

## 체외성숙시간 및 배양방법에 따른 한우 체외수정란의 생산효율

노규진 · 강태영 · 이효종 · 박충생\* · 최상용  
경상대학교 수의과대학 동물의학연구소

### Production Efficiency of *In Vitro* Fertilized Embryos by Different Maturation Periods and Culture Systems in Korean Native Cattle

G. J. Rho, T. Y. Kang, H. J. Lee, C. S. Park\* and S. Y. Choe

*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University*

#### SUMMARY

This study was conducted to improve the production efficiency of *in vitro* produced (IVP) embryos in Korean Native cows. The optimal conditions and procedures for *in vitro* maturation(IVM), *in vitro* fertilization(IVF) and *in vitro* culture(IVC) of bovine follicular oocytes and IVP embryos were evaluated.

Immature follicular oocytes were collected from the follicles of bovine ovaries obtained from abattoirs. The oocytes of Grade I and II for IVM were cocultured with monolayered bovine oviductal epithelial cells(BOEC) or granulosa cells in TCM-199 solution supplemented with follicle stimulating hormone, lutenizing hormone, estradiol-17 $\beta$  and heat-inactivated fetal calf serum at 39 $^{\circ}$ C under 5% CO $_2$  in air for 14 to 24 hours. Most of the oocytes(93%) matured to metaphase II in 24 hours. The cocultured IVM oocytes were fertilized *in vitro* at significantly(P<0.05) higher rate with BOEC(83.8%) and with granulosa cells(84.6%) than the non-cocultured IVM oocytes(73.6%).

The IVM-IVF embryos developed to morula and blastocyst at significantly(P<0.05) higher rate in coculture with BOEC(41.2%) than with granulosa cells(23.1%) or conditioned medium(23.4%).

(Key words; bovine embryos, IVM, IVF, IVC, BOEC, granulosa cell)

#### 서 론

Edwards (1965)가 소에서 미성숙 난포란의 체외 성숙에 관한 연구를 처음으로 보고한 이후, 지난 수십년 동안 난포란을 이용한 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 관한 많은 연구가 진행되어 기술의 축적을 이루어 왔다. 미성숙 난포란을 체외에서 배양하면 자발적인 핵의 성숙은 일어나지만, 세포질의

성숙이 핵의 성숙에 못 미쳐서 분할을, 수정란 발달을 및 산자 생산율에도 낮은 성적을 보이기 때문에 (Moore와 Trounson, 1977), 세포질의 성숙을 위해서 성숙 배양액에 성선자극호르몬(Fukui, 1989; Sirard 등, 1988), 우태아혈청(FCS)(Fukui, 1989; Liebfried-Rutledge 등, 1989), 난구세포(Fukuda 등, 1990; Goto 등, 1988) 등을 첨가하면 미성숙 난포란의 체외성숙과 수정 및 수정란의 발생능을 향상시킬 수 있다는 주장들이 제기되었다. 그러나 난

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

포란의 이용에 있어서 여러 가지 문제점이 대두되고 있으며, 특히 체외배양 난포란은 체내배양란보다 발생능이 저조하기 때문에 이를 향상시키기 위해서 체외성숙 배양액의 조성과 배양방법의 개선 등 배양에 수반되는 연구가 요구되고 있다.

Auerbach와 Brinster(1968)는 대부분의 포유동물의 초기 수정란을 체외배양시킬 경우 특정 세포 발달 단계, 특히 소에서는 8~16-세포기 수정란에서 cell block 현상이 일어난다고 하였으며, 이러한 장애현상을 극복하고 발생능을 향상시키기 위하여 초기 수정란을 난관에 이식하여 배양하는 방법(Leibfried-Rutledge 등, 1987 ; Lu 등, 1987), 여러 종류의 체세포와 공배양(Ellington 등, 1990 ; Gandolfi와 Moor, 1987), 최적의 배양액 조성과 자궁액을 첨가하는 방법(Fischer 등, 1990) 및 난관 상피 세포를 전배양시켜서 일정한 배양 조건을 유지하는 conditioned medium(C.M.)을 이용한 배양법(Eyestone 등, 1991 ; Eyestone과 First, 1989) 등을 이용하여 발생능 향상을 도모하였으나, 난관 상피 세포나 과립막 세포와의 공배양법이 체취와 수정란의 배양이 용이하며 cell block 현상의 극복뿐만 아니라 수정란의 발생능 향상 효과도 양호하여 이용도가 높다고 하였다.(Ellington 등, 1990 ; Eyestone과 First, 1989). 그러나 난관 상피 세포를 장기간 계대 배양함으로써 오염 가능성과 세포의 형태 변형 등 문제점이 제기되어(Xu 등, 1990), 면양의 난관 분비액을 토대로한 semi-chemically cell free medium인 합성난관액(SOF)(Takahashi와 First, 1992)과 defined medium(DM)(Bavister 등, 1992 ; Pinyopummintr와 Bavister, 1991 ; Seidel 등, 1991)을 개발하여 수정란의 발생능을 향상시키고자 노력하였지만 만족할 만한 결과는 볼 수 없었다.

