

배양액과 첨가제의 효율적인 품질검사에 관한 연구

정구민 · 문신용 · 오선경 · 임경순* · 장윤석
서울대학교 의과대학 산부인과

A Study on Effective Quality-Test of Medium and Supplemen

K. M. Chung, S. Y. Moon, S. K. Oh, K. S. Im* and Y. S. Chang

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University

서 론

체외수정과 수정란 이식은 생식세포의 성숙, 수정 및 발생생리를 이해할 수 있는 수단으로써 뿐만 아니라, 가축의 유전적 개량과 불임환자의 치료요법등에 활용되고 있다. 이러한 시술과정에서 생식세포는 체외환경에 단시간 또는 장시간 동안 노출되므로, 체외배양조건은 생식세포의 생존성에 직접적인 영향을 미칠수 있다. 특히, 배양액과 용기에 유해인자가 오염될 경우 생식세포는 심각한 손상을 받게 된다 (Schiewe 등, 1990; Boone 등, 1990; Leibo, 1990). 이러한 유해인자의 오염을 시술 이전에 점검하는 일련의 과정을 품질검사(quality test 또는 quality control)라 한다.

품질검사를 실시하므로써 유독인자가 오염된 배양액과 용기를 선별할 수 있으며, 이는 곧 연구와 시술의 성공률을 증가시키게 된다. 또한 품질검사에 의해 수정란의 발생을 촉진시키는 성장인자가 다량 함유된 혈청 또는 기타 생리적 용액을 선택적으로 이용할 수도 있다. 따라서 본 연구는 배양액과 혈청의 품질검사를 효율적으로 실시할 수 있는 방법에 관해 검토하고자 한다.

배양액의 품질에 영향을 미치는 요인과 효율적인 이용방법

배양액의 제조과정은 물의 정제와 보존, 초사용기의 세척과 소독, 각종시약의 측정과 혼합, pH와 삼투압의 조절, 여과와 보존의 순으로 이어진다.

이러한 과정은 위생적인 환경에서 위생적인 방법에 의해 실시(Schiewe 등, 1990) 되어야 하며, 대부분의

연구실에서 그렇게 하기 의하여 노력하고 있다. 그럼에도 불구하고 동일한 종류의 배양액에 대한 수정란의 배양 결과는 각 연구실 뿐만 아니라 동일한 연구실에서도 다양하게 나타난다. 이러한 불규칙한 결과는 각종 실험과 시술(bovine AI & ET, human IVF-ET)의 성공률을 저하시켜 노력과 경제적 손실 뿐만 아니라, 정신적인 고통을 수반하기도 한다. 따라서 양질의 배양액을 지속적으로 제조하는 것은 일정한 성적을 유지하는 것과 관련이 있다. 이를 위해서는 배양액 제조 용기의 적절한 선택, 세척, 소독 방법을 확립하고, 아울러 배양액의 제조 및 보존과정에서 독성물질의 유입과 구성분의 변성을 방지하여야 한다.

1. 물의 선택과 정제 및 이용

배양액의 약 98%는 물로 구성된다. 그러므로 물은 수정란과의 접촉빈도가 가장 많은 인자로 간주되며, 세포의 대사에 직접 또는 간접적으로 작용하므로 물의 선택과 정제는 배양액 제조과정에서 가장 먼저 고려되어야 한다. 배양액 제조에 이용하는 증류수는 수도물, 우물물, 지하수 또는 빗물 등을 증류, 탈이온화 및 초여과 과정을 거쳐 그 순수도를 높이고 있다.

물의 증류 횟수는 수정란의 체외발생률과 직접적으로 연관된다는 사실(Whittingham, 1971)이 밝혀진 이후 물의 증류효과에 관한 많은 연구가 진행되었다. 증류 횟수는 2회(Snyman과 Merwe, 1986; Fleetham 과 Mahadevan, 1988), 3회(Pope 등, 1983; Condon-Mahony 등, 1985), 4회(Jones 등, 1982), 5회(Dandekar와 Quigley, 1984; Leung 등, Sokoloski와 Wolf, 1984) 또는 6회(Quinn 등, 1984)로 연구자

* 서울대학교 농과대학(College of Agriculture, Seoul National University)

간에 차이를 보이고 있지만, 체외수정과 같은 민감한 배양조건에서 4~5회의 증류를 일반적으로 실시하고 있다. 한편 특정 지역의 우물물을 사용함으로써 1회의 증류만으로도 생쥐 난자의 높은 체외 성숙률, 수정률 및 발생률을 보이고 있다(Eppig등, 1990).

