

체외배양 조건이 소 체외수정란의 생산에 미치는 효과

조성근 · 노규진* · 이정규 · 이효종* · 최상용* · 박충생[†]
경상대학교 축산진흥연구소

Effects of Different Culture Conditions on *In Vitro* Production of Bovine Embryos

S. K. Cho, G. J. Rho*, J. G. Lee, H. J. Lee*, S. Y. Choi* and C. S. Park[†]

Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Republic of Korea

SUMMARY

This study was conducted to establish the optimal culture conditions for *in vitro* production of bovine embryos derived from slaughter house ovaries. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) collected by aspiration from follicles of 2~7 mm in diameter were matured in Ham's F-10 medium supplemented with 0.01 $\mu\text{g/ml}$ epidermal growth factor (EGF) at 39°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After 24 hrs of culture, the oocytes were co-cultured with epididymal sperm selected off by Percoll-density gradient in TALP medium for 24 hrs. The presumptive zygotes were cultured in HECM-6 medium for 3 d post-insemination, and followed by cultured in TCM199 medium until 7 to 10 d post-insemination. The cultures were compared of their cleavage and development into later stage in culture medium by additions of different protein sources (PVA, BSA and BCS) and by different embryo density.

The rates of cleavage and development rates into blastocyst were not significantly ($P < 0.05$) different among the culture media containing with BSA (75.0% and 40.5%), BCS (76.7% and 38.0%) and PVA (72.5% and 42.2%), respectively. Significantly ($P < 0.05$) higher blastocysts rates were obtained in culturing of 30 and 40 embryos in each 50 μl droplets of culture medium than in 5, 10 and 20 embryos.

These results indicate that the optimal density of embryos is 30~40 embryos in a 50 μl droplet of culture medium. Furthermore there is no effect of different protein sources on early embryonic development.

(Key words : protein, embryo density, culture, HECM, bovine)

서 론

도축우의 난소로부터 채란된 미성숙 난포란을 이용한 체외수정란의 생산기술은 어느 정도로 확

립되어져 있으며, 현재에도 더 나은 체외배양체계의 구축을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이와 함께 난포란을 개별적으로 체외배양의 전과정(*In vitro* maturation-fertilization-culture)을 거쳐 생산하는 체외수정란 생산기술의 체계적 발달은

본 연구는 1995~1998년도 농림수산특정연구과제 현장애로 기술개발사업연구비에 의하여 연구되었음.

*경상대학교 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

[†]Correspondence

몇몇 연구의 분야에 흥미를 가져다 줄 수 있을 것이다. 난포란 또는 수정란의 대사활동, 핵 및 체세포복제 그리고 초음파를 이용한 난포란 채란(Ultrasound-guided ovum pick-up: OPU)과 같은 연구들은 체외수정란을 생산하는데 있어서 체외성숙, 수정 및 배양 단계에 따른 난포란과 수정란의 소수의 배양체계의 확립이 요구된다. 특히 초음파를 이용한 난포란 채란에 있어서 유전적으로 가치있는 동물(공란우)로부터 얻어진 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하기 위해서는 소수의 난포란 배양에 적합한 배양체계의 확립이 필수적이다. 그러나, 몇몇 연구보고서에서는 난포란과 수정란을 개별적으로 배양했을 때 그룹배양과 비교해서 매우 낮은 후기배로의 발달율을 보고하였다 (Gardner 등, 1993, 1994a; Ferry 등, 1994; Kato와 Tsunoda, 1994; Blondin과 Sirard 등, 1995; Carolan 등, 1996).

따라서 본 연구의 목적은 초음파를 이용한 난포란의 채란에 있어서 유전적으로 가치있는 동물(공란우)로부터 얻어진 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하기 위해서는 소수의 난포란과 체외수정란의 배양에 적합한 배양체계의 구축이 필수적이므로, 도축우의 난포란을 이용한 체외배양방법에 따라 기존 그룹배양의 후기배 발달율에 상응하는 소수 수정란의 최적 배양체계를 구축하고자 하는 것이다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채란

본 실험에 공시된 한우 난소는 도축장에서 도살 직후 난소를 적출하여 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin (100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수 (30~35°C)의 보온병에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하여 생리식염수로 3~4회 세척한 후, 18-G needle이 부착된 50 ml tube에 음압을 이용하여 가시난포로부터 난포란을 채란하였다. 난포란의 선발은 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 최소한 2층 이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것을 선발하여 실험에 공시하

였다.

2. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙에 사용한 배양액은 Ham's F-10 (Sigma, U.S.A.)의 기본배양액에 56 μ g/ml sodium pyruvate, 100 μ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin G와 10 μ g/ml LH, 35 μ g/ml FSH, 1 μ g/ml estradiol-17 β 를 첨가하였고, 0.01 μ g/ml EGF (Sigma, U.S.A.)를 첨가하였다.

체외성숙은 체외성숙용 배양액에 15~20개의 난포란을 넣고 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C incubator (5% CO₂ incubator)에서 24시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

3. 체외수정

체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 IVF-TALP medium에 100 μ l drop당 15~20 개의 난자를 옮긴 다음, Percoll density gradient 방법으로 운동성을 가진 정자를 채취하여 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 2×10^6 sperms/ml이 되도록 조절하여 매정한 후, 24시간 동안 39°C, 5% CO₂ incubator에서 수정을 유도하였다.

4. 체외수정란의 체외배양

체외수정된 수정란은 기본 배양액 Hamster Embryo Culture Medium (HECM; Schini and Bavister, 1988)을 약간씩 변형시킨 HECM-3에 11종의 아미노산(taurine, asparagine, cysteine, histidine, lysine, proline, serine, aspartic acid, glycine, glutamic acid, glutamine)이 첨가된 배양액 HECM-6으로 4~5회 세척하여 난구세포와 정자를 완전히 제거한 다음, 0.1 mg/ml polyvinylalcohol (PVA, Sigma, U.S.A.), 3 mg/ml BSA (Fraction-V, Sigma, U.S.A.) 또는 10% bovine calf serum (BCS, Hyclone®, U.S.A.)이 각각 첨가된 배양액에 droplet 당 수정란의 비율을 조절하여 3~4일간 HECM-6에서 배양한 후, 10% BCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 체외수정란을 옮겨 7~10일까지 배양하여 후기배로의 배 발달율을 조사하였다.

5. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM (General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square mean을 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 체외배양시 각기 다른 첨가물에 따른 수정 및 배 발달

Table 1에서는 초기 체외수정란의 체외배양시 단순배양액 HECM-6에 각기 다른 첨가물 PVA, BSA 또는 BCS를 각각 첨가하여 4일 동안 배양한 후, TCM-199 배양액으로 체외수정란을 옮겨 배양함으로써 수정 및 후기배로의 발달을 조사하였다. 수정율에 있어서 PVA, BSA 및 BSA 첨가구에서 각각 72.5, 75.0%와 76.7%로 나타나 각 처리군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 수정 후 후기 배반포기배로의 발달율에 있어서도 PVA, BSA 첨가구 및 BCS 첨가구에서 각각 42.2, 40.5%와 38.0%를 나타내어 각 처리군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

많은 체외배양체계(IVC system)에 사용되고 있는 화학적으로 규정된 배양액에는 대체로 BSA와

같은 단백질원을 함유하고 있다. 그러나 아직까지 수정란의 초기발달에 영향을 미치는 단백질이나 아미노산의 정확한 농도는 규명되어 있지 않다. 지금까지는 체외수정란을 생산하기 위해서는 대부분의 단순배양액에는 주로 BSA를 첨가하여 왔으나, BSA의 대체용으로서 PVA를 첨가하여 수정란의 부착을 방지하였다(Bavister, 1981).

Yoshioka 등(1997)은 체외수정 후 5일째(120시간)의 상실배를 이용하여 체외배양액 mSOF에 BSA와 FCS를 각각 첨가하여 6일에서 10일째까지의 배반포기 발달율에 있어서 FCS 첨가구에서는 BCS 첨가구보다 높은 성적을 나타내었다고 보고하였다. 또한 부화율은 체외배양 후 8일과 9일에 있어서 FCS 첨가구에서는 BSA 첨가구에 비하여 높은 성적을 나타내었으나, 배양 후 10일에 있어서는 두 처리구간에 비슷한 성적을 나타내었다.

