

## Buffalo Rat Liver Cell과 Platelet Derived Growth Factor가 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과

양부근 · 정희태 · 김정익  
강원대학교 축산대학

### Effect of Buffalo Rat Liver Cell and Platelet Derived Growth Factor on the Development of *In Vitro* Matured/*In Vitro* Fertilized Bovine Oocytes

B. K. Yang, H. T. Choung and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

#### SUMMARY

The experiments reported here take advantage of the large number of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized (IVM /IVF) bovine oocytes which can be produced, permitting the design of controlled experiments to establish a simple defined medium for the study of early embryo requirements. A total of 1,386 IVM /IVF oocytes were used to compare a simple defined medium (KSOM) with more complex culture conditions used successfully for culture of bovine embryos but do not permit study of specific requirements. All experiments were extensively replicated factorials. In Experiment 1, KSOM was superior to Menezo B<sub>2</sub> medium in producing morulae plus blastocysts from IVM /IVF oocytes (33 vs 20%,  $P < 0.05$ ). The yield of morulae plus blastocysts with KSOM was 22% and with BRLC added was 30%. In Experiment 2, (a 2×2 factorial of KSOM with or without BRLC and 0, 1 ng /ml of platelet derived growth factor, PDGF) more morulae plus blastocysts (40%) were produced in KSOM-BRLC co-culture containing 1 ng /ml PDGF than in the control KSOM (12%). In Experiment 3, there was no dose response when 0, 1 and 5 ng /ml of PDGF were added. The results with simple defined KSOM medium are sufficiently promising to indicate that specific requirements of the embryo may be examined in future studies with KSOM as a base.

#### 서 론

소 수정란을 생산하기 위한 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양 기술의 확립은 수정란이식을 위한 유전적으로 능력이 우수한 저가의 수정란을 제공해 줄 뿐만 아니라 수정란의 초기발육에 관한 연구와 발생공학 연구의 기초 재료인 수정란을 대량 생산할 수 있다.

체외성숙, 체외수정된 수정란은 체내에서 회수된 수정란보다 체외배양 조건이 까다로운 것으로 알려져 있다. 상업적 목적이나 여러가지 실험재료로 이용되는 체외수정란 또는 체내에서 생산된 zygotes 은 여러 형태의 배양조건과 공배양조건(co-culture system)으로 배양되어 이식 가능한 단계의 수정란으로 체외에서 발육시킬 수 있다(Goto 등, 1994; Lim 등, 1994; Trounson 등, 1994; Wright와 Bondioli, 1981; Ellington 등, 1990; Yang 등,

1994). 그러나 이와 같은 배양체계에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 즉 배양액에 첨가되는 첨가불질 또는 공배양에 이용되는 세포에서 생산되는 물질 성분을 정확히 판단할 수 없기 때문에 초기배 발육에 필요한 성분들에 대한 연구가 많이 진행되어야 한다. 여러 연구자들은 체외에서 혈청이나, 단백질원이 첨가되지 않은 배양액 내에서 배반포까지 발육시킬 수 있다고 보고하고 있다. 그러나 이들 배양액 내에는 아미노산과 수정란이 발육을 하는데 필요한 알지 못하는 인자, 수정란의 발육에 아무런 영향을 주지 못하는 인자 및 체외발육을 억제시키는 인자들이 포함되어 있다(Keefer, 1994; Kim 등, 1993; Moore와 Bondiol, 1993; Pinyopummintr와 Bavister, 1991; Rokenkrans와 First, 1994).

체외성숙, 체외수정된 수정란을 단순 배양액 내에서 배반포기까지 발육시키는데 대한 연구는 수정란의 초기 발육에 필요한 성분을 구명할 수 있는 체계적인 연구가 필요하다. 최근 단순 배양액인 KSOM 배양액이 개발되었는데(Erbach 등, 1994; Lawitts와 Bigger, 1993), 혈청이 첨가되지 않은 KSOM 배양액은 생쥐 수정란의 체외배양시 2-cell block을 극복하고 배반포까지 발육시킬 수 있었다. KSOM 배양액은 생쥐 수정란을 체외발육시키는데 CZB 배양액보다 우수한 성적을 얻은 결과도 보고되었다(Erbach 등, 1994).