증류 자체만으로는 물에 함유된 모든 독성물질을 제거할 수 없음이 sperm motility bioassay에 의해 밝혀 졌다(Bavister와 Andrews, 1988). 따라서 탈이온화와 초여과(reverse osmosis-ion exchange filtration; 예, RO/ Milli-Q)를 수반함으로써 증류 후 잔류된 유기물과 무기물을 제거하고 있다(Gabler, 1984; Eleetham과 Mahadevan, 1988). 이러한 장치를 시험관아기기술연구실에 배치하여 높은 성공률을 유지하고 있다(Guinn등, 1985; Cummins등, 1986). 또한 HPLC(high performance liquid chromatography) 용 물이 시험관아기 기술용 배양액의 제조에 성공적으로 이용되고 있다. 본 연구실에서도 HPLC 용 물을 사용하여 생쥐 수정란의 높은 체외발생률과 시험관아기기술의 지속적이고 양호한 성공률을 얻고 있다. 한편 한 연구보고에 의하면 HPLC용 물이 시험관아기기술에 큰 잇점이 없음을 밝히고 있다(Rinehart 등, 1988). 그 이유로써 물의 공급 및 판매과정에서 보존기간이 길어질수록 용기(병 또는 프라스틱 제품)로부터 중금속의 누출가능성(Abramczuk등, 1977; Galber등, 1983)과 박테리아의 오염으로 생산된 endotoxins의 유효효과를 지적하고 있다(Chapman 등, 1983; Fukuda등, 1987).

이와같이 보존과정에서 물의 오염과 변성은 물을 자체제조 할 경우에도 주의 하여야 한다. 왜냐하면 물은 제조 후 1시간이 경과하므로써 물의 품질(특성 또는 생명력)이 변화될 수 있기 때문이다(Gabler등, 1983). 따라서 배양액 제조에 사용하는 물의 효율적인 이용방법에 관하여 살펴보고자 한다. 첫째, 물은 제조 후 즉시 사용하는 것이 최선책이지만, 현실적인 어려움이 있을때는 제조 후 24시간 이내에 사용하는 것이 바람직하다. 둘째, 물의 보존용기는 프라스틱보다 유리제품이 추천되고 있다. 왜냐하면, 유기물의 오염이 프라스틱에서 더욱 빠르게 진행되기 때문이다. 유리용기는 재질이 붕소규산염으로 된것을 선택하며, 뚜껑도 동일한 재질의 유리뚜껑을 사용하도록 한다. 셋째, 물은 자체 생산하여 신선한 물을 신속하게 이용하므로써 체외배양의 양호한 성적을 얻을

수 있다(Army등, 1987; John등, 1988). 그러나 현실적으로 고가의 증류장치의 구입이 어려운 연구실에서 물을 구매 할 때 국내의 생산자(회사)와의 직접계약이 바람직하다. 중간 상인이 개입될 때 물은 창고에서 오랜기간동안 방치될 수 있고, 이는 물의 화학적, 물리적 변성의 직접적인 원인이 될 수 있다. 넷째, 물은 자연의 산물이므로 계절에 따라서 특정 성분의 변화가 있을 수 있다. 특히 유기물의 함량이 계절에 따라서 차이가 있을 수 있다(Mather등, 1986). 이러한 물의 계절적인 변이는 수정란 이식의 계절적인 성공률과 일치하는 경향이 있음이 지적되고 있다(Boone와 Shapiro, 1990). 그러므로 수정란 이식을 한 시기에 집중적으로 실시하는 연구소에서는 이러한 점을 고려함직도 하다. 다섯째, 물에 오염된 중금속 이온을 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA, 100 μ M) 또는 아미노산, 알부민, 혈청과 같은 단백질원에 의해 킬레이트됨으로써 제거시키거나 그 수준을 낮출수 있다(Abramczuk등, 1977; Taylor, 1984). 여섯째, 물을 단계적으로 증류하는 과정에서 물은 수조에서 비교적 오랫동안 보존되는 경우가 있다. 이때 박테리아(gram-negative bacteria)가 오염 및 증식된 후 죽은 박테리아로 부터 endotoxins 이 유리된다. 이 독성물질은 phospholipid, polysaccharide 및 소량의 단백질로 구성된 거대분자로서 배양액 제조용 물에 1ng/ml이상 함유될 경우 수정란에 치명적인 영향을 미쳐 임신율의 현저한 감소를 초래한다(Snyman와 Van der Merwe, 1986; Fishel등, 1988). 이 독성 물질은 수정란의 세포질 소기관(미토콘드리아, 리보솜, 소포체)뿐만 아니라 핵에 손상을 입혀(Silver, 1981), 체외수정된 난자의 비정상적인 발생(과편화, 세포질의 과립화, 불규칙한 원형질막)을 초래한다. 그러므로 endotoxins의 오염은 물의 제조와 보존 과정에서 예방되어야 한다. Mather등(1986)은 수조에 순환장치를 설치하므로써 endotoxins의 생성을 방지할 수 있다고 보고하였다. 마지막으로 본 연구실에서 몇 종류의 물의 삼투압을 측정 한 결과를 소개할까 한다. 몇몇 시험관아기센터에서 자체생산된 증류수와 수입된 HPLC용 물의 삼투압을 각각 10만복씩 측정 한 결과 HPLC용 물은 주로 1 mOsm/kg, A 병원의 물은 주로 2 mOsm/kg, 그리고 B병원의 물은 3 mOsm/kg으로 각각 차이를 보였다. 이러한 차이는 생쥐 2세포 수정란이 체외발

