

한우 난포란 유래 배반포의 체외생산을 위한 생물학적 요인들의 영향

박홍대[†] · 김재영 · 주재홍 · 공건오¹ · 윤산현² · 공일근³ · 이상민⁴ · 이상진⁵ · 송해범¹
대구대학교 생물공학과

Effects of Biological Factors on *In Vitro* Production of Hanwoo Embryos

H. D. Park[†], J. Y. Kim, J. H. Joo, K. O. Kong¹, S. H. Yoon², I. K. Kong³,
S. M. Lee⁴, S. J. Lee⁵ and H. B. Song¹

Department of Biotechnology, Taegu University, Kyungsan 712-714, Republic of Korea

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of biological factors on the *in vitro* production(IVP) of bovine oocytes for development of simple culture methods and medium. Oocytes from the slaughterhouse ovaries were matured and fertilized using general protocol and this study was examined if there were necessary to co-culture, media change, media type and embryo density. The results were as follows:

1. The development rate according to co-culture with cumulus cells and non co-culture as drop culture was not significantly different in cleavage (68.9 vs 71.7%), 8-cell stage (41.2 vs 44.1%) and blastocyst stage (12.2 vs 13.8%), respectively ($p < 0.05$).
2. The blastocyst development rates in YS and CR1aa were higher than that in TCM199 (12.4, 10.4% vs 3.7%), but the cleavage (69.0, 77.8 and 61.0%) and 8-cell stage (31.7, 37.0 and 35.7%) development according to YS, TCM199 and CR1aa was not significantly different, respectively ($p < 0.05$).
3. There was no significantly different in cleavage (62.6, 59.5 and 61.2%), 8-cell(34.7, 37.9 and 34.0%) and blastocyst (9.5, 11.6 and 12.8%) development among medium change time as control, Group I and Group II, respectively ($p < 0.05$).
4. Blastocyst formation of 8-cell stage according to embryo density was not significantly different in 1, 10 and 25 embryos (27.3, 22.5 and 34.0%), respectively ($p < 0.05$).

These results indicated that a simple culture system could produce bovine IVP embryos as drop culture as non co-culture system, high density embryo (25 embryos/50 μ l drop),

본 연구는 1998년도 학술진흥재단 연구지원에 의하여 수행되었음

¹대구대학교 축산학과(Department of Animal Science, Taegu University)

²마리아 기초의학연구소(Maria Obstetrics and Gynecology)

³순천대학교 동물자원학과(Department of Animal Science, Suncheon National University)

⁴하나병원(Hana Women's Hospital)

⁵삼육대학 동물자원학과(Department of Animal Science, Sahmyook College)

[†]Correspondence

YS defined medium and no medium change for whole culture period, although other biological factors need to examine in order to produce efficient IVP bovine embryos.
(Key words: IVP, biological factors, bovine oocytes, YS solution)

서 론

소 배반포의 체외생산에 있어서 체외수정 및 체외배발생 뿐만 아니라 난포란의 체외성숙 또한 상당히 중요한 요소이다. 이러한 일련의 과정은 모두 배양체계와 밀접한 관계를 가지고 있다. 그리고 소 수정란의 배반포로의 체외발생 과정중 8~16세포기에 발생을 정지하는 현상이 나타난다고 알려져 있다. 이런 현상은 체세포와의 공동배양법으로 극복할 수 있으며, 나아가서 이 방법에 의해 효율적으로 배반포가 생산되고 있다. 현재는 소 배반포의 체외생산효율을 증진시키기 위하여 glucose와 phosphate를 함유하지 않은 조성이 간단한 배지의 개발(CR1aa: Rosenkrans와 First, 1991; CZB: Hernandez-Ledezma 등, 1993; HECM: Goud 등, 1998; KSOM: Liu와 Foote, 1995; SOF: Carolan 등, 1995; YS: 허 등, 1996), 공동배양하는 체세포의 종류(난구세포: Watanabe 등, 1999, 난관상피세포: Rieger 등, 1995, 자궁상피세포: Goto 등, 1992, BRL세포: Rehman 등, 1994, Vero세포: Lacaze 등, 1997), 산소분압(Voelkel과 Ju 등, 1992; 이 등, 1998), 성장촉진인자(Kanc 등, 1992) 등 여러 측면에서 연구되고 있다. 그러나 이와 같은 인자들의 작용기구는 대부분 세포내의 환경변화와 밀접한 관계를 가지고 있기 때문에 결과분석이 어렵고 다양하며, 또한 체외배양법 그 자체가 복잡하기 때문에 연구자들에 따라 결과의 재현성은 상반될 수도 있다.