본 실험은 소 체외성숙, 체외수정된 수정란을 체외발육시키는데 단순배양액(KSOM)과 complex 배양액을 비교 검토하고, 단순배양액내의 BRL 세포의 공배양과 BRL monolayer에 PDGF의 첨가 배양이 소 수정란의 초기발육에 미치는 영향을 검토하고자 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험계획

세 개의 실험은 완전임의배치법에 의하여 수행되었다. 실험 1은 KSOM 배양액과 Menezo B<sub>2</sub> 배양액에 buffalo rat liver cell(BRL)과 공동배양하거나 공동배양하지 않은 구를 2×2 factorial design으로 실시되었다. 실험 2는 KSOM 배양액과 BRL 세포와 공동배양하거나 공동배양하지 않은 처리구에

PDGF(R&D system, U.S.A.)를 0 또는 1 ng/ml 첨가하여 실시하였다. 한편 실험 3은 실험 2와 비슷한 개념으로 실시하였는데 PDGF의 농도를 0, 1 과 5 ng/ml의 수준에서 실험 2의 처리구에 첨가하여 비교 검토하였다. 각 실험은 3~4회 반복으로 실시되었다. 체외수정후 40~44시간에 얻은 2, 8세포기(주로 4세포기) 수정란을 각 실험구에 배치하여 5~6시간 배양하여 체외 발육율을 검토하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙 및 체외수정

난포란의 회수, 체외성숙 및 체외수정방법은 이전에 보고한 Yang 등(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. 간략하게 요약하면 도축장에서 구입한 난소를 2~3시간 이내에 실험실로 옮겨 난구세포가 2~4층으로 균일하게 둘러쌓인 난포란을 회수하여 실험에 공용하였다. 회수한 난자는 100 $\mu$ l의 25mM HEPES가 함유된 TCM 199 배양액(Gibco, NY, U.S.A.)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), 0.5 $\mu$ g/ml FSH, 5 $\mu$ g/ml LH와 1 $\mu$ g/ml estradiol이 함유된 배양액내로 옮겨 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 20~22시간 배양하여 체외성숙을 실시하였다.

체외성숙 배양 후 난구세포가 확장된 난포란을 성숙배양액과 체외수정용 배양액으로 각각 2회 세척한 후 50 $\mu$ l의 체외수정 및 배양액 소적에 각각 10개씩 옮겨넣어 체외수정을 실시하였다. 이때 이용된 체외수정 배양액을 Brackett과 Oliphant 배양액(BO 배양액, 1975)에 20mg/ml BSA(Fatty acid-free, Sigma)와 20 $\mu$ g/ml의 heparin(Sigma)이 첨가된 배양액을 이용하였다.

체외수정에 이용된 동결정액을 37 $^{\circ}$ C의 항온수조에 1분간 침지시켜 융해시킨 후 BO배양액에 10mM caffeine(Sigma)이 함유된 배양액으로 2회(350×g), 10분간 원심분리하여 체외수정용 정액을 준비하였다.

다음 10개의 성숙난자가 들어있는 체외수정용 소적에 2.5×10<sup>6</sup>정자/ml의 정자부유액을 50 $\mu$ l을 첨가함으로써 체외수정을 실시하였다. 이때 수정소적의 최종 농도는 1.25×10<sup>6</sup>/ml 정자와 5mM caffeine, 10 $\mu$ g/ml heparin이었다.

체외수정시킨 후 6~8시간에 난자를 체외수정

배양액과 CR<sub>1aa</sub> 배양액으로 각각 2회 세척시킨 후 신선한 CR<sub>1aa</sub> 배양소체에 옮겨 34~36시간 배양하였다. 체외수정 후 40~44시간 후에 반복 pipetting으로 난구세포를 제거한 후 각각의 실험배양액으로 옮겨 5~6일간 배양(39°C, 5% CO<sub>2</sub> in air)하여 체외발육율을 검사하였다.