이와 같이 수정란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 많은 연구자의 보고가 있지만 난포란을 핵이식에 이용하기 위해서는 수핵난자의 핵을 제거하기 위한 최적의 체외배양 시간, 공핵할구의 생산을 위한 체외수정 및 체외배양에 대한 종합적인 검토가 요구되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 한우 체외성숙 난포란의 핵이식효율을 개선시키기 위해서 수핵난자가 제 2감수분열 중기에 도달하는 체외배양 시간을 확인하고, 난포

란 및 체외성숙-수정된 수정란의 체외배양 체계를 확립하여 공핵란의 안정적인 공급을 도모하고자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채취

본 실험에 사용된 난소는 한우 암소를 도살 직후 적출하여 항생제가 함유된 생리식염수에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하여 직경이 2~6mm의 난포에서 18 G needle이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 음압으로 미성숙 난포란을 채취하였으며, Wiener 등(1991)의 방법에 준하여 난구세포층과 세포질의 충실도에 따라 Grade I 과 II란을 선별하여 공시하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙 배양액

기본 배양액은 Tissue culture medium-199 (TCM-199, Earle's salt, 25 mM hepes, Sigma Chem. Co., U.S.A.)에 sodium pyruvate(56  $\mu$ g/ml),  $\text{NaHCO}_3$ (2.2 mg/ml), streptomycin(100  $\mu$ g/ml) 및 penicillin G(100 unit/ml)를 첨가하여 사용하였다. 체외 성숙 배양액은 기본 배양액에 LH(10  $\mu$ g/ml), estradiol-17 $\beta$ (1  $\mu$ g/ml), FSH(35  $\mu$ g/ml)와 우태아혈청(FCS, Gibco Chem. Co., U.S.A.)을 10% 수준이 되게 첨가하였다. 이와 같이 준비된 체외성숙 배양액은 5%  $\text{CO}_2$ 가 포함된 98~99% 습도의 39 $^{\circ}\text{C}$ 로 조정된  $\text{CO}_2$  배양기(Forma, U.S.A.)에서 최소한 2시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

### 3. 난포란의 체외성숙 및 제 2감수분열 중기에 도달하는 체외배양 시간 조사

체외 성숙 배양액이 들어 있는 4-well dish에서 각 well 당 10~15개의 미성숙 난포란을 옮겨 넣은 후 14~24시간 체외배양시켜 난구세포의 확장 유무를 관찰하고, 난포란을 300 IU hyaluronidase가 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)에 넣어 3분간 진행시켜 난구세포층을 완전히 제거하여 제 1극체의 방출과, 또한 aceto-orcein 염색으로 배양 시간별 핵의 위치를 관찰하여

제 2감수분열 중기에 도달하는 체외배양 시간을 조사하였다.

#### 4. 난포란의 적정 체외배양 체계 조사

회수한 난포란을 FSH, LH, estradiol-17 $\beta$  및 10% 우태아혈청이 첨가된 TCM-199액을 대조군으로 하고, 공배양 효과를 조사하기 위하여 대조군에 과립막세포 또는 난관 상피 세포를  $1\sim 2\times 10^6$  cells/ml의 농도로 첨가하여 각각의 배양조건에서 24시간씩 체외배양시켜 정소상체 미부에서 분리한 정자와 약 12시간 체외수정을 유도하고 2-세포기 이상으로 분할된 수정란을 수정된 것으로 판단하여 체외배양 체계 간의 분할율을 비교하였다.

