

체외에서 성숙된 소 배의 체외발생에 미치는 온도충격의 영향

김지철 · 김재영¹ · 주재홍¹ · 윤산현² · 이상민² · 이상진³ · 김재명⁴ · 송해범 · 박흥대¹

대구대학교 축산학과

Effect of Heat Shock on *In Vitro* Development of IVM-derived Bovine Embryo

Kim, J. C., J. Y. Kim¹, J. H. Joo¹, S. H. Yoon²,

S. M. Lee², S. J. Lee³, J. M. Kim⁴, H. B. Song and H. D. Park¹

Department of Animal Science, Taegu University

ABSTRACT

This study was carried out to compare the temperature and time of heat shock, and the effect of heat shock on development of embryos after *in vitro* maturation and fertilization in bovine oocytes. The results obtained were as follows.

1. The optimum temperature and time of heat shock were 41°C and 30sec on *in vitro* development of embryos from 4~8 cell to blastocyst.
2. The rates of cleavage on zygotes produced on *in vitro* were significantly increased by heat shock after IVM than before IVM(P<0.05).
3. When the oocytes were treated heat shock after IVM and 5 days cultured, developmental rates to blastocyst were increased than other experimental treatments.

(Key words : Heat shock, Embryo, IVM, IVF, Blastocyst)

I. 서 론

소 배반포란의 체외생산기술은 복제동물을 비롯한 형질전환동물생산에 필수적인 기술이라 할 수 있다. 이 기술의 효율성을 극대화시키기 위하여 가장 먼저 해결되어야 하는 것이 안정적으로 수정란을 체외에서 생산할 수 있는 배양체계라 할 수

있다. 여러 종류의 가축에서 체내·외의 배발생에 있어서 온도상승은 많은 영향을 미친다고 보고하고 있다(Alliston 등, 1965; Ealy 등, 1993). 이러한 온도상승에 대하여 배는 세포내에서 여러 가지 생화학적 반응이 유기(Edward 등, 1995)되며, 특히 난자의 세포질에 존재하는 heat shock protein(HSP)과 관계(Riabowol 등, 1988; Hendrey 등, 1991; Nover 등, 1991)가 있다. 이 HSP들은 여러 가지

본 연구는 1998년도 학술진흥재단 연구지원에 의해 수행되었음

¹ 대구대학교 생물공학과(Department of Biotechnology, Taegu University)

² 마리아 산부인과(Maria Obstetrics and Gynecology)

³ 삼육의명대학 동물자원학과(Department of Animal Science, Sahmyook College)

⁴ 포천중문외과대학(Pochon CHA-University)

stress를 받을 때 그것에 대한 방어작용으로서 세포 내에서 빠르게 합성되는 단백질(Miller 등, 1991)로 세포내에서 다양한 기능에 관여하고 있다(Georgopoulos 등, 1993). 체외배발생에서 온도충격을 가하면 HSP68, HSP70, HSP72의 합성이 증가(Giebel 등, 1988; Hunt 등, 1990)되며, 초기배보다 후기배에서 많이 나타나며(Hahnel 등, 1986; Heikkila 등, 1986; Morange 등, 1984; Muller 등, 1985), 온도에 대한 내성이 형성되어 온도충격에 대한 영향을 줄이면서 배발달에 영향을 준다(Ealy and Hansen, 1994). 수정란에 장시간 동안 고온에 노출하였을 때 수정란 세포질의 변화에 의한 난자의 노화가 소(Suzuki 등, 1998), 쥐(Komar, 1973; Balakier 등, 1976)와 토끼(Whitingham, 1980)에서 관찰되었고, 배반포 형성율이 낮고, 노출시기가 빠를수록 그 영향이 크고, 또한 처리시간도 중요한 인자로서 작용하는 것을 많은 연구자들이 보고하였다(Alliston 등, 1965; Ealy 등, 1992; Gwazdauskas 등, 1992; Ealy and Hansen, 1994; Ealy 등, 1995). 그러나 수정란에 이전 보고보다 낮은 온도영역과 단시간 동안 온도충격을 실시했을 때 수정란의 배발달에 미치는 영향에 대해서는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다.