### 3. BRL 세포의 준비

냉동보존된 BRLC(America Type Culture Collection, CRL 1442)를 37°C의 항온수조에서 1~2분간 용해하여 15ml의 원심분리관으로 옮긴 후 5ml의 Defined Modified Eagles Media(DMEM-low glucose, Gibco)에 5% FBS가 함유된 배양액과 혼합시킨 후, 원심분리(350×g, 5분)를 2회, 세척시킨 후, 세포부유액을 준비하였다. 체외수정란의 체외배양에 이용하기 2~3일 전에 준비된 세포부유액을 4-well용기(Nunc, Denmark)에 0.5μl씩 분주하여 BRLC monolayer를 형성시킨 후, 체외수정란의 체외배양에 이용하였다. 이때 BRL세포의 세포수는 5×10<sup>4</sup>cell / ml가 되도록 조정하였다.

### 4. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 Turkey's hsd test를 실시하여 통계처리하였다.

## 결 과

### 1. 실험 1. KSOM과 Menezo B<sub>2</sub>배양액과 BRL세포의 공동배양

체외성숙, 체외수정시킨 수정란을 KSOM과 Menezo B<sub>2</sub>배양액에서 배양한 결과와 KSOM과 Menezo B<sub>2</sub>배양액과 BRL세포와 공동배양한 결과를 Table 1에 요약하였다.

BRL세포와 공동배양한 처리구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육이 KSOM과 Menezo B<sub>2</sub>배양액에서 배양한 결과보다 다소 높은 경향을 나타냈으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다(22% 대 30%, P>0.05).

처리구중 단순배양액인 KSOM배양액과 BRL세포와 공동배양한 처리구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육율이 42%로 여타 구보다 유의하게 높은 성적을 나타냈다(P<0.05).

한편 KSOM배양액으로 체외수정란을 배양한 경우 단독배양보다도 BRL세포와의 공동배양이 상실배기 이상 체외발육율을 증가시키는 경향(24% 대 42%)을 보였으나, Menezo B<sub>2</sub>의 경우에는 체외발육율의 차이가 BRL세포의 공동배양의 경우가 Menezo B<sub>2</sub>단독배양구에 비하여 차이가 없었다(21% 대 19%).

### 2. 실험 2. KSOM 배양액과 BRL세포의 공동배양에 PDGF의 첨가효과

실험 1을 기초로하여 KSOM배양액과 BRL세포의 공동배양에 PDGF첨가와 체외수정란의 체외발육율을 조사한 결과를 Table 2에 요약하였다.

Table 1. Development of IVM/ IVF bovine embryo co-cultured with or without BRLC in KSOM vs B<sub>2</sub> media

BRLC	Media	No. of embryos	Embryo development (%) to :			Morulae plus blastocysts
			Premorula	Morulae	Blasto-cyst	
-	B <sub>2</sub>	112	79 <sup>a</sup>	13 <sup>ab</sup>	8 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>
-	KSOM	112	76 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	16 <sup>ab</sup>	24 <sup>a</sup>
Means	no BRLC		78 <sup>A</sup>	10 <sup>A</sup>	12 <sup>A</sup>	22 <sup>A</sup>
+	B <sub>2</sub>	114	81 <sup>a</sup>	11 <sup>ab</sup>	8 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>
+	KSOM	114	58 <sup>b</sup>	17 <sup>a</sup>	25 <sup>b</sup>	42 <sup>b</sup>
Means	for BRLC		70 <sup>A</sup>	14 <sup>A</sup>	16 <sup>A</sup>	30 <sup>A</sup>

<sup>a,b</sup> within columns treatment values differ, P<0.05.

<sup>A,B</sup> Means for main effects differ, P<0.05

Table 2. Effect of PDGF and BRLC co-culture of bovine embryos in KSOM

BRLC	PDGF (ng/ml)	No. of embryos	Embryo development (%) to :			Morulae plus blastocyst
			Premorulae	Morulae	Blasto- cyst	
-	0	96	88 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>
-	1	93	82 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>
Means	no BRLC		85 <sup>A</sup>	14 <sup>A</sup>	1 <sup>A</sup>	15 <sup>A</sup>
+	0	95	77 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	13 <sup>ab</sup>	23 <sup>a</sup>
+	1	97	60 <sup>b</sup>	20 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>
Means	for BRLC		69 <sup>B</sup>	15 <sup>A</sup>	16 <sup>A</sup>	31 <sup>B</sup>

<sup>a,b</sup> within columns values differ,  $P < 0.05$ .