#### 5. 체외수정

체외수정을 위한 정자의 준비는 도축장에서 도살 직후 한우의 정소로부터 수집한 정소상체 미부를 채취하여 실험실로 운반하여 정소상체 미부의 표피를 절개한 후 일부분을 절취하여 배양액이 함유된 용기에서 세절하여 농후정자를 채취하였다. 채취한 정자는 10 M caffeine이 첨가된 세정용 배양액에서 60분 동안 swim-up을 유도하고 부유된 활력이 있는 상층의 정자만을 채취해서  $500\times g$ 으로 5분간 원심 분리한 후 순수 정자만을 채취하고, caffeine(5 M), heparin(10  $\mu g$ /ml) 및 BSA(5 mg/ml)가 첨가된 수정용 배양액에서 다시  $500\times g$ 으로 5분간 원심 분리하여 수정능획득을 유도하였다. 수정능을 가진 정자와 24시간 체외배양시켜 난구세포가 확장된 난포란을 수정용 배양액에서  $1\sim 2\times 10^6$  sperms/ml의 정자농도로 12시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정을 유도하였다.

#### 6. 체외성숙·수정된 수정란의 적정 체외배양 체계 조사

체외수정 후 회수된 수정란은 TCM-199 배양액으로 3~4 회 세정하여 난구세포와 정자를 제거하고, 체외배양 조건을 TCM-199액을 대조군으로 하고, 대조군에 단층을 형성하고 있는 난관 상피세포나 과립막세포에서 공배양시키거나, 또는 C.M.에 배양시켜 수정 후 7~9일까지 후기 수정란으로의 발달율을 비교하였다. 각각의 배양액은 48시간 간

격으로 신선 배양액으로 교환하였으며, 5일이 경과한 난관 상피세포나 과립막세포의 단층세포는 신선한 단층세포로 교환하였다.

#### 7. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은  $\chi^2$ -test를 이용하여 유의차를 검정하였다.

## 결 과

#### 1. 체외배양 시간에 따른 난포란의 성숙율과 성숙 도달 시간

수핵난자로 이용될 난포란의 탈핵적이기 또는 난포란의 수정 적기인 제 2감수분열 중기에 도달하는 체외배양 시간을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 체외배양 16시간부터 제 1극체의 방출이 관찰되기 시작하였으며, 체외배양 20시간에 45%, 체외성숙 22시간에 68% 그리고 체외성숙 24시간에 93%의 제 1극체의 방출이 관찰되었다. 이러한 결과로써 대부분의 난포란이 제 2감수분열 중기에 도달하는 체외배양 시간은 24시간 이내임을 알 수 있었다.

Table 1. Effect of time on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes

<i>In vitro</i> culture time (hrs)	No. of oocytes used	No. of oocytes at Metaphase II
14	15	0
16	15	1
18	21	3
20	20	9(45)
22	44	30(68)
24	43	40(93)

Stain for nuclear configuration : Aceto-orcein staining

#### 2. 체외배양 방법에 따른 난포란의 수정율

TCM-199액에 배양한 난포란을 대조군으로 하고, 대조군에 난관 상피세포나 과립막세포와 단층을 형성하고 있는 배양액에서 체외수정을 유도하고 배양액간의 분할율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 난관 상피세포와 공배양군이 83.8%, 과립막세포

Table 2. Effect of culture systems for bovine follicular oocytes on *in vitro* fertilization\*

Culture system**	No. of oocytes used	No. (%) of embryos cleaved
Control	125	92(73.6) <sup>a</sup>
BOEC	210	176(83.8) <sup>b</sup>
Granulosa	221	187(84.6) <sup>b</sup>

\* Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*\* Control : TCM-199+FSH(35 $\mu$ g/ml), LH(10 $\mu$ g/ml), estradiol-17 $\beta$ (1 $\mu$ g/ml), FCS(10%)  
 BOEC : Control + bovine oviductal epithelial cells(1~2 $\times 10^6$  cells/ml)  
 Granulosa : Control + bovine granulosa cells(1~2 $\times 10^6$  cells/ml)

포와 공배양한 군이 84.6%의 분할율을 나타내었다. 이는 공배양하지 않은 대조군의 73.6%보다 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높은 분할율을 보였다. 이와 같은 결과로써 난포란의 체외배양에 따른 수정 후 분할율은 난관 상피세포 또는 과립막세포와 공배양하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