따라서 본 연구는 체외에서 소 난자의 배 발생을 향상시키기 위한 방안의 일환으로 난자의 성숙 전·후 및 체외수정 후 각 발생단계별 배에 대하여 처리하는 온도와 시간을 비교하여 온도상승이 배의 체외발생에 미치는 영향을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 배 지

본 연구에 사용된 기초배지로서는 먼저 난소에서 미성숙 난자의 회수용 배지는 25mM HEPES와 3mg/ml BSA(Sigma, A6003)가 첨가된 TALP(HEPES-TALP) 용액, 미성숙 난자의 체외성숙용 배지는 0.2mg/ml pyruvate(Sigma, P2256), 10% FBS(Gibco, Lot. No. 1013314), 1 μ g/ml FSH (Sigma, 14H0796)를 첨가한 TCM-199(Gibco, 12340-030) 용액, 체외수정용 배지는 6mg/ml BSA와 10 μ g/ml

heparin(Sigma, H3149) 첨가 TALP(Fer-TALP) 용액, 수정된 난자의 체외배양용 배지는 YS(허 등, 1996) 용액을 각각 이용하였다.

2. 난포란의 채취 및 체외성숙

도축된 한우 암소의 생식기로부터 난소를 적출하여 25 μ g/ml gentamycin(Sigma, G3632) 함유 30~33°C의 생리식염수가 들어있는 보온병에 담아, 도축 후 2~4시간 이내 실험실로 운반하였다. 수집한 난소는 생리식염수로 3~4회 세척하여, 18 gauge 주사침이 부착된 1회용 10ml 주사기를 이용하여 직경 2.0~6.0mm의 가시 난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 회수한 난포란은 실험현미경하에서 Wiemer 등(1991)의 기준에 따라 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 것만을 선별하여, 50 μ l의 체외성숙용 배지에 15개씩의 난포란을 옮겨, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 난포란의 체외성숙을 유도하였다.

3. 체외수정

체외수정을 위한 정자는 축협으로부터 구입한 한우 동결정액을 이용하였다. 동결정액 1~2개 straw를 상온에서 5초간 방치 후, 37°C의 항온수조에서 30초간 흔들면서 용해하여 15ml 원심분리관에 담겨져 있는 80% percoll 3ml 용액 위에 조심스럽게 놓는다. 2,000rpm에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하여, 3ml의 신선 Fer-TALP 용액으로 희석 후 1,000rpm, 10분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 Fer-TALP 용액으로 정자농도가 2.5 $\times 10^6$ cells/ml이 되도록 조절하여 체외수정용 정자로서 준비하였다. 한편 난구세포의 확장에 근거하여 체외성숙된 난포란만을 0.03% hyaluronidase 첨가 Fer-TALP 용액으로 난포란 주위의 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난포란을 신선 Fer-TALP 용액으로 2~3회 세척하여 46 μ l의 Fer-TALP 용액에 15개씩의 난포란을 넣고 2 μ l의 heparin과 최종정자 농도가 1 $\times 10^5$ cells/ml가 되도록 미리 준비한 정자 2 μ l를 첨가하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간

배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

4. 체외배양

체외수정을 실시한 후 22~24시간째에 형태적으로 정상이라고 판단한 난포란을 회수하여 YS 용액으로 2~3회 세척하여 체외배양에 공시하였다. 20% human follicle fluid(hFF)가 함유된 YS 용액 50 μ l에 15개씩의 수정란을 넣고, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다(day 1). 그리고 day 3에 4~8세포기배를 10% hFF와 10% FBS 함유 YS 용액으로 교환하여 배지의 교환없이 미소적 배양법으로 배양하는 한편, 각각의 실험에 대응·제공하였다.

