한 연구

박성재<sup>†</sup> · 양보석 · 임기순 · 성환후 · 양병철 · 장원경 · 정일정 · 정기화\* · 심보웅\* · 박충생\*  
축산기술연구소

### Effect of Ovum Pick-up Frequency on *In Vitro* Production of Embryos in Hanwoo Cattle

S. J. Park<sup>†</sup>, B. S. Yang, K. S. Im, H. H. Sung, B. C. Yang, W. K. Chang  
I. C. Cheong, K. H. Chung\* · B. W. Sim\* and C. S. Park\*

National Livestock Research Institute, R.D.A, 441-350, Republic of Korea

#### SUMMARY

The ultrasound-guided oocytes collection (ovum pick-up; OPU) has become a substitution for superovulation in cattle. The objective of this study was to examine the effect of OPU frequency on the *in vitro* production of embryos in Hanwoo cattle. Six cycling Hanwoo cows were distributed into two groups for either once or twice weekly OPU sessions. Oocytes were collected by ultrasound-guided follicle aspiration (SA600) using a 6.5MHz transducer and attached with 18 gauge needle, with vacuum pressure of 40 mmHg. The cumulus-oocyte complexes (COCs) collected from each donor were matured in TCM199 supplemented with 10% fetal bovine serum at 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C for 22 h and *in vitro* matured oocytes were co-incubated with sperm (separated by Percoll gradient) for 6 h. The zygotes were co-cultured on cumulus cell monolayer in 10  $\mu$ l droplets in the same culture medium and conditions used for IVM for 7days. On Day 7 of culture, development to blastocysts was examined.

Although the number of oocytes collected was variable depending on individuals, overall embryo production in the twice per week OPU sessions was better than in the once per week sessions (6~21 vs 2~7 blastocysts produced, respectively). Two cows (E, A) were good oocyte donors and embryo production was superior in cow C; however, cow F was a poor donor as compared to the others.

In conclusion, these results suggest that for embryo production, twice weekly OPU sessions were better than once per week for producing embryos *in vitro* from Hanwoo cattle.

(Key words : OPU frequency, ultrasound-guided follicle aspiration, IVP)

\*경상대학교 축산학과(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

<sup>†</sup> Correspondence

## 서 론

초음파진단기를 이용하여 체내의 난포란을 채취하여 이를 체외에서 수정란을 생산하는 기술은 소의 번식과 수정란의 생산 및 이식에서는 많은 관심거리이다. 초음파기기를 이용하여 수정란을 생산하는 것을 신속하게 상업적으로 이용(Loony 등, 1994; Hasler 등, 1995)한 이후 공란우를 반복적으로 이용하는 보고를 하였고(Pieterse 등, 1988), 고능력의 우수한 수정란을 반복적으로 생산하는 것에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다.

본 연구에서는 한우의 발정주기와 무관하게 한개체로부터 주 2회, 주 1회 연속적으로 난포란을 채란하여 단기간에 얼마나 많은 수정란을 생산할 수 있는가를 연구하였는데, 3~4일의 주기나 7일 주기로 난포란을 채란하였을 때 난포의 발달수나 회수난포의 등급, 난포란의 회수(율)후 체외에서 수정란의 생산능력에 대한 것을 조사하고 반복채란우에 대한 여러 가지 반응을 조사하고 (Brogliatti 등 1997, Riddell 등 1997, Presicce 등 1997, Tanaja 등 1998), 체내난포란을 반복적으로 채란(Gibbons 등 1994, Hanenberg and van Wagten-donk-de Leeuw 등 1997)하여 수정란을 수란우에 이식한 결과를 연구하여 유전적으로 우수한 소를 반복적으로 채란하여 일생에서 많은 수정란의 생산 가능성에 대한 가능성을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

축산기술연구소에서 사육하고 있는 한우로서, 번식기관과 발정주기가 정상인 3세의 미경산우 6두를 선발하여 주 1회 및 2회 채란에 각각 3두를 공시하였으며, 16주간 총 130회의 채란을 실시하였다.

### 2. 초음파 난포란 채취기구

난포란 채취에 이용된 기구는 가축용으로 6.5 MHz(convex type) 탐촉자가 부착된 휴대용 초음파진단기 SA 600(Medison Co., Korea)을 이용하였다.