그리고 Ohboshi 등(1996)은 serum-free medium인 mSOFM에 calf serum (CS), BSA, PVA를 각각 첨가하여 수정율과 후기배로의 발달율을 조사한 결과, 수정율에 있어서는 유의적 ($P < 0.05$)인 차이를 나타내지 않았으나, 후기배로의 발달율에 있어서는 PVA보다 CS와 BSA에서 높은 성적을 나타내었다. 이들은 BSA 또는 CS 대신에 PVA를 첨가

Table 1. Effect of different protein supplements in HECM-6 medium on development of bovine IVF embryos

Supplements	Replicates	No. of oocytes used	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of embryos developed to blastocyst
PVA	21	3,567	2,586 (72.5) ^a	1,092 (42.2) ^b
BSA	20	2,594	1,945 (75.0) ^a	787 (40.5) ^b
BCS	7	600	460 (76.7) ^a	175 (38.0) ^b

[†]Values with same superscripts in the column were not significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Comparisons of embryo development into blastocyst by use of droplets culture and 4-well plate culture

Treatment*	No. of oocytes used	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of blastocysts	
			Total	Hatched
4-well (1/2 μ l)	200	150 (75.0) ^a	77 (51.3) ^b	67 (87.0) ^c
Droplet (1/1 μ l)	350	270 (77.1) ^a	139 (51.5) ^b	127 (91.4) ^c

[†] Values with same superscripts in the column were not significantly different ($P < 0.05$).

* 4-well: cultured 150 eggs in 300 μ l medium; Droplet: cultured 50 eggs in 50 μ l medium under paraffin oil

하는 것이 후기배로의 발달율을 저하시키는 결과를 보고하였으나, 이는 단순배양액 mSOFM를 이용하여 수정후부터 후기배로의 발달을 유도하였으나, 본 연구는 HECM-6를 이용하여 체외수정 후 수정란을 배양하는데 있어서 2단계 방법으로 체외 배양(수정후 3일 또는 4일까지는 11종의 아미노산이 첨가된 HECM-6로 배양한 다음 10% BCS가 첨가된 TCM-199으로 옮겨서 배반포기배까지 배양) 하는 것이 후기배로의 발달율을 높일 수 있을 것으로 사료되며, 초기수정란의 배양에 있어서 수정후 3일 또는 4일까지는 11종의 아미노산이 첨가된 단순배양액 HECM-6에 PVA, BSA 또는 BCS를 첨가하여도 후기배로의 발달율에는 차이를 나타내지 않았으며, BSA 또는 BCS와 같은 단백질을 따로 첨가하지 않고 PVA만을 첨가하여도 후기배로 발달하는데에는 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

2. 체외수정 후 4-well plate 또는 droplet 배양에 따른 수정율 및 배발달율

채란한 난포란을 체외성숙·수정 후 체외배양액 HECM-6에서 4일 동안 배양한 후 TCM-199에 배양하는데 있어서 배양조건을 1 embryo/2 μ l 4-well plate 비율과 paraffin oil로 피복된 1 embryo/1 μ l droplet 비율로 실험한 결과 수정율과 후기 배반포기배로의 배발달율 및 부화율을 조사하였다(Table 2). 수정율은 각각 75.0%와 77.1%로 나타나 각 처리군 간에 유의적인 차이점은 나타나지 않았으며, 수정 후 후기 배반포기배로의 발달율에 있어서도 각각 51.3%와 51.5%를 나타내어 처리군간의 차이는 나타나지 않았다. 또한 부화율에 있어서도 각각 87.0%와 91.4%를 나타내었다. 이는 체외수정란을 4-well plate에서 배양하거나 paraffin oil로 피복된 droplet에서 배양을 하더라도 수정율과 배발달율 및 부화율에 있어서는 차이점이 나타나지 않았다. 그리고 4-well plate에서는 체외배양액의 양을 300 μ l 이하로는 사용하기가 어렵기 때문에 배양액의 양을 100 μ l 이하로 조절하여 배양할 수 있는 droplet 배양을 실시하여 작은 수의 체외수정란을 소량의 droplet에서 배양할 수 있도록 하기 위해 예비실험으로 본 실험을 수행하였다.