생물에도 영향을 미쳤다.

이러한 모든 사실을 고려해 볼때 배양액 제조용 물의 생산과 이용은 매우 어려운 과제로 우리를 고민스럽게 한다. 불행하게도 배양액 제조용 물에 관한 국내의 연구 상황이 백지 상태에서 우리는 너무나 많은 것을 기대하고 있다. 그리고 이러한 물은 수입에 의존할 성질의 영역이 아니다. 외화손실 뿐만 아니라 물의 특성을 고려하여 이러한 물의 산업적인 생산과 신속한 유통이 절실히 요구되고 있다.

2. 용기의 선택과 세척 및 이용

배양액 제조용 유리용기는 용적프라스크(또는 실린더), 비이커 및 보존병이 주로 이용되고 있다. 이들 용기는 다음의 조건이 갖추어진 것을 선택하여야 한다. 첫째, 재질이 붕소규산염(borosilicate)으로 된 용기를 선택 하여야 한다. 소다석회(soda lime)를 제작된 용기는 배양액 제조와 보존과정에서 유해성분이 누출되어 수정란에 유독 할 수 있다(Gerrity, 1988). 둘째, 용적(또는 눈금)이 정확한 용기를 선택 하여야 한다. 왜냐하면, 제작 회사 또는 각각의 제품에 따라서 용적의 차이가 있을 수 있다. 이러한 차이는 궁극적으로 배양액 구성분의 비율 뿐 만 아니라, 성질(삼투압, pH등)의 변화를 초래하여 수정란의 체외 발생에 나쁜 영향을 초래할 수 있다. 특히, 체외 배양 조건의 사소한 변화에도 민감한 반응을 보이는 체외수정과 1세포난자의 배양(Davidson 등, 1988)에 신중을 기해야 한다. 본 연구실에서는 년중 약 100 l의 Ham's F10배양액을 제조하여 연구와 시험관 아기기술에 이용하고 있다. 이 배양액은 1 l의 용적 프라스크로 제조되며, 제조 직후 삼투압(initial osmolality)은 주로 300-303mosm/kg이 된다.

그러나 특정 제품의 몇몇 용적 프라스크로 이 배양액을 제조하면 삼투압이 다소 높거나(305-308 mOsm/kg) 또는 다소 낮은(296-298mOsm/kg) 경향이 반복된다. 이와같이 삼투압이 다소 차이를 보이는 배양액을 생쥐 2세포 수정란에 의한 품질 검사에서도 나쁜 결과로 판정되는 빈도가 높았다. 세째, 용기를 반복 이용할 경우 배양액의 품질검사 성적이 양호한 용기를 선택하는 것은 매우 바람직하다. 왜냐하면, 용기에 따라서 세척 및 건조과정에서 유해물질의 잔류가능성의 차이가 있을 수 있으며,

배양액 제조과정에서 용기로 부터 유해물질의 누출가능성이 다를 수 있기 때문이다. 실제로 본 연구실에서 사용하는 많은 용적 프라스크 중에서 M계열이 D, V, N 계열보다 매우 양호한 수정란의 체외발생을 보이고 있다. 이러한 현상은 용기의 노후화와 관련이 있는 것이 아니라, 앞에서 언급된 용적의 차이 또는 유해물질의 잔류와 누출과 연관이 있는듯하다.