난포액의 흡입은 음압조절이 가능한 micro-suction pump (WISAP®, Germany)를 이용하였으며, 채취용 바늘은 끝에 초음파 반향부가 있는 55 cm 길이의 18 Gauge로 50 ml 원심분리관과 연결된 Echo-Tip® (Cook Co., Australia)를 사용하였다.

### 3. 초음파 채란방법

공란우를 보정시킨 후 진정을 유도하기 위해 0.3 ml의 xylazine hydrochloride(Rumpun®, Bayer, Korea)을 근육주사하고, 부가적으로 3ml의 lidocaine HCl (광명, 한국)을 이용 경막의 마취를 하고 경부 주변에 2ml를 도포하여 마취효과를 높였다.

마취가 완료된 공란우는 외음부 주위를 깨끗이 세척한 후, 탐촉자의 선단을 Sonogel(삼립의료(주), 한국)로 도포를 한 다음 직장검사용 비닐장갑을 씌운 탐촉자를 질내로 삽입하여 자궁경부의 좌측이나 우측에 위치한 다음 손으로 직장벽을 통해서 난소를 탐촉자의 앞에 위치시켜 난소를 초음파기기의 화면상에 정확히 나타내었다. 난소를 조작하여 난포가 초음파진단기의 바늘유도선에 위치하도록 하여 채취바늘을 자궁경부 옆을 통과하여 화면상의 난포(흑점)로 삽입하였다. 난포내로 주사바늘이 안으로 들어가면 화면에 채취바늘의 선단에 있는 반향부에 의하여 흰점으로 나타나며 이를 기준으로 micro suction-pump를 작동시켜 난포액을 흡입하였다. 난포액이 모두 흡입된 경우는 화면상에 난포의 흑점이 없어지므로 이때를 난포액의 흡입완료시점이라고 정하고 다른 난포를 채란하기 위해 난소를 조작하거나 바늘을 이동하였다. 난자회수시 음압은 40 mmHg를 이용하였다.

난자의 회수는 1%(V/V)의 소 태아 혈청(fetal bovine serum; FBS; Gibco, USA)과 0.2%(V/V) heparin sodium(녹십자, 한국)이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; Gibco, USA)액을 이용하였다.

### 4. 난포란의 체외성숙

흡입한 난포회수액을 즉시 실험실로 옮겨 Emcon Embryo filter (Agtec, USA)를 이용하여 Lacto-Ringers solution(대한약품, 한국)으로 여과하였다. 실험현미경(Olympus, Japan) 하에서 난자를 회수

하고 난구세포의 충실도에 따라 4등급으로 구분하였다.

즉, 1등급의 난자는 난자를 에워싸고 있는 난구세포가 4층 이상으로 충실하게 싸여 있는 것을, 2등급은 난구세포가 1~3층으로 둘러싸여 있는 것을, 3등급은 난구세포가 벗겨져서 나와된 경우, 4등급은 난구세포가 팽창되어 있는 경우로 나누었다.

회수된 1~3등급의 미성숙 난자는 3% FCS가 포함된 D-PBS에서 세척한 다음 10% FCS와 1% antibiotic-antimycotic(Gibco, USA)가 첨가된 Hepes buffered tissue culture medium 199(TCM 199; Earl's salt, Gibco, USA)으로 3회 세척을 실시하고 10  $\mu$ l 소적에 옮겼다. 체외성숙은 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기상태의 38.5°C 배양기(Forma Co. USA)에서 21±1시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

#### 5. 난포란의 체외수정 및 배양

체외성숙이 완료된 난자는 5 mg/ml BSA(fraction V, Sigma, USA), 5 mM caffen-sodium benzoate 그리고 10  $\mu$ g/ml heparin(Sigma, USA)이 첨가된 BO액으로 3회 세척 후 정자가 준비될 때까지 배양기에 보관하였다.

체외수정용 정자의 준비는 15 ml 시험관에 각각 90%와 45% percoll을 층이되게 넣은 다음 용해한 정자를 상부에 넣고 850 g에서 15분간 원심분리를 실시하였고, 다시 상층액을 버린 후 수정용 BO액을 5 ml을 넣고 388 g에서 5분간 원심분리하였다. 난자가 있는 10  $\mu$ l 소적에 회석된 정자를 주입하여 6시간 동안 체외수정을 유도하였다. 이때 정자의 농도는 5~6×10<sup>6</sup>/ml가 되도록 조정하였다.