3. 체외수정 후 droplet 배양시 수정란의 밀도에 따른 배 발달율

Table 3에서는 앞의 Table 2에서 설명한 바와 같이 체외배양액의 양을 조절할 수 있는 droplet 방법을 이용하여 50 μ l의 droplet volume에 체외수정란의 양을 조절하여 일정한 배양액의 양에 따라 각기 다른 체외수정란의 밀도가 후기배로의 발달에 영향을 미치는가를 조사한 결과는 다음과 같다. 50 μ l의 droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10, 20, 30, 40개 및 50개로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 35.7, 38.7, 40.1, 47.4, 44.9% 및 43.8%로서 유의적($P < 0.05$)인 차이를 나타내었다. 그러나, 각 군들 간에 유의성은 인정되었으나 20 embryos/50 μ l droplet 이상의 군에서는 40% 이상의 높은 배 발달율을 나타내었다.

Table 4에서는 20 μ l의 droplet volume에 체외수정란의 양을 조절하여 일정한 배양액의 양에 따른 체외수정란의 밀도가 후기배로의 발달에 영향을 미치는가를 조사한 결과는 다음과 같다. 20 μ l의 droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10개 및 20개로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 32.0, 36.7% 및 35.0%로서 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

Table 5에서는 체외배양액의 droplet volume과 체외수정란의 비율을 10 embryos/10 μ l, 20 embryos/20 μ l 및 50 embryos/50 μ l로 동등하게 조절하여 후기 배반포기배의 발달율을 조사한 결과는 다음과 같다. 후기 배반포기배로의 발달율은 각각 42.4, 40.6% 및 40.8%로서 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

도출된 각각의 공란우로부터 난포란을 채란할 때 채란된 난포란의 수는 공란우마다 각각 다양하게 나타날 수 있으며, 이들 각각의 공란우로부터 채란된 소수의 난포란으로 체외수정란을 생산하고자 할 때는 그들의 체외발달능력이 저하될 수도 있다(Mermillod 등, 1992). 특히 이러한 문제점은 초음파를 이용하여 각각의 우수한 생육의 중빈우로부터 채란된 소수의 난포란으로 체외수정란을 생산하고자 할 때 심각하게 발생되어질 수 있다. 따라서 초음파를 이용한 난포란의 채란에 있어서

Table 3. Effect of embryo number in a constant 50 μ l droplet of culture medium on development into blastocyst

No. of embryos/50 μ l droplet	Replicates	No. of embryos used	No.(%) of embryos developed to blastocyst
5	2	140	50 (35.7) ^b
10	5	310	120 (38.7) ^b
20	18	1,380	553 (40.1) ^b
30	3	390	185 (47.4) ^a
40	4	510	229 (44.9) ^a
50	3	500	219 (43.8) ^{ab}

^{a,b} Different superscripts within the same column denote significant difference ($P < 0.05$).

Table 4. Effect of embryo number in a constant 20 μ l droplet of culture medium on development into blastocyst

No. of embryos/drop volume (μ l)	Replicates	No. of embryos used	No.(%) of embryos developed to blastocyst
5/20	1	100	32 (32.0) ^a
10/20	2	90	33 (36.7) ^a
20/20	4	380	133 (35.0) ^a

[†] Values with same superscripts in the column were not significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Effect of different volumes with equal embryo density in culture drops on development into blastocyst

No. of embryos/drop volume (μ l)	Replicates	No. of embryos used	No.(%) of embryos developed to blastocyst
10/10	2	210	89 (42.4) ^a
20/20	3	180	73 (40.6) ^a
50/50	2	350	143 (40.8) ^a

[†] Values with same superscripts in the column were not significantly different ($P < 0.05$).