5. 온도충격의 방법

온도처리 용액은 각 발생단계의 배에 이용되는 용액이며, 체외성숙 전·후의 경우는 TCM-199 용액을 이용하였다. 처리방법은 1ml 주사기에 연결된 0.25ml 난자동결용 straw(IVM, France)에 난자를 흡입하여 sealing powder로 봉인한 후 실험의 목적온도로 미리 준비된 증류수가 담겨져 있는 보온병에 침적하여 실시하였다.

<첨 부>

처리 후에는 발달시기에 맞는 체외배양방법으로 배양하여, 배반포까지의 배발생을 다음과 같이 관찰하였다.

1) 배의 체외발생에 미치는 처리온도 및 처리시간의 영향

체외에서 생산된 4~8세포기 배의 배반포까지의 배발생에 미치는 처리온도 및 처리시간의 영향을 검토하였다. 온도는 41°C와 43°C, 처리시간은 30, 60, 120초였다.

2) 체외성숙 전·후의 초기배에 있어서 온도충격에 따른 영향

체외성숙 전과 후에 41°C, 30초간 온도충격을 가한 후, 수정율과 배반포까지의 배발생을 관찰하여, 난자의 체외성숙 전과 후에 온도처리가 배반포

까지의 배발생에 미치는 영향을 검토하였다.

3) 체외성숙 후의 난자와 배양 5일째 배의 온도충격의 영향

체외성숙 후의 난자와 배양 5일째 배에 온도처리(41°C, 30초)가 배반포까지의 배발생에 미치는 효과를 검토하였다.

6. 통계처리

실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test를 이용하여 실시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 배의 체외발생에 미치는 처리온도 및 처리시간의 영향

체외에서 생산된 4~8세포기 한우 배의 배반포로의 발달에 미치는 처리온도 및 처리시간을 검토한 결과는 Table 1과 Table 2와 같다.

Table 1은 41°C와 43°C의 온도영역에서 30초 동안 난자를 노출하였을 때 배반포까지의 배 발달을 조사한 도표로서, 41°C에 노출된 난자의 배반포 배의 발달율은 43.8%로 비처리군인 대조군의 40.0%보다 다소 높았지만, 유의차는 없었다. 그러나 43°C처리군에서는 23.3%의 배반포의 낮은 발달율을 나타냈다($p < 0.05$).

Table 2는 41°C의 온도에서 각각 0, 30초, 60초, 120초 동안 난자를 노출 후 배반포까지의 발달율을 조사한 결과, 비처리군에서의 배반포까지의 발달율은 37.8%로서, 30초 처리군과 60초 처리군에서 각각 44.4%와 42.2%로서 대조군보다 약간 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 120초 처리군에서는 31.6%로, 대조군을 비롯한 다른 어떤 군보다도 낮았지만 유의차는 없었다.

본 연구결과에서는 높은 온도영역에서 수정란의 처리(Table 1) 및 처리시간(Table 2)이 길어질수록 배반포로의 발달율이 저하하였는데, 이는 Putney 등(1989)과 Ealy 등(1993)이 소의 초기발생단계의 배에 42°C 이상의 온도충격을 주었을 때 상실배까지의 배발생율이 감소한다고 보고한 결과와 유사

Table 1. Effect of heat shock on development of 4~8 cell stage embryos produced *in vitro*

Temperature(°C)	Exposure time(sec.)	No. of embryos	No. (%) of developed to blastocyst
Control	0	50	20(40.0) ^a
41	30	48	21(43.8) ^a
43	30	90	21(23.3) ^b

^{a,b} Significantly different from control groups, $p < 0.05$.

Table 2. Developmental capacity of 4~8 cell stage embryos produced *in vitro* according to exposure time at 41°C

Exposure time(sec.)	Temperature(°C)	No. of embryos	No. (%) of developed to blastocyst
0(control)	0	90	34(37.8)
30	41	90	40(44.4)
60	41	90	38(42.2)
120	41	57	18(31.6)

한 결과를 얻었다. 그리고 Ealy 등(1995)은 소 배의 체외발생에 있어서 온도상승의 효과에서 처리온도와 처리시간과는 밀접한 상관관계가 있다고 보고하였다. 이와 같은 현상은 본 실험에서 확인되었는데, 이것은 배세포가 온도상승에 대해 저항성을 가지기 위하여 HSP의 분해(Duncan 등, 1989; Nover 등, 1991)와는 관계없이 온도상승이 지속될수록 세포질내의 생물학적 변성이 배발생에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