따라서 본 연구는 현재의 배양법을 보다 간단하면서도 재현성이 높은 배양방법의 개발을 위하여 소 배의 체외생산방법 중에서도 연구자들이 간과할 수 있는 여러 가지 생물학적 요인들이 소 배의 체외발생에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 한우 난소의 준비

난소는 언양과 경산의 도축장에서 도살된 한우로부터 채취하였다. 운반은 도축장에서 난소표면의 지방 등과 같은 이물질을 제거한 후 25 mg/ml gentamycin(Sigma, G3632) 함유 30~33°C의 생리식염수가 들어 있는 보온병에 담아, 도축 후 2~4 시간 이내 실험실로 운반하였다.

2. 배양액

본 연구에 사용된 난포란의 회수용 배양액은 25 mM HEPES와 3 mg/ml BSA (Sigma, A6003)가 첨가된 TALP(HEPES-TALP) 용액, 미성숙 난자의 체외성숙용 배지는 0.22 mg/ml Na-pyruvate(Sigma, P2256), 1 μ g/ml FSH(Sigma, F4520)와 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, 26140-079)을 첨가한 TCM-199(Gibco, 12340-030)용액, 체외수정용 배양액은 10 μ g/ml heparin(Sigma, H3149)과 6 mg/ml BSA(Sigma, A9647)가 첨가된 TALP(Fer-TALP) 용액, 동결정자처리용 배지는 1 mg/ml의 BSA(Sigma, A6003)만 첨가한 TALP용액이다. 한편 체외배양용 기초배양액은 YS(허 등, 1996) 용액을 이용하였으며, 실험의 목적에 따라 배지에 마리아병원으로부터 생산·공급된 10~20%의 human Follicular Fluid(hFF)와 10% FBS를 단독 또는 혼합 첨가하였다 준비된 각 용액들은 0.22 μ m membrane filter로 여과하여 사용하였으며, 사용전에는 반드시 5% CO₂ 배양기에서 10~12시간 동안 평형시켰다.

3. 난포란의 회수 및 체외성숙

운반된 난소를 생리식염수로 2~3회 세척한 후, 18 gaugc 주사침이 부착된 1회용 10 ml 주사기로 가시난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 채취하였다.

회수된 난포란을 HEPES-TALP용액으로 2~3회 세척하여 $\times 80$ 배의 실체현미경하에서 Wiemer 등

(1991)의 분류법에 따라 난구세포의 부착상태가 양호하고 세포질이 균일한 것만을 선별하였다. 선별된 난포란을 35 mm petri dish(Falcon #3001)에 mineral oil(Sigma, M8410)로 피복된 50 μ l의 TCM-199용액에 15~20개의 난자를 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 성숙을 유도하였다.

4. 정자처리와 체외수정

체외수정을 위한 정자는 축협에서 제공하는 한우의 동결정액을 이용하였다. 1~2개의 straw를 실온에서 10초 방치 및 37°C 항온수조에 30초간 침적 후, 15 ml 원심분리관(Falcon, 2097)에 준비된 3 ml의 80% percoll(Sigma P4937)용액 상층에 조심스럽게 놓는다. 250×g, 20분간 원심분리 후 하층부의 정자피를 회수하여, 4 ml Fer-TALP용액으로 회석하고, 재차 50×g, 10분간 원심분리하여 정자를 세척하였다. 그리고 최종 정자농도가 2.5×10⁶ cells/ml이 되도록 Fer-TALP용액으로 조절하였다. 한편 체외성숙된 난포란을 0.03% hyaluronidase(Sigma, H3506) 첨가 Fer-TALP 용액으로 처리하여 난구세포를 제거한 후 수정에 제공하였다.