<sup>A,B</sup> Means for main effects differ,  $P < 0.05$

Table 3. Effect of PDGF in KSOM medium with BRLC co-culture

BRLC	PDGF (ng/ml)	No. of IVM/IVF oocytes	Embryo development (%) to :			Morulae plus blastocyst
			Premorulae	Morulae	Blasto- cyst	
-	0	82	89 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
-	1	101	77 <sup>ac</sup>	10 <sup>a</sup>	12 <sup>ab</sup>	23 <sup>ab</sup>
-	5	92	76 <sup>ac</sup>	10 <sup>a</sup>	13 <sup>ab</sup>	24 <sup>ab</sup>
Means	no BRLC		81 <sup>A</sup>	9 <sup>A</sup>	11 <sup>A</sup>	19 <sup>A</sup>
+	0	88	70 <sup>bc</sup>	9 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>
+	1	100	70 <sup>bc</sup>	6 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>
+	5	90	67 <sup>bc</sup>	10 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>
Means	for BRLC		69 <sup>B</sup>	9 <sup>A</sup>	22 <sup>B</sup>	31 <sup>B</sup>

<sup>a,b</sup> within columns values differ,  $P < 0.05$ .

<sup>A,B</sup> Means for main effects differ,  $P < 0.05$

PDGF의 첨가 유무에 관계없이 KSOM배양액 단독 배양보다는 KSOM배양액과 BRL세포의 공동배양이 상실배기이상 발육된 체외발육율이 유의하게 높은 결과를 얻었다(15% 대 31%,  $P < 0.05$ ). 한편 처리구 중에는 KSOM배양액과 BRL세포의 공동배양액에 PDGF 1ng/ml를 첨가한 배양액에서 체외수정란을 배양한 결과 상실배기이상 발육된 체외발육율이 40%로서 여타구보다 유의하게 높은 성적을 얻었다( $P < 0.05$ ).

### 3. 실험 3. KSOM배양액에 PDGF농도의 효과

KSOM배양액에 PDGF농도의 차이가 체외수정란의 체외발육율에 미치는 효과를 검토한 결과를 Table 3에 요약하였다.

실험 1과 2의 결과와 마찬가지로 실험 3에서는

KSOM단독 배양구보다는 KSOM배양액과 BRL세포의 공동배양이 유의하게 높은 성적을 얻었다(19% 대 31%,  $P < 0.05$ ). 그러나 PDGF농도의 차이(0, 1, 5ng/ml)의 효과에 있어서는 상실배기이상 발육된 체외발육율에서는 커다란 차이는 인정되지 않았다.

## 고 찰

본 실험의 중요한 목적은 체외성숙, 체외수정된 수정란이 단지 energy요인으로서 낮은 농도의 우혈청알부민과 glutamine이 첨가된 혈청이 첨가되지 않은 단순배양액내에 배반포수정란으로서 발육될 수 있는가를 조사하기 위함이다. 만약 그렇게 할 수 있다면, 이것은 체외수정란의 체외배양에 대한 적

절한 배양조건과 수정란의 체외발육에 필요한 요구 조건에 대한 기초적 연구를 제공할 수 있다. 실험 1에서 나타난 바와 같이 단순배양액(KSOM)은 BRL과 같은 체세포의 공동배양을 하지 않아도 Menezo B<sub>2</sub>와 같은 복합배양액보다 다소 좋은 결과를 얻었으며, 전체적으로 KSOM을 BRL세포와 공동배양시에도 Menezo B<sub>2</sub>와 유익한 결과를 나타냈다. 상업적인 목적으로 소수정란을 체외배양할 때 많이 이용되는 Menezo B<sub>2</sub>배양액은 단순배양액인 KSOM배양액보다 41종의 amino acid와 growth factors 및 다른 물질들이 함유되어져 있다.