체외수정후 수정란의 배양은 체외성숙시와 동일한 신선 배양액으로 5회 세척을 실시한 다음 난구세포와 같이 10  $\mu$ l 소적내에서 공배양을 유도하였다. 배양액 교환은 매 2일마다 실시하였으며, 분할율은 수정후 2일째에, 배반포 발달율은 수정후 7~9일에 실시하였다.

#### 6. 체외수정란의 동결

체외배양 후 수정란의 동결은 배양 7일 및 8일째의 내세포괴의 발달이 양호한 배반포란을 20%

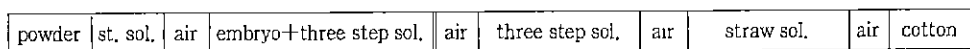
FCS가 첨가된 ET freezing medium(FM, Gibco, USA)으로 2회 세척한 후 준비된 유리화액으로 수정란의 동결을 유도하였다.

동결을 위한 유리화는 3단계(액)로 나누었는데, 1단계는 10% glycerol에 1/8 mole sucrose, 1/8 mole glucose, 20% calf serum을, 2단계 초자화액은 10% glycerol에 10% ethylene glycol, 1/4 mole sucrose, 1/4 mole glucose, 20% calf serum을, 3단계 초자화액은 20% glycerol에 20% ethylene glycol, 3/8 mole sucrose, 3/8 mole glucose, 20% calf serum을 혼합하여 제조하였다. 1단계 초자화를 위한 액은 PBS 8.5 ml에 sugar solution 2.0 ml, glycerol 1.5 ml, calf serum 3.0 ml를 혼합하고, 2단계 액은 PBS 5.0 ml에 sugar solution 4.0 ml, glycerol 1.5 ml, ethylene glycol 1.5 ml, calf serum 3.0 ml를 혼합하고, 3단계 액은 sugar solution 6.0 ml, glycerol 3.0 ml, ethylene glycol 3.0 ml, calf serum 3.0 ml를 혼합하여 0.4  $\mu$ m 필터를 이용하여 제균을 한다음 1개월간 냉장보관하면서 사용하였다.

먼저 수정란의 유리화 동결을 위해서는 동결용 0.25 ml straw를 준비 및 수정란 내역 표기를 하고 Fig. 1과 같이 straw에 동결보호제를 1단계 충전하였고, 1단계 액에서 5분, 2단계 액에서 5분, 3단계 액(유리화 동결액)에서는 1분을 침지하여 수정란의 완전한 유리화가 일어나면 2단계로 straw에 수정란을 주입하고, straw액을 충전하여 준비된 액체질소에 침지를 하였다. 이때 밀봉용 분말이 먼저 액체질소에 들어 가도록 하고 서서히 straw를 액체질소에 담근 다음, 영구보존용 액체질소통에 넣는다. Sugar solution은 Sucrose 16.0453 g에다 Glucose 8.445 g을 PBS 50 ml과 잘 혼합하여 0.4  $\mu$ m filter로 제균을 하고, Straw 액(1/2 M Sucrose sol.)은 Sucrose 3.423 g에 PBS 20 ml과 FCS 2 ml을 섞어서 제균을 하고 냉장보관하면서 1주일간 사용하였다.

#### 7. 동결수정란의 융해, 이식, 임신감정

수란우는 자연발정우와 CIDR® (controlled internal durg release device; InterAg, New Zealand)를 이용하여 인위적으로 동기화된 개체를 이용하였으며 비외과적으로 수정란을 이식하였다.



Second step deposition in LN<sub>2</sub>      † ← First step preparation

Fig. 1. Safe-keeping procedure of vitrified bovine embryos.

유리화 동결수정란은 실온에서 4~5초간을 정지한 다음 동결란 꺼내어 1/4 M sucrose에서 5분, 1/2 M sucrose에서 5분간 침지하고, 1/4 M sucrose액으로 옮긴 후 이식용 straw에 Fig. 1과 유사한 방법으로 수정란을 장착한 다음 수란우에 이식하였다.