체외수정은 35 mm petri dish에 mineral oil로 피복된 46 μ l의 Fer-TALP용액에 10~15개씩의 난자를 넣고, 2 μ l의 heparin(10 μ g/ml)과 2 μ l의 최종정자농도로 조정된 용액을 각각 첨가한 후 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

5. 공동배양을 위한 난구세포의 준비

수정란과 공동배양하는 난구세포는 수정시 체외성숙된 난포란으로부터 준비하였다. hyaluronidase처리에 의해 회수한 난구세포를 강력한 pipetting으로써 단일세포로 분리하여 10% FBS 첨가 TCM-199(Gibco, 12340-030)용액으로 최종농도가 5×10⁴ cells/ml이 되도록 4-well dish (Nunc, 176740)에 준비하였다.

6. 체외배양

기본배양법으로는 체외수정 후 24시간째(day 1) 난자를 50 μ l의 배지에 10~15개씩 넣어 배양하

며, day 3과 day 5는 각각의 실험목적에 따라 배지의 교환, 공동배양하였으며, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 day 7, 8, 9까지 배양하면서 배반포로의 배발생율을 관찰하였다.

1) 배양방법

day 3에 4~8세포기 배를 공동 또는 단순배양하였다. 공동배양의 경우는 난구세포를 미리 배양한 4-well dish의 용액을 10% hFF와 10% FBS 함유 500 μ l의 YS 용액으로 완전히 교환하여 배양하고, day 5는 상기의 신선 YS배지로 50%만을 교환하였다. 한편 단순배양의 경우는 50 μ l 상기의 YS 용액에 10~15개씩의 난자를 넣어 배양하는 미소적법으로 배양하고, day 5에 신선 배지로 완전히 교환하였다.

2) 배양액의 종류

단순배양법으로써 배지는 YS 용액, TCM-199 용액 및 CR1a 용액을 이용하였다. day 1에 난자를 20% hFF 첨가 각 배지로 세척·배양하고, day 3과 day 5는 10% hFF와 10% FBS를 첨가한 각각의 신선 배지로 교환하였다.

3) 배양액의 교환시기

단순배양과 YS 용액을 이용하여 배양기간 중 배지교환의 효과를 검토하기 위하여 YS 용액을 day 3 및 day 5에 각각 교환(대조구)하였으며, Group I은 day 3에만 교환하였고, Group II는 day 3에는 YS 용액, day 5에 TCM-199 용액으로 각각 교환하였다.

4) 배양하는 난자수

day 3에 회수된 8세포기 배를 YS 용액 10 μ l당 1, 10 및 25개씩의 난자를 넣어 배지의 교환없이 배양하였다.

7. 통계적 분석

실험결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 Chi-square test로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 배양방법

체외수정란의 배반포로의 배발생에 미치는 난구세포와의 공동배양(Co/c)과 체세포와 공배양을 얇은 단순배양(Drop/c)의 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다.

Co/c와 Drop/c구에 있어서 수정란자의 분할율은 각각 68.9%와 71.7%, 8세포기 배로의 발생율은 각각 29.7%와 31.3%, 배반포배로의 발생율은 각각 12.2%와 13.8%로써 Drop/c구가 약간의 상승효과를 나타내었지만, 유의차는 인정되지 않았다.