용기의 세척과 소독은 우리에게 또 다른 부담을 안겨다 준다. 왜냐하면 이 과정에서 세척제와 소독제의 오염 가능성이 높고, 그 과정은 매우 복잡하고 귀찮은 일이기 때문이다. 용기의 세척, 건조 및 소독 방법은 Dandekar와 Quigley(1984)에 의해 구체적으로 제시된 바 있다. 이 과정에서 특히 주의를 요하는 항목은 다음과 같다. 첫째, 용기의 세척과 행굼은 처음부터 끝까지 증류수와 정제수를 사용하여야 하며, 수도물의 사용은 절대 금해야 한다. 둘째, 사용한 용기는 세척제(예, Linbro 7X detergent)의 수조에 담그기 전에 따뜻한 증류수로 반복해서 행굼이 필요하다. 왜냐하면 유리에 부착된 각종 이온은 따뜻한 물로 행굼 줄 때 더욱 잘 유리되기 때문이다. 세째, 세척제에 일정 기간 담근 후 증류수로 행굼 할 때 용기가 식기 전에 솔질(brushing)하는 것이 바람직하다.

네째, 세척과 행굼이 끝난 후 용기를 건조할때 높은 온도(200~250℃)에서 빨리 건조시키도록 한다. 다섯째 유리제품은 고온고압멸균법(autoclaving)보다는 고온멸균법(180℃, 2시간)이 추천되고 있다. 왜냐하면 고온 고압기에 사용되는 물로 인한 용기의 재오염 가능성 때문이다. 한편 최근의 한 연구 보고(Boone와 Shapiro, 1990)에 의하면 세척제의 종류에 따라서 소독법을 달리하는 것이 바람직하다고 한다. 세척제를 acid로 할때 고온멸균법은 고온고압멸균법보다 수정란의 체외발생을 현저히 저하시켰다. 세척제를 soap로 할때 용기의 종류에 따라서 소독방법이 다를 수 있음이 시사되고 있다. 즉, 유리 배양접시는 두 소독법 간에 차이가 없었지만, 유리 튜브는 고온고압멸균법이 고온멸균법보다 수정란의 현저히 높은 발생율을 보였다. 이러한 측면에서 유리제품의 세척 및 소독법의 선택은 배양의 성패를 좌우할 수 있으며 또한 이 분야의 보다 구체적인 연구가 필요하다고 생각된다.

3. 배양액 제조용 시약의 보존과 이용

배양액은 연구 목적에 따라서 그 종류가 매우 다양하지만, 크게 단순배양액과 복합배양액으로 구분한다. 체외수정과 수정란의 배양과 이식을 위한 복합배양액은 40~60개의 성분이 함유되므로 특별한 연구 목적을 제외하고는 상업화된 제품을 이용하고 있다. 단지 다른 화학 성분과 친화력이 높거나 사용 온도에 따라서 몇몇 시약이 별도로 포장되거나 첨가된다. 복합 배양액 제조용 분말은 변성되기 쉬운 여러종류의 아미노산과 비타민 등이 함유되어 있으므로 수입 과정과 실험실에서의 보존(4℃)에 유의하여야 한다. 특히 냉장 저온 보존시 습기와 스며나온 물로 인한 변성을 방지하기 위하여 desiccator를 이용한 저온 보존이 바람직하다.

한편 연구의 목적에 따라서 구성분과 이들의 양을 조절하여 이용하는 단순 배양액은 약 10개 전후의 시약으로 제조된다. 이들 시약은 실험실에서 보존 및 이용과정에서 오염 또는 변성이 일어날수 있다. 만약 일부 시약에서 이러한 변성이 일어난다면 연구를 망치게 될 뿐만 아니라, 그 원인을 규명하는데 많은 시간과 노력이 소요된다. 그러므로 연구실원은 다음의 사소한 사실들에 주의 한다면 큰 불행은 사전에 예방할 수 있을 것이다. 첫째, 시약은 항상 청결한 장소에 보존하여야 한다. 둘째, 직사광선 또는 무균실험대의 자외선으로부터 보호되어야 한다. 셋째, 각각의 시약은 온도와 습도에 고유한 영역이 있으므로 보존시 이를 잘 지켜줌으로써 화학적 변성과 고유한 질량의 변화를 방지할 수 있다. 넷째, 동시에 여러종류의 시약을 사용할 때 시약지와 스푼으로 인한 화학적 오염을 방지하여야 한다. 다섯째, 시약병 뚜껑의 밀폐 여부를 반드시 재확인하여야 한다. 여섯째, 시약의 정확한 측량을 위하여 화학천평의 정기적인 기능검사와 청결유지를 실시하여야 한다. 이상의 모든 사실은 이용자의 부주의와 습관에 관련된 항목들이다.

4. 배양액의 제조과정과 보존

배양액은 첨가되는 각 시약의 고유한 기능에 따라서 적합한 방법으로 제조되어야 한다. 수정란의 체외수정과 배양에 많이 이용되어 왔거나 최근에 개발된 배양액의 성분과 제조방법은 다음과 같다. Ham's

F10(Dandekar와 Quigley, 1984; Lopata등, 1980; Edwards등, 1981), Tyrode's(Wood와 Kovacs, 1983), m-KRB(Biggers등, 1971; Quinn등, 1985), M16과 M2(Pratt, 1987), CZB(Chatot등, 1989), Waymouth 배양액(Eppig등, 1990).