수정란이식 후 21과 42일에 축산기술연구소에서 개발한 임신진단 Kit를 이용하여 progesterone 농도를 측정하여 임신진단을 실시하였다.

### 8. 통계학적 분석

모든 자료는  $\chi^2$ -분석법과 student t-test 검정법으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 소적내의 공시란의 수에 따른 배반포 생산율

생체로부터 채취하는 난자를 개체별로 분리하는 경우에는 난포란의 수가 1~10개 정도로 적으므로 개체별 분리배양을 위하여 소적당 배양란 수를 1, 5 및 10개로 구분하였고, 적은 수의 난자 배양을 위하

여 소적의 양도 10  $\mu$ l 정도의 적은 양을 이용하여 난구세포와 공배양하였다. Table 1은 공시란 수가 배반포 발생율에 미치는 영향을 구명코자 도축장 난포란을 이용한 배양시험에서, 공시란 수는 배반포 발달율에 영향을 미치지 않았다는 결과를 나타낸 것이다.

도축난소를 이용하여 생산된 10  $\mu$ l 소적당 배반포의 생산율은 10% 내외로 배양소적내의 배양난수에는 배반포 생산에 차이가 없는 것으로 알 수 있다. 그러나 도축난소로부터 채란하여 난구세포를 공배양 재료로 하고 200  $\mu$ l 소적내에서 다수의 난포란을 이용하였을 경우에는 이와 다소 높거나 낮은 8.3~22.2%(Kurt 등, 1990)성적을 보고하고 있다. Nakao 등(1990)은 난구세포로 공배양하여 10.3%의 배반포 발생을 보고하고 있는 데, 이는 본 결과와 유사하다고 사료된다. 난구세포와 공배양을 할 경우에는 소적의 양은 배반포에 영향을 미치지 않는다는 결과를 얻었다.

### 2. 채란주기에 따른 채란수, 채란율, 채란등급

Table 2의 결과를 보면 한우 생체내로부터 주기

Table 1. *In vitro* embryo development from slaughterhouse-derived oocytes by different number of culture oocytes\*

Oocytes /drop	Replications	No. oocytes(%)			
		Used	Cleaved	Morula	Blastocyst
1	49	49	20(41)	10(20)	5(10)
5	46	230	138(60)	50(21)	24(10)
10	41	410	254(62)	89(21)	38( 9)

\*Cultured in 10  $\mu$ l medium drop.

Table 2. Oocyte recovery rates for Hanwoo cows aspirated once(1x) or twice(2x) weekly

Puncture sessions	No. animals	No. aspiration	No. follicles	No. oocytes recovered	Recovery rates(%)
2x/week	3	85	6.31 $\pm$ 2.25	4.04 $\pm$ 2.47	64
1x/week	3	45	5.17 $\pm$ 2.36	3.51 $\pm$ 2.47	68

적으로 난포란을 채란한 결과 3두로부터 주 2회 85회 채란을 하여 6.31±2.25개의 가시난포로부터 4.04±2.47개를 채란하여 64%의 채란율을 얻었고, 주 1회, 45회 채란한 3두로부터는 5.17±2.36개의 가시난포로부터 3.51±2.47개의 난포란을 채란하여 68%의 채란효율을 얻었는데, 주 2회 채란하는 경우나 주 1회 채란하는 경우에도 가시난포수나 채란수에 있어서도 유의적인 차가 없이 난포가 발생하고, 채란 가능하다는 결과를 얻었고 이로써 연속적이고 반복적으로 고능력우로부터 생체내 난포란의 채란이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과는 채란수에 있어서 Gibbons 등(1994)이 보고한, 주 1회 및 2회 채란 각각 6.8±2.0 및 6.3±1.1개와 유사한 성적이었으며, 채란율에 있어서 Scott 등(1994)이 보고한 7~41% 보다는 높은 성적이었다. 또한 주 2회 채란시 45.2%(7.7±4.5), 주 1회 채란시 44.2%(5.4±3.7)의 채란율(채란수)을 보고한 Garcia 등(1998)의 성적보다는 다소 높은 결과이었다. 본 시험 결과로 보아 주 2회 채란이 주 1회보다 더 많은 난포란을 채취할 수 있는 방법이라 사료된다.