일반적으로 배의 체외발생 정지현상 극복의 일환으로 체세포와 공동배양한다. 이것은 체세포의 종류에 따른 차이는 있지만, 체세포로부터 배에 대한 독성물질의 억제 및 성장촉진인자의 방출 등과 같은 효과(Rieger 등, 1995; Watanabe 등, 1999) 때문에 대부분의 연구에서 많은 연구자들이 체세포와의 공동배양을 행하고 있다 그러나 HECM-3 (Goud 등, 1998)에 11종류의 아미노산만을 첨가한 HECM-6용액이 개발된 이후 체세포와의 공동배양

을 하지 않는 단순배양법도 효과적이라고 보고되었고(McKiernan 등, 1995), 공과 이(1999), 박 등(1999)도 본 실험과 같이 단순배양법의 효과를 증명하였다. 따라서 체세포의 분리 및 조작방법이 어렵고, 이로 인한 매지오염의 위험성, 또한 체세포가 배지내의 여러 가지 물질을 이용함으로써 생산되는 노폐물 또는 배지의 pH의 변화 등에 의해 배발생율이 저하될 수 있는 요인을 감안한다면 적당한 배지를 선택한다면 단순배양이 바람직할 것이다.

2. 배지의 종류

한우 배의 효과적인 체외생산을 위하여 체외배양용 배지인 YS 용액, TCM-199 용액 및 CR1aa 용액을 사용하여 수정란자의 배반포로의 발생율을 검토한 결과는 Table 2이다.

YS 용액구, TCM-199 용액구, CR1aa 용액구에서의 수정란자의 분할율은 각각 69.0, 77.8, 61.0%로써 각 구간의 유의차는 인정되지 않았다. 또한 8세포기 배로의 발생율은 31.7~37.0%로써 각 구간에 비슷한 경향이였다 그러나 배반포로의 발생율은 각각 12.4%, 3.7%, 10.4%로써 YS용액구와

Table 1. Effect of culture methods on *in vitro* development of bovine embryos derived from IVMFC

Culture method ¹⁾	No. of oocytes cultured	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of embryos developed to	
			8-cell	Blastocyst
Co/c	286	197(68.9) ^a	118(41.2) ^a	35(12.2) ^a
Drop/c	290	208(71.7) ^a	128(44.1) ^a	40(13.8) ^a

¹⁾ Co/c : with cumulus-cells, Drop/c : without cumulus cells

²⁾ IVMFC . *in vitro* maturation, fertilization and culture.

^a Values with same superscript were not significantly different(p<0.05)

Table 2. Effect of various culture media on *in vitro* development of IVF-derived bovine embryos

Kinds of medium	No. of oocytes cultured	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of embryos developed to	
			8-cell	Blastocyst
YS	145	100(69.0) ^a	46(31.7) ^a	18(12.4) ^a
TCM-199	108	84(77.8) ^a	40(37.0) ^a	4(3.7) ^b
CR1aa	154	94(61.0) ^a	55(35.7) ^a	16(10.4) ^a

^{a,b}. Values with different superscripts in the same column were significantly different(p<0.05)

CR1aa 용액구가 TCM-199용액구보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

소 수정란의 1~2회의 체외분할에는 glucose가 효과적으로 작용(O'Fallon과 Wright, 1986)할지라도 배반포 형성시기를 제외한 각 발생단계별 배에는 그다지 영향을 미치지 않는다는 많은 보고가 있다(Reed 등, 1992; Matsuyama 등, 1993). 그 결과 glucose가 제거된 단순배지가 개발되어졌다. 한편 glucose 함유 배지에서의 phosphate 첨가도 포유동물 수정란의 체외발달에는 비효과적이라고 보고되고 있다(Carrillo 등, 1998). 이것은 세포내의 과도한 해당과정으로 인하여 cytosol 대사와 mitochondria 대사간의 균형을 변화시켜 산화적 인산화 과정을 억제하는 crabtree effect로서 수정란의 발달을 억제하는 것으로 알려져 있다(Seshagiri와 Bavister, 1991). 따라서 본 연구에서 사용된 glucose와 phosphate 첨가 TCM-199 용액보다 이러한 물질이 첨가되어 있지 않은 CR1aa 용액과 YS 용액이 효과적이었고, 그 중에서도 YS용액이 약간 양호하였다. 그리고 박 등(1999)의 보고에서 CR1aa 용액보다 YS 용액에서의 배반포 형성시기가 빨랐다는 보고는 본 연구에서도 확인되었으며, 약 20시간 정도의 차이가 있었다. 이는 배양액내 중금속 이온의 chelator제인 EDTA(Gardner와 Lane, 1997)와 항산화제인 taurine(Maturo와 Kulakowshi, 1988)의 첨가에 의한 효과일 것으로 사료된다.