2. 체외성숙 전·후의 초기배에 있어서 온도충격에 따른 영향

체외성숙 전과 후에 41°C에서 30초간 온도충격을 가한 난포란의 배반포로의 배발달율을 조사한

결과는 Table 3과 같다. 온도충격 후 수정된 난자의 분할율은 대조군, 체외성숙 전과 후 처리군에서 각각 61.8%, 52.2%, 70.5%로서 체외성숙 후의 처리군이 가장 높은 분할율을 나타냈고, 특히 대조군 및 체외성숙 후 처리군에서는 체외성숙 전 처리군보다 유의하게 높은 분할율을 나타냈다($p < 0.05$). 한편 수정난자의 4~8세포기까지의 배발달율에서도 각각 30.0%, 22.2%, 35.0%로서, 체외성숙 후 처리군에서 가장 높은 성적을 나타냈고, 특히 체외성숙 전 처리군보다는 유의하게 높았다($p < 0.05$). 그러나 배반포로의 배발달율에서는 각각 13.2%, 8.7%, 12.3%로서 다소 차이를 나타냈으나, 각 구간의 유의차는 없었다.

Suzuki 등(1998)은 소 난포란을 체외에서 성숙

Table 3. Effect of heat shock on *in vitro* development of follicular oocytes before and after *in vitro* maturation(41°C, 30sec.)

IVM	No. of examined oocytes	No. (%) of cleaved embryos	No. (%) of embryos developed to	
			4~8 cell	blastocyst
Control	220	136(61.8) ^b	66(30.0) ^{ab}	29(13.2)
Before	207	108(52.2) ^a	46(22.2) ^a	18(8.7)
After	220	155(70.5) ^b	77(35.0) ^b	27(12.3)

^{a,b} Significantly different from control groups, $p < 0.05$.

시 온도충격의 영향으로 투명대와 난황표면의 미세구조의 변화에 따른 난자의 노화현상이 관찰되는데, 이는 체외성숙 시간이 길어질수록 온도충격에 대한 영향을 많이 받았기 때문이라고 하였다. 한편 초기 배와 접합자는 온도변화에 민감하게 영향을 받기 때문에, 초기 배의 발달에 온도충격은 중요한 요인으로 사료된다(Dutt, 1963; Tompkins 등, 1967; Putney 등, 1988; Ealy 등, 1993). 본 연구의 결과에서 체외성숙 전의 온도처리된 배의 성숙에 필요한 난자내 생물학적 요인들이 파괴됨으로써 결국 배발달이 억제되었다고 사료되며, 체외성숙 후 온도처리의 효과는 수정후 배양기간이 길어질수록 효과가 저하되는 것을 확인하였다. 따라서 배발달에 있어서 온도충격은 1~2회 정도의 난분할에 효과적으로 작용하며, 이 효과는 아마도 고온에 저항하기 위한 세포내의 여러 가지 생화학적 반응들 중에서도 HSP와 같은 분자들의 작용에 의해 부수적으로 생산된 어떤 물질들이 배발달에 영향을 미쳤을 것이라고 사료된다(Nover 등, 1991).

3. 체외성숙 후의 난자와 배양 5일째 배의 온도충격의 영향

체외성숙 후와 체외배양 day 5에 각각 41°C, 30초간 온도충격을 가한 후 배반포로의 배발생을 검토한 결과는 Table 4와 같다. 온도충격을 가하지 않

Table 4. Effect of heat shock on *in vitro* development of embryos after *in vitro* maturation, and after 5 days *in vitro* culture of fertilized embryos (41 °C, 30sec.)

Group	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to blastocyst
Control	151	14(9.3) ^a
AI ¹⁾	139	32(23.0) ^b
D5 ²⁾	175	22(12.6) ^a
AI and D5	155	40(25.8) ^b

^{a,b} Significantly different from control groups, $p < 0.05$.