Table 3에서는 채란주기에 따라서 채란된 미성숙 난포란의 채란등급을 나타내는 것으로 I~II등급은 주 1회 및 2회 채란 각각 77%와 83%로 유사한 결과이었으며, 이는 Garcia 등(1998)이 보고한 성적과 유사한 결과이었다.

### 3. 생체내 난포란의 분할율, 배반포 발생율

Table 4에서는 생체로부터 채취한 난포란을 체외 성숙 및 체외수정 후 배반포의 발생율을 나타낸 결과이다. 공시란은 I~III등급을 이용하였는데 이는 채란된 난포란의 92~93%를 차지하였다. 분할율과 배반포까지의 발달율은 각각 55~56% 및 10~13%로 Hancnberg 등(1997)이 보고한 50~57% 분할율과 13~19%의 배발달율 성적과 유사한 결과이었다.

### 4. 개체별 채란성적

공란우 개체별 성적에서 평균 채란수는 개체별로 1.13±1.18개부터 5.48±4.60개로 유의적인 차이가 있었다. 그러나 배반포까지의 발생율은 개체별로 6~25%의 차이를 나타내었으나 유의성은 없었다(Table 5). 이러한 결과는 Bols 등(1995)이 각 개체의 소에서 평균 28% 배반포를 생산하였다는 보고 보다는 약간 낮은 결과이었다.

생체내에서 채취한 난포란과 도축장에서 수거한 난소에서 채취한 난포란을 이용하여 체외수정 후 배발달에 미치는 영향을 조사한 결과, 배반포까지의 발달율은 10% 내외의 동일한 결과를 얻었다(Table 6). 이는 난포란 채취방법은 배발달율에 영향을 미치지 않는다는 결과로서, Gibbon 등(1994)의 보고와 유사한 결과로서 난포란의 유래(채란방법)는 배발달율에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

수란우 30두에 총 42개의 수정란을 이식하여 14두의 임신을 확인하였는데, 투명대를 절개하고 이식할 경우 투명대가 보존된 상태로 이식할 경우보

Table 3. Quality of oocytes recovered from Hanwoo cows aspirated once(1x) or twice(2x) weekly

Puncture sessions	No. oocytes	Oocyte morphological quality			
		Grade I (%)	Grade II (%)	Grade III (%)	Grade IV (%)
2x/week	334	107(32)	149(45)	36(11)	42(13)
1x/week	145	58(40)	62(43)	6(4)	19(13)

Table 4. Development of IVF embryos derived from Hanwoo cows aspirated once(1x) or twice(2x) weekly

Puncture sessions	No. animals	No. oocytes collected	No. oocytes used(%)	No. cleaved(%)	Develop to blastocyst(%)	No. transferable embryos(%)
2x/week	3	334	311(93)	174(56)	41(13)	31(76)
1x/week	3	145	133(92)	73(55)	13(10)	13(100)

Table 5. Individual cow variation in number of oocytes collected and embryo development derived from Hanwoo cows aspirated once(1x) or twice(2x) weekly

Puncture sessions	Individual animal ID	No. total collected	No. oocytes	Mean oocyte collected*	Total blastocyst yield(%)
2x/week	90	32	151	5.48±4.60 <sup>a</sup>	14(11)
	62	32	98	3.21±1.91 <sup>bc</sup>	6( 6)
	1	21	85	4.25±2.25 <sup>ab</sup>	21(25)
1x/week	91	15	88	3.43±3.18 <sup>cd</sup>	7( 8)
	20	15	40	2.66±1.75 <sup>d</sup>	4(10)
	22	15	17	1.13±1.18 <sup>d</sup>	2(12)

\*abcd: Values with a different superscripts within a column are different(P<0.05).

Table 6. *In vitro* development rates of OPU-derived or slaughterhouse- derived oocytes

Oocyte source	No. oocytes used	No. cleaved(%)	No. developed to blastocyst(%)
OPU	479	268(56)	54(11)
Slaughterhouse	689	412(60)	67(10)

Table 7. Pregnancy rates following transfer of embryos treated with dissection of zona pellucida after frozen-thawed OPU embryos

Treatment	No. recipients	No. transferred embryos	Pregnant(%)
Zona dissect	20	28	11(55)
Zona intact	10	14	3(30)

다 임신율에서 다소 높은 결과를 보였다(Table 7).