유전적으로 가치있는 공란우로부터 채란되는 난포란의 수는 어느 정도의 일정한 한계가 있기 때문에 이들을 이용한 체외수정란의 생산을 위해서는 소수의 난포란 및 수정란 배양에 적합한 체외배양 조건의 확립이 필수적이다. 이에 따라 체내수정란은 소량의 배양액에서 발달되는 것처럼, 체외수정란도 체내의 조건과 동일한 소량의 배양액에서도 잘 발달될 수 있다고 하였다(Kane 등, 1992).

Gardner(1994b)는 체외수정란의 생산을 위한 그룹배양에 있어서 각각의 난포란 및 수정란에서 분비되는 성장인자들은 혈액을 경유하지 않고 확산에 의하여 인접한 표적세포에 전달되어 국소적으로나마 그 세포의 기능을 조절하는 분비양식으로

주위의 다른 난포란 및 수정란의 발달을 촉진시킬 (paracrine) 뿐만 아니라, 특정한 분비세포에서 방출된 그 물질이 그 세포 자체의 세포막에 존재하는 수용체와 결합하여 그 세포를 자극시킴으로써 동일세포에서 또 다른 물질을 방출시키는 분비양식으로 그들 자신의 발달을 촉진(autocrine)시킨다고 하였다. 그러나 이들은 체외수정란의 개별배양에 있어서는 배양액의 양이 너무 많으면 수정란에서 분비되는 성장인자들이 배양액에 지나치게 희석되어 후기배로의 발달에 효과가 나타나지 않는다고 하였다.

Ferry 등(1994)은 conditioned TCM-199 배양액을 이용하여 일정한 droplet volume 40 μ l에 각각

1개, 2개, 40개의 zygote를 배양시킨 결과, 배반포기배의 발달율은 일정한 배양액의 volume에 있어서 체외수정란의 수가 증가할수록 후기배로의 발달율은 증가한다고 하였으나, 배양액과 수정란의 동등한 배양비율, 즉 1 zygote/ μ l의 비율로 체외배양 후 배반포기배로의 발달율에 있어서는 유의적인 차이는 나타나지 않았다고 보고하였다. 또한 배양액과 수정란의 비율 (zygote/ μ l)을 각각 1/5, 1/10, 1/40 그리고 40/40으로 조절하여 배양한 결과, 5~8세포기까지의 발달율에 있어서는 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나, 배반포기배로의 발달율에 있어서는 그룹배양이 아닌 개별배양에 있어서는 많은 연구가 필요하다고 보고하였다. 특히 이들은 수일동안 새로운 배양액으로 교체되지 않았거나 증감되지 않는 small droplet 배양액에 있어서 수정란의 발달에 영향을 미치는 다른 요소들은 수정란이 개별적으로 사용할 수 있는 에너지물질에 한계가 있다고 하였다.

van Inzen 등(1995)은 배양액의 volume에 따른 체외수정란을 조절하여 후기배로의 발달율을 조사하였던 바, BRL cells conditioned TCM-199 배양액 500 μ l에 35개의 체외수정란을 배양시킨 large volume과 동일 배양액에 2 embryos/ μ l의 비율로 배양시킨 small droplet에서 배양 9일째 후기배로의 발달율과 배양 11일째 부화율에 있어서는 small droplet에서 높은 성적을 나타내었다고 보고하였다.

따라서 이들의 연구결과를 본 연구의 결과와 비교하여 고찰해 볼 때 체외수정 후 체외수정란의 체외배양에 있어서 배양액의 volume과 체외수정란의 수를 적절하게 조절하여 배양하는 것이 후기배로의 발달율을 향상시킬 수 있을 것으로 사료되며, 또한 개별적 난포란과 수정란의 체외배양체계에 있어서는 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

초음파를 이용한 난포란의 채란에 있어서 유전적으로 가치있는 동물(공란우)로부터 얻어진 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하기 위해서는