배양액의 제조과정에서 주의 할 사항은 다음과 같다. 첫째, 배양액은 위생적인 환경에서 제조되어야 한다. 특히 음식물, 커피, 화장, 흡연 및 잡담을 엄격히 금해야 하며, 휘발성 실험재료의 사용과 먼지가 날리는 행동을 통제하여야 한다. 둘째, 제조자는 마스크와 일회용 비닐장갑을 착용하도록 한다. 장갑은 증류수로 행군 후 사용하므로써 latex 같은 독성물질의 배양액내에 유입을 방지할 수 있다. 장갑을 사용하지 않을때 손을 깨끗이 씻고 75% 알콜로 소독한다. 셋째, 용기는 배양액을 제조하는 동일한 물로 2~3회 행군 후 사용한다. 이때 용기의 내부에 앙금이 형성될 수 있는데 이 앙금은 산패된 지방과 각종 이온의 혼합물으로써 배양액을 오염시킬 수 있다. 그러므로 앙금이 형성된 용기는 다시 세척하여 사용하도록 한다. 넷째, 시약을 증류수에 용해할때 시약 상호간에 화학적 반응(응집)을 방지하여야 한다(즉, 각 시약은 순서에 준하여 녹이도록 한다. 시약을 녹일때 교반기는 매우 완만히 작동시킨다. 시약 상호간에 접촉빈도를 최소한 낮추기 위하여 시약을 녹이는 증류수의 양은 최종 용량의 70~80%가 되도록 한다. 다른 시약과 친화력이 높은 시약(예, $CaCl_2$)은 별도로 용해하고, 이 용액을 본 용액에 혼합할때 천천히 조금씩 첨가하도록 한다. 이 때 두 용액의 온도는 30℃이하로 하여야 만 응집을 방지할 수 있다). 다섯째, 배양액 제조후 즉시 삼투압과 pH를 측정하고 적정 수준으로 보정하여야 한다. 측정은 적어도 3반복을 실시한 후 중간 값을 기준으로 하며, 보정 할때 이론치와 실제치의 차이를 잘 고려하여야 한다. 보정을 정확하고 편리하게 하기 위해서는 측정된 기록을 잘 활용할 수 있다.

본 연구실에서는 Ham's F10 배양액의 삼투압을 300-303mOsm / kg에서 280mOsm / kg으로 낮추고자 할 때 증류수로 대체될 배양액의 이론치는 67~70 ml이지만 실제치는 57~60ml로써 삼투압을 보정하고 있다. 그러나 상업적으로 공급되는 분말로 배양액을 제조할 경우 삼투압의 변이가 다소 있음을 고려하여야 한다(Waymouth, 1970). 일반적으로 인간(Dan-

dekar 와 Quigley, 1984; Sokoloski와 Wolf, 1984) 뿐만 아니라 생쥐(Brinster, 1965; Whittin, 1971; Davidson등, 1988), 토끼(Naglee등, 1969), 돼지(Graves 등, 1977) 및 소 수정란(Seidel, 1977)은 비교적 넓은 범위의 삼투압에서도 체외발생이 가능하지만, 각 동물과 난자의 발생 단계에 따른 최적의 삼투압 범위가 있다.

특히 수정란의 건강도(등급)에 따라서 삼투압의 효과는 더욱 두드러지게 나타난다(Plante등, 1986). 그러므로 각 연구실에서 연구 목적에 따라서 설정한 배양액의 삼투압을 정확히 보정하므로써 최고의 성적을 얻는데 도움이 될 것이다.

삼투압과 마찬가지로 수소이온농도(pH)도 각 동물과 난자의 발생단계에 따라서 적정수준으로 보정하여야 한다(Brinster, 1965; Miyamoto등, 1974; Bavister, 1981; Carney, 1987; Davidson등, 1988). 특히, pH는 배양액 제조에 사용하는 물의 종류와 배양액의 제조과정(Schiewe등, 1990), 배양액의 성분(완충제)과 배양기의 탄산가스농도(Bastianns등, 1985; Walker 등, 1989)에 따라서 변화될 수 있으며, 이러한 사소한 변화는 체외환경에 민감한 1세포 난자의 발생에 치명적인 영향을 줄 수 있다(Davidson등, 1988). 그러므로 배양액의 pH는 배양액의 제조, 보존 및 배양과정을 고려하여 조절하여야 한다. 만약 배양액 제조 직후의 pH가 정상수준을 벗어났다면 제조과정에서 잘못된 것으로 판단 할 수 있으며, 이때 pH만을 조절하므로써 양호한 결과를 기대하기란 어려운 일이다. 여섯째 배양액의 여과(filteration) 과정에서 특정 성분의 변성 또는 여과기에 의한 유해물질의 오염에 주의하여야 한다. 단백질이 함유된 배양액은 bubbling과 denaturing을 방지하기 위하여 positive pressure filteration을 실시하여야 한다.