부화율을 높이기 위하여 투명대를 제거하거나 효소처리로서 투명대를 연화하는 방법들이 이용되고 있으며, 투명대를 절개하는 방법도 부화율에 도움을 준다고 알려져 있다(Odawara 등, 1995). 수정란은 동결-융해 후 투명대가 단단해지므로 이를 절개하여 이식하므로써 부화율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 우수한우의 개체에서 단기간에 반복적이고 연속적으로 생체내 난포란을 채란하여 수정란을 생산할 수 있는 가능성을 연구한 것으로서, 수정란의 안정적인 생산 및 이식으로 우수 한우의 개량 세대간격을 단축하고 우수 유전력을 가진 소를 반복적으로 이용할 수 있으므로 개량에 기여할 기술이라고 사료된다. 축산기술연구소에서 사육 중인

미경산우 6두를 선발하여 초음파 진단기를 이용하여 주 1회 혹은 2회를 연속적으로 채란한 후, 배란달 정도와 산자 생산을 연구하였다.

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 주 2회 및 주 1회 채란시 4.04±2.47개 및 3.51±2.47개의 난포란을 회수하여 매회 동일수의 난포란을 회수할 수 있었으며 채란율은 64~68%이었다.
2. 주 2회 및 주 1회 채란시 채란된 난포란의 등급은 I~II 등급이 각각 77% 및 83%이었다.
3. 15~16주 동안, 주 2회 채란 한우 3두로부터 334개의 난포란을 채취하여 41개(8%)를, 주 1회 채란 한우 3두로부터 145개의 난포란을 채취하여 13개(11%)의 배란포를 생산하였다.
4. 수란우 30두에 총 42개의 수정란을 이식하여 14두의 임신을 확인하였는데, 투명대를 절개하고 이식할 경우 투명대가 보존된 상태로 이식할 경우보다 임신율에서 다소 높은 결과를 보

였다.

## 참고문헌

- Bols PEJ, Vendenheede JMM, Van Soom A and de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick-up(OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Veterinary vision* 3:1-6.
- Brogliatti GM, Salamone DF and Adams GP. 1997. Ovarian follicular wave synchronization and superstimulation in prepubertal calves. *Theriogenology*, 47:1253-1264.
- Garcia A and Salaheddine M. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*, 50:575-585.
- Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE and Gwadauskas FC. 1994. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology Abst.*, 41:206.
- Gibbons JR, Krisher RL, Carlin RE, Pearson RE and Gwadauskas FC. 1995. *In vitro* embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular oocyte aspiration. *Theriogenology*, 43:1129-1139.
- Hanenberg EHAT and van Wagtdank-de Leeuw AM. 1997. Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocyte collection for *in vitro* embryo production results. *Theriogenology Abstr.*, 47:158.
- Hasler JF, Hendderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauly AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-152.
- Kurt AZ and Brackett BG. 1990. Luteinizing Hormone-Enhanced *In Vitro* Maturation of Bovine Oocytes with and without Protein Supplementation. *Biol. Reprod.*, 43:784-787.
- Loony CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
- Nakao and Nakatsuji N. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 33:591-600.
- Odawara Y, Matsumoto K, Shinozuka S, Kusunohara K and Terashima Y. 1995. Zona manipulation in an assisted reproductive technologies(ART) programme. *J. Obstet. Gynaecol.*, 21:83-88.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, Van Beneden ThM, Willemse AH and Taverne MAM. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24.
- Presicce GA, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney CR, Godke RA and Yang X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.*, 56:386-392.
- Riddle MG, Carlson Jr., R, Riddell K, Galik P and Stringfellow D. 1997. Use of exogenous FSH to increase the yield of oocytes collected from aged beef cows; Case reports. *Theriogenology Abstr.*, 47:162.
- Taneja M, Bols PEJ, Ban Develde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp M, Levine H, Riesen J and Yang X. 1998. Pregnancies from *in vitro* produced embryos derived from calf oocytes collected at 10 to 15 weeks of age. *Biol. Reprod. (Suppl.)*, 58:475.

Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Paterson C and Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicu-

lar aspiration in cows. Vet. Rec., 134:440-443.

---

(접수일 : 2000. 2. 8 / 채택일자 : 2000. 4. 24)