### 3. 체외배양 방법에 따른 체외성숙-수정된 수정란의 발달율

핵이식시 공핵란으로 이용될 체외성숙-수정된 수정란의 발달에 대한 최적의 배양 조건을 확립하기 위하여 체외성숙-수정된 수정란을 TCM-199액, 난관 상피세포나 과립막세포와 공배양 그리고 난관 상피세포가 전 배양된 TCM-199액의 상층액을 분리

하여 이용한 C.M.에서 각각의 발달율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 상실배기와 배반포기 수정란까지 발달율은 대조군에서는 7.3%로 낮았고, 과립막세포와 C.M.에서는 23.1과 23.4%로 비슷했으며, 난관 상피세포와의 공배양군에서는 41.2%로 다른 군에 비해 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 발달율을 보였다. 따라서 체외성숙-수정된 소 수정란의 체외배양은 난관 상피세포와 공배양하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

## 고 찰

난포란을 핵이식시 수핵란으로 이용하거나, 체외성숙-수정된 수정란을 공핵란으로 이용하기 위해서 체외배양 시간에 따른 난포란의 성숙율과 성숙 도달 시간, 체외배양 방법에 따른 난포란의 수정율 및 체외배양 방법에 따른 체외성숙-수정된 수정란의 발달율을 조사하여 최적의 조건을 확립하고자 하였다.

난포란을 회수하여 체외수정 적기와 핵이식시 수핵란으로 사용했을 때 탈핵적기인 제 2감수분열 중기에 도달하는 성적은 체외배양 18시간에 14%로 나타났고, 20시간에는 45%, 22시간에는 68% 그리고 24시간에는 93%로 시간이 경과할수록 높게 나타났다. Sirard 등(1989)이 난포란을 체외배양 시간에 따라 핵의 성숙도를 조사한 보고에서 난핵포상태는 0~6.6시간, 난핵포의 붕괴는 6.6~8.0시간, 염색체 농축은 8.0~10.3시간에 일어나며, 제 1감수분열 중기는 10.3~15.4시간, 제 1감수분열 후기는 15.

Table 3. Effect of different culture systems on *in vitro* development of IVM-IVF bovine embryos\*

Culture system**	No. of oocytes inseminated	No. (%) of embryos developed to		
		Morula	Blastocyst	Mor. & blast.
Control	82	4	2	6( 7.3) <sup>a</sup>
BOEC	250	61	42	103(41.2) <sup>c</sup>
Granulosa	195	33	15	45(23.1) <sup>b</sup>
C.M.	145	23	11	34(23.4) <sup>b</sup>

\* Values with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*\* Control : TCM-199 + FCS(10%)  
 BOEC : Control + bovine oviductal epithelial cells(1~2 $\times 10^6$  cells/ml)  
 Granulosa : Control + bovine granulosa cells(1~2 $\times 10^6$  cells/ml)  
 C.M. : conditioned medium

4~16.6시간, 제 1감수분열 중기는 16.6~18.0시간, 그리고 18시간에 49%가 제 2감수분열 중기에 도달하기 시작해서 24시간에는 94%가 제 2감수분열 중기에 도달하므로 배양 시간이 경과함에 따라 제 2감수분열 중기에 도달하는 성적이 높다고 하였다. 이는 본 실험의 결과와 일치하는 경향을 나타내었다. 그러므로 체외수정율을 향상시키기 위해서 난포란을 24시간 체외배양시키는 것이 효율적임을 알 수 있다. 체내성숙난자와 체외성숙난자의 핵발달에 요하는 시간을 비교한 보고에 의하면 체내에서 성숙된 난자의 핵포분괴는 LH 급증기 후 4시간부터 시작되어 8시간에(Kruip 등, 1983) 과배란된 소에서는 6~9시간에 일어나며, 제 1극체의 출현은 체내성숙 난자에서는 19시간부터, 체외성숙 난자에서는 18시간부터 일어난다고 하였으며(Hyttel 등, 1989) 이러한 결과로서 핵발달에 요하는 시간은 체외성숙 난자와 체내성숙난자에서 유사함을 알 수 있다.