그리고 상업적으로 대량생산된 일회용 필터를 사용할때 독성물질의 잔류 가능성이 있으므로 첫 1~2 ml의 용액은 버려야 한다(Bavister와 Andrews, 1988; Wells등, 1988). 수정란이 회수되어 배양 또는 이식까지 상업적으로(또는 자체) 소독된 각종 용기와 배양액에 적어도 10~15차례는 노출되고 있음을 깊이 인지하여야 한다. 특히 이 과정에서 소량의 배양액이 잠재적인 유해물질이 잔류될 가능성이 있는 filter membrane을 통과하게 된다. 그러므로 배양액의 제조와 여과 과정에서 유해물질의 축적을 방지하기 위하

여 사소하고 귀찮은 일에 우리는 더욱 많은 신경을 써야 한다.

배양액은 종류와 특정 성분의 첨가 여부에 따라서 보존 방법과 보존기간을 달리하여야 한다. 복합 배양액(예, Ham's F10)은 4℃에서 보존할 때 2주 이내에 사용하여야 한다(Kaighn, 1984). 반면에 몇몇 배양액(예, Miminnal Essential Medium, Whitten's Medium)은 더욱 오랫동안 보존이 가능하다(Herr와 Wright, 1986). 그리고 대부분의 단순 배양액(m-KRB, T6, M16)은 보존가능 기간이 다른 특정 성분은 각각의 stock solution으로 제조하여 이용하고 있다.

즉, 기본염용액은 1개월, sodium bicarbonate용액은 2주동안 저온보존(4℃)하며, 자발적인 분해 가능성이 높은 pyruvate는 사용 직전에 첨가 하고 있다. 한편 Whitten's 배양액을 5% CO₂로 acidification 시킨 후 4℃에서 90일간 보존하여도 생쥐 수정란의 체외발생율의 저하를 초래하지 않는다는 보고가 있다.(Herr와 Wright, 1986).

본 연구실에서도 Ham's F10 배양액을 1개월간 냉장보존 한 후 생쥐 난자의 체외 수정과 배양에 있어서 양호한 결과를 얻은 바 있다. 이러한 사실을 근거로 할때 단지 체외배양 연구를 위한 배양액(특히 복합배양액)의 냉장 보존은 1개월까지도 무난하다고 생각된다. 그러나 이식을 전제로 한 체외배양에 사용하는 배양액의 냉장보존은 대부분의 연구실에서 2주 이내로 제한하고 있다. 왜냐하면, 특정 아미노산(L-glutamine)과 염(pyruvate)의 가변성으로 인한 유독물질의 누출과 수소 이온농도의 변화(Stewart-Savage 와 Bavister, 1988) 때문이다. 또한 보존과정에서 자외선과 광선에 배양액이 노출될 때 변성의 가능성도 있다.(Taylor, 1984).

첨가제의 준비와 이용

체외수정과 수정란의 체외배양에 사용하는 첨가제는 혈청, 난포액, 양수액 같은 생리적 용액과 알부민, 호르몬, 성장인자 같은 추출물이 있다. 여기서는 혈청의 처리와 보존에 관해 살펴 보고자 한다.

1. 혈청제조용 혈액 채취

혈액 채취 과정에서 몇 가지 주의 사항은 다음과

같다. 첫째, 동물을 보정할 때 스트레스를 최소화하여야 한다. 왜냐하면 스트레스는 혈액구성성분의 변화를 초래할 수 있기 때문이다. 둘째, 소독액을 사용할 때 소독액이 혈액으로 유입되는 것을 방지하여야 한다. 세째, 특정 생리주기(예, 난포기)의 혈액을 채취하기 위해서는 생리주기를 정확히 파악하여야 한다. 예를 들면, 소의 발정기 혈액을 채취하고자 할 때 일반적인 발정정후(승가, 승가허용, 외음부 팽창 및 점액분비, 홍분상태)등을 잘 관찰하여야 한다. 더욱 정확성을 기하기 위해서는 정상적인 번식 생리를 보이는 경산우로부터 2회 이상 발정주기를 관찰한 후 혈액을 채취하도록 한다. 네째, 혈액 채취 용기로써 일회용 플라스틱주사기를 사용해서는 안된다. 왜냐하면, 대부분의 일회용주사기는 수정란에 매우 유해한 성분이 함유되어 있기 때문이다. 특히 용액이 일회용 주사기에 단 5분간 노출 되어도 유해효과는 현저히 나타난다(Boone와 Shapiro, 1990). 그러므로 청결하고 멸균된 유리주사기를 이용하는 것이 바람직하다. 다섯째, 혈액 채취 후 상온 노출 시간을 최소한 단축시키도록 한다. 왜냐하면, 혈액내에서는 상온에서 변성되기 쉬운 효소, 아미노산, 지방산 및 비타민 등이 함유되어 있을 뿐 아니라, 혈액 조성분(예, 혈소판)의 파괴로 인하여 수정란에 유해한 성분이 누출될 수 있기 때문이다(Jinno등, 1986).