소수의 난포란 배양에 적합한 배양체계의 구축이 필수적이므로, 도축장에서 도축된 한우의 난소에서 최소한 2층 이상의 난구세포를 가지고 세포질이 충실한 난포란을 이용하여 체외성숙·수정 후, 체외배양에 있어서 체외수정 후 체외배양용 배양액 HECM-6에 3~4일 동안 초기 체외수정란을 배양시킨 다음 10% BCS가 첨가된 신선 TCM-199 배양액으로 수정란을 옮겨 48시간마다 신선 TCM-199배양액으로 교체하여 7~10일까지 후기배로의 발달율을 유도하였다. 또한 초기 수정란을 배양하는데 있어서 HECM-6에 PVA, BSA 또는 BCS를 각각 첨가하고, 또한 배양액 droplet의 volume에 따른 수정란 수의 비율에 따라 후기배로의 발달율을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

HECM-6 배양액에 PVA, BSA 및 BCS를 각각 첨가하였을 때, 수정율과 후기배로의 발달율에 있어서는 세 첨가군 모두 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 체외배양시 4-well이나 droplet을 이용하였을 때 수정율, 후기배로의 발달율 및 부화율에 있어서 두 군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 수정란의 배양에 있어서 50 μ l droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10, 20, 30, 40개 및 50개로 조절하여 배양한 결과, 50 μ l droplet에 30개와 40개의 수정란으로 배양하는 것이 후기배로의 발달율에 있어서 각각 47.4% 및 44.9%로 높게 나타나 유의적($P < 0.05$)인 차이를 나타내었다. 그리고 20 μ l의 droplet volume에 체외수정란을 각각 5, 10개 및 20개로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 32.0, 36.7% 및 35.0%로서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 체외배양액의 droplet volume과 체외수정란의 비율을 10 : 10, 20 : 20 및 50 : 50으로 조절하여 배양한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 42.4, 40.6% 및 40.8%로서 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

이상의 실험 결과들을 종합해 보면, 대부분의 소 난포란들은 적절한 배양체계의 구축으로 소수의 수정란으로 체외배양했을 때 배반포기배까지 충분히 발달할 수 있다는 것을 나타내었다. 이것은 초음파를 이용한 난포란 채란에 있어서 각각의 공란우로부터 얻어진 소수의 난포란을 이용한 체외수정란의 생산체계 구축에 대한 폭넓은 연구의 장

을 열어 놓았으며, 우수한 증빈우의 난포란을 이용한 체외수정란 생산에 있어서도 확실한 수정란의 계통을 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bavister BD. 1981. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J. Exp. Zool.*, 217:45-51.
- Blondin P and Sirard MA. 1995. Oocytes and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 41:54-62.
- Carolan C, Lonergan P, Khatir H and Mermillod P. 1996. *In vitro* production of bovine embryos using individual oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 45:145-150.
- Ferry L, Mermillod P, Massip A and Dessy F. 1994. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology*, 42:445-453.
- Gardner DK, Lane M and Batt PA. 1993. Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep pre-attachment embryos developed *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:313-319.
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A and Batt PA. 1994a. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.*, 50:390-400.
- Gardner DK. 1994b. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol. Int.*, 18:1163-1179.
- Kane MT, Carney EW and Ellington JF. 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 and Tsunoda Y. 1994. Effects of the culture density of mouse zygotes on the development *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology*, 41:1315-1322.
- Mermillod, P., Wils, C., Massip, A. and Dessy, F. 1992. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. *J. Reprod. Fert.*, 96:717-723.
- Ohboshi S, Hanada K, Zhao J, Hattori M, Fujihara N, Umetsu, Yoshida T and Tomogane H. 1996. *In vitro* development of bovine one-cell embryos fertilized *in vitro* in serum- and feeder cell-free culture systems. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, 9:583-590.
- Schini SA and Bavister BD. 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.*, 39:1183-1192.
- van Inzen WG, van Stekelenburg-Hamers AEP, Weima SM, Kruip TAM, Bevers MM and Mummery CL. 1995. Culture of bovine embryos to the blastocyst stage using buffalo rat liver (BRL) cells. *Theriogenology*, 43:723-738.
- 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. Dev.*, 30:330-338.
- Yoshioka K, Othman AM, Taniguchi T, Yamanaka H and Sekikawa K. 1997. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. *Theriogenology*, 48:997-1006.

(접수일: 2000. 11. 18 / 채택일: 2000. 12. 17)