¹⁾ AI : heat shock after IVM

²⁾ D5 : heat shock after 5 days *in vitro* culture of fertilized embryos

은 대조군에서의 배반포로의 배발달율은 9.3%였다. 한편 체외성숙 후의 군과 day 5일 처리군에서 각각 23.6%와 12.6%로서, 체외성숙 후 처리군에서 높은 발달율을 나타냈고, 대조군 및 day 5군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 그리고 체외성숙 후 및 day 5 처리군에서는 25.8%의 배반포 형성율을 나타냈는데, 특히 대조군 및 day 5군보다 유의하게 높은 배반포의 발달율을 보였다($p < 0.05$).

Table 3의 결과에서 배발달에 있어서 온도충격 후 배발달의 1~2회 분할에 영향이 있었다는 가능성과 더불어 특정시기에 온도충격은 배발달과 밀접한 관계를 가지고 있을 것이라는 근거에서 본 실험은 상실배 시기에 온도를 처리함으로써 배발달을 상승시킬 것이라고 예상하였으나, 결과는 기대에 부합되지 않았다. 따라서 배반포의 체외생산에 있어서 배의 발생능력은 체외성숙 시에 결정된다는 것을 증명하는 하나의 자료이며, 그리고 배의 체외발생에 있어서 온도충격은 체외성숙 후의 난포란 자체 또는 난구세포의 HSP 효과인지는 확인되지는 않았지만, 체외성숙 후와 배양 5일째에서 난자의 세포내 생화학적 변화가 극심할 것이라고 생각한다. 이상의 결과로부터 특정시기에 한하여 온도상승은 배발달과 밀접한 관계를 가지고 있으며, 이것이 HSP와의 상관관계를 본 연구에서는 확인되지 않았지만, 앞으로의 연구과제라고 사료된다.

IV. 요약

본 연구는 체외에서 한우 난포란의 성숙과 수정 후 배의 체외발생에 있어서 온도충격의 영향이 처리온도 및 처리시간에 미치는 효과를 검토하였다.

1. 체외에서 생산된 4~8 세포기 배의 배반포로의 배발달율에 있어서 온도충격의 적정온도는 41°C, 처리시간은 30초였다.
2. 체외성숙 후의 온도충격이 체외성숙 전의 온도충격보다 수정란의 분할율을 유의하게 상승시켰다($p < 0.05$).
3. 체외성숙 후와 배양 5일째 배에 각각 온도처리를 하였을 경우 비처리군보다 배반포의 배

발달율이 향상되었다.