2. 혈청의 제조

혈청은 혈액채취 후 30분 이내에 제조하는 것이 바람직하며, 30분 이상 경과하므로써 수정란의 기형 발생을 유발시킬 수 있다(김, 1987). 그러나 본 연구실에서는 현실적인 어려움(야간 분만)으로 혈액 채취 후 6~12시간동안 4℃ 보존한 후에 혈청을 제조하고 있다. 시험관 아기 시술과 생쥐 수정란의 배양에 혈청을 이용하고 있지만, 수정란의 비정상적인 발생 빈도는 오히려 혈청간의 차이(batch to batch variation)에서 기인하였다. 즉, 6~12시간 보존하여도 약 80%의 혈청은 생쥐 2-세포 수정란을 배반포까지 정상적으로 발달시켰다.(문등, 1989). 혈액을 하루 이상 4℃에 보존할 경우에는 혈청의 색이 달라지며(주로 hemolysis에 기인함). 이러한 혈청은 수정란의 발생에도 나쁜 영향을 미쳤다.

혈청제조방법은 연구실간에 다소 차이가 있지만,

일반적으로 응고(clotting)→원심분리(1,000r.p.m. 30분 1회, 2,500r.p.m. 30분, 1회 또는 3,500r.p.m 10분씩 2회)→피브린 제거→비동화(56℃에서 30~60분)→원심분리(3,500r.p.m. 10분 1회)→여과(0.45m millipor filter)→분주→보존(-20℃ 또 -70℃) 과정을 거친다. 혈청은 제조방법에 따라서 수정란의 발생에 중요한 영향을 미칠 수 있다(Chen, 1967; Saito 등, 1984; Jinno등, 1987; Ogawa등, 1987; Padilla 등, 1988). 특히 charcoal extraction은 수정란의 발생율을 유의적으로 높일 수 있음이 입증되었다(Padilla 등, 1988).

3. 혈청의 보존

혈청은 제조후 즉시 사용하기에 편리한 양(2~5 ml)을 cap-tube에 분주하여 보존한다. 보존방법은 4℃에 단기간(5일 이내) 보존 하거나(Leung등, 1984; Ogawa와 Marrs, 1987) 또는 -20℃에 동결보존(Ball등, 1985; Naz등, 1986) 할 수 있다. 가정용 냉장고의 냉동실(약 -20℃)에 보존 할때 먼저 저온 온도계로 냉동실의 온도를 점검할 필요가 있다. 왜냐하면 전압이 일정치 않거나 또는 냉동실의 문을 자주 여닫을 경우 실내온도가-13~-20℃로 가변성이 있기 때문이다. 이러한 온도 변이는 혈청분리를 초래할 수 있으며, 혈청성분중 아미노산기의 손상을 초래할 수 있다고 한다. 그러므로 -20℃에서 보존 할 경우 1개월을 초과하지 않도록 하는 것이 바람직할 것이다. 이 보다 긴 기간 동안 보존할 경우-70℃의 냉동고를 이용하므로써 혈청의 점차적인 분리와 용질의 농축(단백질의 변성과 불용성을 초래함)을 방지할 수 있다(Kaighn, 1984).

4. 혈청의 이용

혈청은 수정란의 체외발생에 필요한 각종 에너지원과 성장 촉진 인자(Saito등, 1984; Ogawa등, 1987)를 함유하고 있을 뿐 아니라, 체외조건에서 난자의 유착과 경화를 방지해 주는 특성(Kane, 1987; Choi, 1987)을 보유하고 있다. 반면에 혈청은 수정란의 발생억제 인자(Ogawa와 Marrs, 1987)와 기형유발인자(Chatot등, 1984)도 아울러 함유하고 있음이 보고되었다. 또한 혈청은 생리주기에 따라서 그 구성분이 변화하므로, 혈청을 효율적으로 이용하기에 많은 어려움이 있다. 이러한 이유로 최근 초기 수정란의

연구에서는 혈청을 이용하지 않는 경향이 점차 증가하고 있다(Menezo등, 1984).