3. 배양액의 교환시기

한우 배의 체외생산에 있어서 배지의 교환시기가 배발생율에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 3과 같다.

대조구에서 8세포 및 배반포로의 발생율은 각각 34.7% 및 9.5%였으며, Group I구와 Group II구에서의 8세포기 및 배반포기 배로의 발생율은 각각 37.9% 및 11.6%와, 34.0% 및 12.8%로써 각각의 처리구간은 비슷한 경향이었고, 대조구보다는 약간 높았으나, 유의차는 인정되지 않았다.

소 난포란유래 배반포의 체외생산을 위하여 대부분은 체세포와 공동배양하는 것이 보통이다. 이 경우 배지의 교환은 24~48시간마다 50~100%의 비율로 교환한다(Sirard 등, 1995). 그러나 단순배양의 경우 배지를 교환하는 경우도 있지만(조 등, 1996; Lazzari 등, 1999), 그렇지 않은 경우도 있다(이 등, 1998). 그리고 본 실험에서도 배지교환의 필요성이 입증되지 않았다. 체세포와 공동배양인 경우, 체세포의 준비과정 등의 복잡성, 이로 인한 배지오염 및 배지환경의 악조건 때문에 신선 배지로 교환해 줌으로써 발생할 수 있는 배양환경에 대한 충격, 또한 단순배양인 경우에도 신선 배지로 교환하면 배의 발생과정에서 배가 분비하는 물질(아마도 효소와 같은 물질)로부터 생성되는 여러 가지 유익한 물질의 이용효율이 저하되는 단점이 있다. 따라서 가능하면 배지의 교환없이 배양을 행할 수 있는 배양법의 개발이 필요하며, 만약 교환이 필요하다면 5일째에 glucose 함유 용액으로 교환하는 것도 바람직하다고 사료된다.

4. 배양하는 난자수

체외수정유래 8세포기 배를 10 μ l의 YS 용액에 1, 10, 25개씩을 넣어 배지교환없이 배양한 후 배반포로의 배발생율을 검토한 결과는 Table 4와 같다.

Table 3. Effect of medium change time on *in vitro* development of IVF-derived bovine embryos

Time of medium change ¹⁾	No. of oocytes cultured	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of embryos developed to	
			8-cell	Blastocyst
Control	190	119(62.6)	66(34.7) ^a	18(9.5) ^a
Group I	190	113(59.5)	72(37.9) ^a	22(11.6) ^a
Group II	188	115(61.2)	64(34.0) ^a	24(12.8) ^a

¹⁾ See materials and methods

^a . Values with same superscript in the same column were not significantly different($p < 0.05$)

Table 4. Effect of embryo density on *in vitro* development of IVF-derived 8-cell bovine embryos

No. of embryos/10 μ l	No. of embryos examined	No. (%) of blastocysts developed
1	33	9(27.3) ^a
10	80	18(22.5) ^a
25	100	34(34.0) ^a

^a Values with same superscripts in the same column were not significantly different($p < 0.05$)

1개구, 10개구, 25개구에서의 배반포로의 발생율은 각각 27.3%, 22.5%, 34.0%로써 각 구간의 유의차는 없었지만, 25개구에서 가장 높은 발생율을 나타내었다.