V. 인용문헌

1. Alliston, C.W., Howarth, B. and Ulberg, L.C. 1965. Embryonic mortality following culture *in vitro* of one- and two-cell rabbit eggs at elevated temperatures. *J. Reprod. Fert.* 9:337.
2. Balakier, H. and Tarkowski, A.K. 1976. Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat-shock and cytochalasin B. *J. Embryol Exp. Morph.* 35:25-39.
3. Duncan, R.F. and Hershey, J.W.B. 1989. Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *J. Cell Biol.* 109:1467-1481.
4. Dutt, R.H. 1963. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. *J. Anim. Sci.* 22:713-719.
5. Ealy, A.D., Drost, M., Barros, C.M. and Hansen, P.J. 1992. Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. *Cell Biol. Int Rep.* 16:125.
6. Ealy, A.D., Drost, M. and Hansen, P.J. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 76:2899-2905.
7. Ealy, A.D. and Hansen, P.J. 1994. Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. *J. Cell Physiol.* 160:463.
8. Ealy, A.D., Howell, J.L., Monterroso, V.H., Aréchiga, C.F. and Hansen, P.J. 1995. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. *J. Anim. Sci.* 73:1401-1407.
9. Edwards, J.L., Ealy, A.D. and Hansen, P.J. 1995. Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology* 44:329-337.
10. Georgopoulos, C. and Welch, W.J. 1993. Role of the major heat shock protein as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:601-634.
11. Giebel, L.B., Dworniczak, B.K. and Bautz, E.K.F. 1988. Developmental regulation of a constitutively expressed mouse mRNA encoding a 72kDa heat shock-like protein. *Dev. Biol.* 125:200-207.
12. Gwazdauskas, F.C., McCaffrey, C., McEvoy, T.G. and Sreenan, J.M. 1992. *in vitro* preimplantation mouse embryo development with incubation temperatures of 37°C and 39°C. *J. Assist. Reprod. Genet.* 9:149.
13. Hahnel, A.C., Gifford, D.J., Heikkila, J.J. and Schultz, G.A. 1986. Expression of the major heat shock protein(hsp70) family during early mouse embryo development. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 6:493-510.
14. Heikkila, J.J., Browder, L.W., Gedamu, L., Nickells, R.W. and Schultz, G.A. 1986. Heat-shock gene expression in animal embryonic systems. *Can. J. Genet. Cytol.* 28:1093-1105.
15. Hendrey, J. and Kola, I. 1991. Thermolability of mouse oocytes is due to the lack of expression and/or inducibility of Hsp70. *Mol. Reprod. Dev.* 28:1-8.
16. Hunt, C. and Calderwood, S. 1990. Characterization and sequence of a mouse hsp70 gene and its expression in mouse cell lines. *Gene* 87:199-204.
17. Komar, A. 1973. Parthenogenetic development of mouse eggs activated by heat shock. *J. Reprod. Fert.* 35:433-443.
18. Miller, E.K., Raese, J.D. and Morrison-Bogorad, M. 1991. Expression of heat shock protein 70 and heat shock cognate 70

- messenger RNAs in rat cortex and cerebellum after heat shock or amphetamine treatment. *J. Neurochem.* 56:2060-2071.
19. Morange, M., Diu, A., Bensaude, O. and Babinet, C. 1984. Altered expression of heat shock proteins in embryonal carcinoma and mouse early embryonic cells. *Mol. Cell Biol.* 4:703-735.
 20. Muller, W.A., Li, G.C. and Goldstein, L.S. 1985. Heat does not induce synthesis of heat shock proteins or thermotolerance in the earliest stage of mouse embryo development. *Int. J. Hyperthermia* 1:97-102.
 21. Nover, L. and Scharf, K.D. 1991. Heat shock proteins In: Nover L(ed), Heat shock Response. Boca Raton Florida:CRC Press, 41-128.
 22. Putney, D.J., Drost, M. and Thatcher, W.W. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30:195-209.
 23. Putney, D.J., Mullins, S., Thatcher, W.W., Drost, M. and Gross, T.S. 1989. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 19:37.
 24. Riabowol, K.T., Mizzen, L.A. and Welch, W.J. 1988. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242:433-436.
 25. Suzuki, H., Ju, J.C., Parks, J.E. and Yang, X. 1998. Surface ultrastructure characteristics of bovine oocytes following heat shock. *J. Reprod. Dev.* 44:345-351.
 26. Tompkins, E.C., Heidenreich, C.J. and Stob, M. 1967. Effects of post-breeding thermal stress on embryonic mortality. *J. Anim. Sci.* 26:377-380.
 27. Whitingham, D.G. 1980. Parthenogenesis in mammals. In: Finn CA (ed.) *Oxford Reviews of Reproductive Biology Vol 2* Oxford: Clarendon Press, 205-231.
 28. Wiemer, K.E., Watson, A.J., Polanski, V., McKenna, A.I., Fick, G.H. and Shultz, G.A. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mo. Reprod. Dev.* 30: 330-338.
 29. 허용수, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 윤혜진, 이석원, 김은영, 박세필, 이성구, 이원돈, 임진호, 1996. IVF-ET Program에서 Blastocyst 수정란의 발생에 관한 연구. I. Glucose와 Phosphate를 함유하지 않은 배양액에서 Blastocyst 수정란의 발생. *대한불임학회지* 23:155-161.
(접수일자: 2000. 8. 31. / 채택일자: 2000. 9. 21.)