미성숙 난포란을 체외에서 배양하면 자발적인 핵의 성숙은 일어나지만, 세포질 성숙이 핵성숙에 못 미쳐서 분할율과 수정란 발달을 뿐만 아니라 산자 생산율에 있어서도 낮은 성적을 보인다(Sirard 등, 1988 ; Critser 등, 1986). 세포질의 성숙을 위해서 성숙 배양액에 성선자극호르몬(Utsumi 등, 1988 ; Fukui 등, 1982), 우태아혈청(Fukui & Ono, 1989 ; Leibfried-Rutledge 등, 1989), 난구세포(Fukuda 등, 1990 ; Goto 등, 1988) 등을 첨가함으로써 미성숙 난포란의 체외성숙과 수정 및 체외성숙-수정된 수정란의 발생능이 향상된다고 하였다. 체외성숙 배양액에 FSH, LH 그리고 estradiol-17 $\beta$ 의 첨가는 수정율을 증가시키며(Fukui 등, 1982), Younis 등(1989)은 난포란을 체외배양시 난구세포에 의해서 작용이 중재되는 LH(100 $\mu$ g/ml)를 첨가함으로써 체외수정율이 향상된다고 하였다. 또한 과립막세포나 난구세포를 첨가(Fukui & Ono, 1989 ; Leibfried-Rutledge 등, 1989)하면 수정율과 수정란 발달율이 상승된다고 하였다. 난포란을 체외배양할 경우 난구세포는 난자 성숙을 촉진하는 작용을 하며, 난구세포의 역할은 energy substrate를 pyruvate로 변환시키는 능력을 가지는 것으로 추정된다(Sirard & Bilodeau, 1990).

본 연구에서는 체외수정율의 향상을 위해서 회수

한 난포란을 FSH, LH, estradiol-17 $\beta$  및 FCS (10%)가 첨가된 TCM-199액을 대조군으로 하고, 대조군에 난관 상피세포나 과립막세포가 단층을 형성하고 있는 배양액에서 각각 24시간씩 체외배양시켜 정소상체 미부에서 분리한 정자와 약 12시간 체외수정을 유도하여 분할율을 조사한 바, 난관 상피세포나 과립막세포와 공배양한 군이 공배양하지 않은 군보다 높은 분할율을 보였다. 이는 Leibfried-Rutledge 등(1989)의 보고나 Fukui와 Ono(1989)의 보고와 일치되는 결과로써 난포란의 체외배양에 따른 수정 후 분할율의 상승을 위해서 난관 상피세포나 과립막세포와 공배양하는 것이 효과적일 것으로 판단된다.

체외성숙-수정된 수정란의 발달을 위한 최적의 배양조건을 확립하기 위하여 10% 우태아혈청이 첨가된 TCM-199 액을 대조군으로 하고, 대조군에 난관 상피세포나 과립막세포와 공배양을 실시하거나, 난관 상피세포와 공배양된 TCM-199액의 상층액을 분리한 C.M.에서 각각의 체외성숙-수정된 수정란의 발달율은 대조군에서는 7.3%로 아주 낮았고, 과립막세포와 C.M.에서는 23.1와 23.4%로 비슷했으며, 난관 상피세포와의 공배양군에서는 41.2%로 다른 군에 비해 유의적(P<0.05)으로 높은 수정란 발달율을 보였다. 이러한 결과는 Jiang 등(1991)은 체외성숙-수정된 수정란의 배반포기 수정란까지 발달율에 있어서 난관 상피세포와 공배양시 31.7%, 과립막세포와 공배양시 37.2%의 성적을 보여 체외배양시 공배양의 효과는 세포의 종류와 관계가 없다고 한 결과와는 상이했으나, 난포란의 체외배양이나 체외수정시 과립막세포와 공배양이 효과적이며(Xu 등, 1990 ; Critser 등, 1986), 상실배기나 배반포기 수정란으로 발달율은 난관 상피 세포와 공배양이 효과적이라고 보고한 결과(Xu 등, 1990)와는 일치하였다. 이상의 결과로 미루어 체외성숙-수정된 소 수정란의 체외배양은 난관 상피세포와 공배양하는 것이 효과적이라고 사료된다.