많은 포유동물 배의 체외발생에 있어서 배양하는 난자의 수가 영향을 미친다고 하며(Kato 등, 1994), 일정량의 배지에서 배양하는 난자의 숫자가 많으면 많을수록 배반포로의 배발생이 증가한다는 많은 보고가 있다(Ahern과 Gardner, 1998; Palasz와 Thundathil, 1998). 그리고 본 실험결과도 이들의 보고와 비슷한 경향이다. 이것은 배양하는 배지의 양이 적고, 배양하는 난자의 수가 많다면 난자들이 서로 접촉하는 물리적 충격이 체내에서의 환경을 제공하는 현상과 비슷할 것이며, 나아가서 결과 3에서 고찰한 바와 같이 배 재체에서 분비되는 미지의 물질(Paria와 Dey, 1990)이 농축됨으로써 배지내로부터 생성되는 새로운 물질을 배가 효율적으로 이용한 결과일 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 소 배의 체외생산에 있어서 현재의 배양법을 보다 간단하면서도 재현성이 높은 배양방법의 개발을 위하여 여러 가지 생물학적 요인들이 소 난자의 체외생산에 미치는 영향을 검토하였다.

1. 미소적 단순배양과 난구세포와의 공배양간에는 분할율 (68.9 및 71.7%) 및 배반포기 배발달율 (12.2 및 13.8%)에 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$)
2. YS와 CR1aa용액에서 배발달율은 TCM199용액 (12.4, 10.4 및 3.7%)에서 유의적인 차이는 있었지만($p < 0.05$), 분할율 (69.0, 77.8 및 61.0

%)과 8 cell단계에서의 배발달율 (31.7, 37.0 및 35.7%)은 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$).

3. 배양액 교환시기에서 대조구, 처리구 I 와 II의 분할율 (62.6, 59.5 및 61.2%), 8 cell단계에서의 배발달율(34.7, 37.9 및 34.0%)와 배반포 발달율(9.5, 11.6 및 12.8%)에서 각각 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$).

4. 8 cell 단계부터 1, 10 및 25/10 μ l씩의 배 밀도당 배반포 발달율은 (27.3, 22.5 및 34.0%) 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$).

그 결과 체외수정란의 배반포로의 배발생에 있어서 배양방법은 50 μ l, 배지에 체세포와 공동배양을 하지 않는 미소적 단순배양법, 배지는 glucose 무첨가 YS(EDTA, taurine 함유) 용액, 배양도중 배지의 교환은 필요없으며, 가능한 한 배양하는 난자의 수(25개/10 μ l)가 많을수록 효과적이었다. 이러한 생물학적 요인들은 배반포의 체외생산에 많은 영향을 미치기 때문에 배반포의 효율적인 체외생산을 위해서는 본 연구에서 확인된 요인 이외의 것들도 재검토되어야 한다.

참고문헌

- Ahern TJ and Gardner DK. 1988. Culturing bovine embryos in group stimulates blastocyst development and cell allocation the inner cell mass. *Theriogenology* 49:194(Abstract).
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* Matured/*in vitro* Fertilized Bovine Embryos into Moulrae and Blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37:127-146.