Hawk와 Wall(1994a, b)은 Menezo B<sub>2</sub>배양액에 10% FCS가 함유된 배양액과 BRL세포의 공동배양을 소수정란의 체외배양시 배반포까지 발육시키는데 가장 우수한 배양조건이라고 보고하여 본 실험과는 다소 다른 경향을 보였다. KSOM배양액에 비하여 Menezo B<sub>2</sub>배양액은 특히 고농도의 glycine (6.3mM)을 함유하고 있으며, 항산화제인 taurine과 ascorbic acid를 함유하고 있다. 이들 성분은 수정란의 체외발육율을 증진시키는 것으로 보고되고 있다(Li 등, 1993; Johnson과 Nas-Esfahan, 1994).

Menezo B<sub>2</sub>배양액이 수정란 배양에 적합하지 않다는 이유는 그 배양액내의 다른 성분이 수정란의 발육을 억제시키거나, 바람직한 첨가물이 역효과를 가져온다고 생각한다. 본 실험의 결과로 볼 때 KSOM배양액이 체세포와 공동배양할 때에도 Menezo B<sub>2</sub>배양액의 유용한 대체배양액이 될 수 있다고 생각된다. 장기간 체외배양시 KSOM배양액의 가장 큰 결점 중의 하나는 배반포에 의한 단백질 합성을 위한 전구물질인 amino acid가 함유되어 있지 않다는 결점을 가지고 있다. 이 단계에 있어서 또 다른 결점은 낮은 glucose의 농도이다. Glucose는 배반포 형성시에 특히 중요한 물질이다(Kim 등, 1993; Lim 등, 1993; Kim 등, 1993; Rieger 등, 1991).

그러나 glucose는 KSOM배양액에 있어서 유일한 energy요인이 아니라, KSOM배양액내에는 energy요인으로서 glucose외에 glutamine(1mM)이 함유되어 있고, 이 물질은 소 수정란의 대사작용과 배반포형성에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다(Rieger 등, 1991). 한편 앞으로 KS-

OM배양액내의 amino acid의 첨가배양의 결과는 단순배양액으로 KSOM을 이용할 때 체외발육율을 더욱 증가시킬 수 있다고 생각된다(Moore와 Bondioli, 1993; Pinyopumminty과 Bavister, 1991; Rosenkran과 First, 1994; Flood와 Bunch, 1993; Shanuddin 등, 1994; Takagi 등, 1991).

KSOM배양액과 BRL세포와의 공동배양으로 수정란을 체외에서 배양시킬 때 체외배양 조건을 충족시킬 수 있다고 생각된다. 그러나 체외수정란을 KSOM배양액과 BRL세포와의 공동배양시 세포 monolayer의 노화현상을 최소한으로 줄이기 위해서 2~3일간씩으로 신선한 배양액으로 교체시켜 주는 것이 바람직하다. BRL세포와의 공동배양은 다른 체세포와의 공동배양과 비슷한 체외수정란의 상실배기이상 발육된 체외발육성적을 얻을 수 있다. 한편 소 수정란은 PDGF수용체를 가지고 있으며(Watson 등, 1992), PDGF의 자극에 의해 수정란의 발육이 촉진될 수 있다.

Larson 등(1992)과 Thibodeaux 등(1993)은 Menezo B<sub>2</sub>배양액 또는 modified B<sub>2</sub>배양액에 본 실험에서 공용된 농도의 PDGF가 첨가된 배양액내에서 체외성숙, 체외수정시켜 체외수정란의 체외배양하여 유익한 효과를 나타낸다고 보고하였다. (Larson 등, 1992)

한편 Flood 등(1993)은 단순배양액내에 PDGF의 첨가효과는 없다고 보고하였다. 또한 PDGF는 생쥐수정란의 배양조건을 개선시키지 못하였다고 보고하였다.(Clover 등, 1991)