## 적 요

난포란의 제 2감수분열 중기에 도달하는 체외배양 시간을 조사하여 핵이식시 수핵난자로 이용될

난포란의 탈핵적기와 체외수정 적기의 결정과, 수정을 향상을 위한 최적의 체외배양 조건 및 체외성숙-수정된 수정란의 체외배양 체계를 확립하기 위해서 본 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 회수된 난포란을 FSH, LH, estradiol 17- $\beta$ , 우태아혈청(10%)이 첨가된 TCM-199액에서 체외배양시켰던 바, 16시간부터 성숙이 일어나기 시작하여, 20시간에는 45%, 22시간에는 68% 그리고 24시간에는 93%의 난포란이 제 2감수분열 중기에 도달하였다.
2. 난포란을 정소상체 미부에서 분리한 정자와 약 12시간 체외수정시켜 배양액간의 분할율을 조사한 결과, 난관 상피세포와 공배양군이 83.8%, 과립막세포와 공배양한 군이 84.6%의 분할율을 나타내었으며, 이는 공배양하지 않은 대조군의 73.6% 보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 분할율을 보였다.
3. 체외성숙-수정된 수정란을 체외배양시켜 상실배기와 배반포기 수정란까지 발달을 관찰한 결과, 대조군은 7.3%, 과립막세포와 C.M.은 23.1와 23.4% 그리고 난관 상피세포와의 공배양군에서는 41.2%로 다른 군에 비해 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 발달율을 보였다.

## 참고문헌

- Auerbach S and Brinster RL. 1968. Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos. *Nature*, 217:465-466.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vivo* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture medium. *Theriogenology*, 37:127-146.
- Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL and First FL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 25(1):150(Abstr.).
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
- Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME and Foote RH. 1990. Bovine 1~2 cell embryos development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod.*, 43:97-104.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.*, 85:715-720.
- Eyestone WH, Jones JM and First NL. 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 92:59-64.
- Fischer B, Jung T, Hegele-Hartung C and Beier HM. 1990. Development of preimplantation rabbit embryos in uterine flushing-supplemented culture media. *Mol. Reprod. Develop.*, 27:216-223.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Nato K and Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42:114-119.
- Fukui Y, Fukushima M, Terawaki Y and Ono H. 1982. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 18(2):161-175.
- Fukui Y and Ono H. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Rec.*, 122:282.
- Fukui Y. 1989. Effect of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-culture with bovine oviduct epithelial cells. *J. Anim. Sci.*, 67:1318-1323.
- Gandolfi F and Moor RM. 1987. Stimulation of

- early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cell. *J. Reprod. Fertil.*, 81:23-28.
- Goto K., Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 83:753-758.
- Hyttel P, Greve T and Callesen H. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J. R. Feril. Suppl.*, 38:35-47.
- Jiang HS, Wang WL, Lu KH, Gordon I and Polge I. 1991. Roles of different cell monolayers in the co-culture of IVF bovine embryos. *Theriogenology*, 35(1):216(Abstr.).
- Kruij TAM, Cran DG, vanBeneden TH and Dielman SJ. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Res.*, 8:29-47.
- 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.*, 36:376-388.
- Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Parrish JJ and First NL. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31(1):61-74.
- Lu KH, Boland MP, Crosby TF and Gordon I. 1987. *In vitro* fertilization of cattle oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 27(1):251(Abstr.).
- Moor RM and Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fertil.*, 49:101-109.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1991. Development of bovine embryos derived from *in vitro* matured/fertilized oocytes into morulae/blastocysts in a chemically-defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.
- Seidel Jr G, Galss T and Olson SE. 1991. Culture of one-cell bovine embryos to blastocysts on chemically defined media. *Biol. Reprod. Suppl.*, 1:88(Abstract).
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.*, 39:546-552.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML and First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40:1257-1263.
- Sirard MA and Bilodeau S. 1990. Effects of granulosa co-culture on *in vitro* meiotic resumption of bovine oocyte. *J. Reprod. Fertil.*, 89:459-465.
- Takahashi Y and First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acid and vitamin. *Theriogenology*, 37:963-978.
- Utsumi K, Katoh H and Iritani A. 1988. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 29(1):320(Abstr.).
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, 30:330-338.
- Xu KP, Pollard JW, Rorie RW, Plant L, King WA and Betteridge KJ. 1990. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization

and co-culture. *Theriogenology*, 33:351  
(Abstract).  
Younis AI, Brackett BG and Fayrer-Hosken

RA. 1989. Influence of serum and hormones  
on bovine oocyte maturation and fertiliza-  
tion *in vitro*. *Gamete Res.*, 23:189-201.