- Carolan C, Longergan P, Van Langendonck A and Mermillod D. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 43:1115-1128.
- Carrillo AJ, Lane B, Pridham DD, Risch PP, Pool TB, Silverman IH, and Cook CL. 1998. Improved clinical outcomes for *in vitro* fertilization with delay of embryo transfer from 48 to 72 hours after oocyte retrieval: use of glucose- and phosphatefree media. *Fertil. Steril.*, 69:329-334.
- Gardner DK and Lane M. 1997. Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72h of development from the zygote *Theriogenology* 47:278(Abstract).
- Goud PT, Goud AP, Rybouchkin AV, De Sutter P and Dhont M 1998. Chromatin recondensation pronucleus formation, metaphase entry and chromosome complements of human spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection into hamster oocytes. *Hum. Reprod.*, 13:1136-1345.
- Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JP and Rovert RM. 1993. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of zygotes derived by *in vitro* maturation *in vitro* fertilization procedures. *Theriogenology* 39: 1267-1277.
- Kane MT, Carney EW and Ellington JE. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology* 38: 297-313.
- Kato Y, Ohno H, Fukuyama K and Tsunoda Y. 1994. Effects of the culture density of mouse zygotes on the development *in vitro* and *in vivo*. *J. Mamm. Ova Res.*, 11:98-99.
- Lacaze S, Marquant-Le Guenne B, Dellalleau N, Richet L, Maunas S, Nibart M and Humblot P. 1997. Centralized *in vitro* embryo production after ultrasound guided bovine oocyte collection : effects of parity and superovulation treatment. *Theriogenology* 47:161(Abstract).
- Lazzari G, Crotti G, Duchi R and Galli C. 1999. Heparin effects on blastocyst formation and number of the IVM-IVF bovine embryo. *Theriogenology* 51. 242(Abstract).
- Liu Z and Foote RH. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol. Reprod.*, 53:786-790.
- Matsuyama K, Miyakoshi H and Fukui Y. 1993. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct medium on *in vitro* development of bovine oocyte matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 40:595-605.
- Maturo J and Kulakowski. 1988. Taurine binding to the purified insulin receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 37:3755-3760.
- Mckiernan SH, Clayton MK and Bavister BD. 1995. Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 42:188-199.
- O'Fallon JV and Wright RW. 1986. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 34:58-64.
- Palasz AT and Thundathil J. 1998. The effect of volume of culture medium and embryo density on *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology* 49:212(Abstract).
- Paria BC and Dey SL. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors *Proc Nat. Acad. Sci. USA.*, 87:4756-4760.
- Reed ML, Jin DI and Petters RM. 1992. Glucose and inorganic phosphate inhibits rat 8-cell embryo development *in vitro*. *Theriogenology* 37: 282(Abstract).

- Rehman N, Collins AR, Suh TK and Wright Jr RW. 1994. Development of *in vitro* and fertilized bovine oocytes co-cultured with Buffalo Rat Liver cells. *Theriogenology* 41: 1453-1462.
- Rieger D, Grisart B, Semple E and Van Q. 1995. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J Reprod. Fertil.*, 105:91-98.
- Rosenkrans CF Jr and First NL. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage : effects of amino acid and vitamins. *Theriogenology* 35:266(Abstract).
- Seshagiri PB and Bavister BD. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: Evidence for the 'Crabtree effect'. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:105-111.
- Sirard M-A, Roy F, Patrick B, Mermillod P and Guilbault LA. 1995. Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. *Theriogenology* 44:85-94.
- Voelkel SA and Ju YJ. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 37:1117-1131
- Watanabe YF, Watanabe MR, Vila RA, Galerani MAV and Love RB. 1999. The influence of B2 and a modified CR-2 medium on the *in vitro* production of bovine embryos with cumulus and oviduct co-culture. *Theriogenology* 51:259 (Abstract).
- Wiemer KE, Watson AI, Polanski Q, McKenna AI, Fick CH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- 공일근, 이상인. 1999. 정액종류 및 배양조건에 따른 체외수정란의 생산 및 동결보존의 효율에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 14(1):31-37.
- 박흥대, 김종환, 정덕수, 이동철, 김주환, 윤산현. 1999. 체외에서 양질의 한우 수정란 생산을 위한 배양조건 설정 및 이식. *한국수정란이식학회지*, 14(1):39-46.
- 이재관, 윤준진, 황성수, 윤종택, 김창근, 정영채. 1998. 공배양 및 산소농도가 한우 난포란의 체외발생에 미치는 영향. *한국가축변식학회지*, 22(1):43-50.
- 조성근, 송상현, 정기화, 강대진, 박충생. 1996. 배양체계가 체외성숙 소 난포란의 체외수정 및 배발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 11(1):15-26.
- 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(2):155-161.

(접수일: 2000. 5. 10 / 채택일: 2000. 7. 30)