본 실험의 결과에서는 KSOM배양액과 BRL세포와의 공동배양시 PDGF의 첨가가 체외수정란의 체외발육율을 증가시키는 것으로 나타났다. 그러나 PDGF의 적정 첨가농도를 확립하지 못하였고, 첨가농도에 따른 차이는 인정되지 않았다. 따라서 본 실험의 결과를 볼 때 배양액에 PDGF의 첨가효과는 BRL세포 또는 체세포와 공동배양시 생산되는 또 다른 효과일 것이라고 추측된다. 결론적으로 본 실험은 단순배양액인 KSOM배양액에 체외성숙, 체외수정란을 상실배기이상 배반포기까지 체외발육시킬 수 있는 체외배양 조건을 충족시킬 수 있는 배양이며, KSOM배양액과 체세포의 일종인 BRL세포와의 공동배양은 체외수정란의 체외발육율을

중진시킬 것으로 생각된다. 단순배양액 KSOM 배양액에 여러 가지 amino acid, growth factor 및 기타 수정란의 발육을 촉진시킬 수 있는 물질의 첨가에 의한 수정란의 체외배양체계에 대한 연구는 앞으로 계속 진행되어야 할 과제라고 생각된다.

## 적 요

본 연구는 난포란을 체외성숙, 체외수정시킨 후 체외발육율을 향상시키기 위한 연구의 일환으로써 혈청이 첨가되지 않은 단순배양액과 complex 배양액과의 체외배양조건을 비교 검토하고 단순배양액인 KSOM 배양액과 BRL 세포의 공동배양과 KSOM 배양액과 BRL 세포의 공동배양에 PDGF의 첨가가 체외수정란의 체외 발육율에 미치는 영향에 대하여 조사되었다. 체외성숙, 체외수정된 전체 1,386개의 난포란이 체외발육율 조사에 공용되었으며 이들 난포란 중 체외수정 후 2세포기에서 4세포기의 수정란으로서의 발육율을 74.5%였다.

실험 1에서 KSOM 배양액과 Menezes B<sub>2</sub> 배양액보다 체외수정란을 배양하였을 때 상실배기 이상 발육된 체외발육율이 유의하게 높은 결과를 얻었다 (33% 대 20%,  $P < 0.05$ ). 한편 KSOM 배양액과 BRL 세포의 공동배양의 경우 30%로서 통계적 유의차는 인정되지 않았으나 ( $P > 0.05$ ), BRL 세포 공동배양이 다소 높은 체외발육율을 얻었다.

실험 2의 경우, KSOM 배양액과 BRL 세포의 공동배양구가 KSOM 단독배양구보다 유의하게 높은 체외발육율을 얻었으며 (15% 대 31%,  $P < 0.05$ ), 처리구중에서는 KSOM과 BRL 세포의 공동배양액에 PDGF 1ng/ml 첨가하여 배양한 구의 체외 발육율이 40%로서 여한구보다 유의하게 높은 발육성적을 얻었다 ( $P < 0.05$ ).

실험 3의 경우, PDGF의 농도(0.1, 5ng/ml PDGF)의 차이에 대하여 체외발육율에 미치는 영향을 검토한 결과 커다란 차이는 인정되지 않았다.

이상의 결과는 혈청이 첨가되지 않은 단순배양액(KSOM)이 효과적으로 체외수정란의 체외배양에 이용될 수 있으며, 단순배양액과 체세포 공동배양(BRL 세포)이 체외수정란의 체외발육율을 증가시킬 수 있다고 생각된다.

## 참고문헌

1. Camous S, Heyman Y, Meziou W and Menezes Y, 1984, Cleavage beyond the block stage and survival after of early embryos cultured with trophoblastic vesicles. J. Reprod. Fert., 72:479-485.
2. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis GL and Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 86:679-688.
3. Clover RM, Howe AM, McDonough PG and Boldt J. 1991. Influence of growth factors in defined culture medium on *in vitro* development of mouse embryos. Fertil. Steril., 55:194-199.
4. Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE and McGrath AB. 1990. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert., 89:293-299.
5. Erbach GT, Lawitts JA, Papaioanou VE and Biggers JD. 1994. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. Biol. Reprod., 50:1027-1033.
6. Flood MR, Gage TL and Bunch TD. 1993. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro*. Theriogenology, 39:823-833.
7. Goto K, Iwai N, Ide K, Takuma Y and Nakanishi Y. 1994. Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro*: comparison of cell-free culture with co-culture. J. Reprod. Fert., 100:239-243.
8. Hawk HW and Wall RJ. 1994a. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes

- and zygotes. *Theriogenology*, 41:1571-1583.
9. Hawk HW and Wall RJ. 1994 b. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. II. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41:1571-1583.
  10. Johnson MH and Nasr-Esfahani MH. 1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *BioEssays* 16:31-38.
  11. Keefer CL. 1994. *In vitro* culture of bovine IVM/IVF embryos: Cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology*, 41:1323-1331.
  12. Kim CI, Ellington JE and Foote RH. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, 33:433-440.
  13. Kim JH, Funahashi H, Niwa K and Onuda K. 1993. Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology*, 39:875-886.
  14. Kim JH, Nike K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in-vitro* fertilized bovine oocytes in a chemically defined protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48:1320-1325.
  15. Larson RC, Ignatz GG and Currie WB. 1992. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryo embryos during the fourth cell cycle. *Development*, 115:821-826.
  16. Larson RC, Ignatz GG and Currie WB. 1992. Transforming growth factor B and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:432-435.
  17. Lawitts JA and Biggers JD. 1993. Culture of preimplantation embryos. :Methods in enzymology. In:Wassarman PM, DePamPhilis ML(eds.), Guide to techniques in mouse development. San Diego, Academic Press :153-164.
  18. Li J, Foote RH and Simkin M. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.*, 48: 33-37.
  19. Lim JH, Kim JH, Okuda K and Niwa K. 1993. Effect of the presence of glucose during fertilization and/or culture in a chemically semi-defined medium on the development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Dev.*, 39:237-242.
  20. Lim JH, Okitsu O, Okuda K and Niwa K. 1994. Effect of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1091-1098.
  21. Menezo Y, Testart J and Porrone. 1984. Serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture and transfer. *Fertil. Steril.*, 42:750-755.
  22. Moore K and Bondili KR. 1993. Glycine and alanine Supplementation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryos *Biol. Reprod.*, 48:833-840.
  23. Pinyopummintr T and Bavister BD. 1991. *In vitro* matured *in vitro* fertilized bovine oocytes can develop into morulae /blastocysts in chemically defined protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.
  24. Pursel VG, Wall RJ, Rexroad CE and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos.

- Theriogenology, 24:687-694
25. Ringer D, Loskutoff NM and Betteridge KJ. 1991. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-culture *in vitro*. J. Reprod. Fert., 95:585-595.
  26. Rosenkrans CF Jr and First NL. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cell-free culture system for development of bovine zygotes *in vitro*. J. Anim. Sci., 72:434-437.
  27. Shamsuddin M, Larson B, Gustagsson H and Rodriquez-Martinez H. 1994. A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos to blastocysts stage with improved viability. Theriogenology, 41:1033-1043.
  28. Shidel GE Jr, Glass T and Olson SE. 1991. Culture of 1-cell bovine embryos to blastocysts in chemically defined media. Biol. Reprod., 44(suppl 1):155. Abstr.
  29. Tagagi Y, Mori K, Tomizawa M, Takahashi T, Sugawara S and Masaki J. 1991. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free chemically defined medium. Theriogenology, 35:1197-1207.
  30. Thibodeaux JK, Del vecchio RP and Hansel W. 1993. Role of platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. J. Reprod. Fert., 98:61-66.
  31. Trounson A, Pushett D, Maclellan LJ, Lewis I and Gardner DK. 1994. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. Theriogenology, 41:57-66.
  32. Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE and Schultz GA. 1992. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. Mol. Reprod. Dev., 31:87-95.
  33. Wright RW Jr and Bondioli KR. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animal, 53:702-729.
  34. Yang BK, Yang X and Foote RH. 1993. Effect of growth factor on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. Theriogenology 40:521-530.