그러나 혈청은 난모세포(oocyte)의 체외성숙 또는 배반포의 배양에 있어서 필수적인 요소로 간주되고 있으며, 최근 소난포란의 체외수정에 있어서 발정기의 혈청이 매우 효과적으로 이용되고 있다. 그러므로 실험목적에 따라서 혈청의 종류를 적절히 선택하여, 난자의 생리에 적합한 이용법(Ogawa와 Marrs, 1987, 정, 1990)을 찾고, 아울러 혈청의 품질검사를 통하여 유해성이 높은 혈청을 제거하므로써 그 효율성을 증가시킬 수 있을 것이다.

배양액과 첨가제의 품질평가

1. 품질검사의 필요성

난모세포(oocyte)의 체외성숙과 수정 및 배양, 그리고 체내에서 발육 한 수정란의 체외배양에 따른 임신율을 증가시키기 위해서는 여러가지 요인이 간여한다. 첫째, 동물의 품종, 건강상태, 생리주기, 연령 등을 잘 고려하여야 한다(Xu등, 1988; Fortune등, 1988; Munar등, 1990). 둘째, 과배란과 발정주기의 동기화를 유기하기 위한 외인성 성선자극호르몬의 순수도와 활성을 점검하고, 이들을 정확히 이용할 수 있어야 한다(Donarldson과 Ward, 1986; Dieleman, 1989; Schmidt등, 1989). 셋째, 생식세포(정자, 난자)의 체외 처리와 보존효과(BonDurant등, 1982; Herv와 Wright, 1988; Ebert와 Papaioannou, 1989; Varner등, 1989), 그리고 이들의 생리에 적합한 환경조건(Bavister, 1988; Pomp등, 1988; Aoyagi등, 1989; Rexroad, 1989; Eppig등, 1990)을 이해하여야 한다. 마지막으로 이들의 종합적인 진단(검사)이 필요하다. 왜냐하면, 동물과 호르몬 및 체외배양조건이 연구자가 인지하지 못한 가운데 부적합한 상황이 있을 수 있기 때문이다. 이러한 상황을 미리 예방하므로써 결정적인 실패를 방지할 수 있을 뿐 아니라, 일정한 성공률을 유지할 수 있을 것이다.

특히, 체외배양조건은 생체의 환경을 모방하는 과정에 있으므로 아직도 완벽한 조건을 갖추었다고 볼 수 없다. 더욱 체외배양조건은 앞서 언급된 바와 같이 수 많은 과정을 거쳐 완성되는 것이며, 이 과정에서 유해인자의 오염 가능성이 있는 것이다. 또한 생식세포를 이용한 연구와 기술은 대부분 단시간

또는 장시간 체외과정을 거쳐 수행되므로 체외배양조건의 정확한 확립과 이들의 평가는 필수적인 것으로 간주되고 있다.

2. 품질검사의 중요성

배양액과 첨가제의 품질검사는 유전능력이 우수한 경제동물(젓소) 수정란의 상업화와 번식공학기법의 개발과 이용(체외수정, 초기 수정란의 배양, 유전자주입등) 그리고 시험관아기기술이 시작된 70년대 후반부터 인식되었으며, 80년대 중반부터 수정란의 체외발생능을 이용한 품질검사가 활성화 되었다.(Quinn등, 1984; Leung등, 1984; Dandekar와 Quigley, 1984; Marrs등, 1984).

품질검사를 실시하므로써 수정란의 발생율의 증가뿐만 아니라 체외배양된 수정란의 이식후 착상율(Caro와 Trounson, 1984; Arny등, 1987; Han등, 1988)과 정상적인 분만율(Jones등, 1982; Mahadevan등, 1986; Snyman과 Vander Merwe, 1986; Fishel등, 1988)도 향상될 수 있었다. 따라서 최근에 대부분의 시험관아기 센터에서 배양액과 혈청 그리고 시술용 기구와 1회용 플라스틱 용기에 이르기까지 품질검사를 실시하고 있다. 이러한 사실은 품질검사에 대한 중요성의 인식범위가 확대되고 있음을 시사한다.

3. 품질검사의 효율성과 방법

품질검사(quality test, quality control 또는 quality assay)는 난자의 체외배양에 이용하는 배양액과 혈청, 이들을 제조 및 보존하는 용기(유리제품, 일회용 플라스틱제품), 난모세포 또는 수정란의 회수침(aspirating needle)과 회수관 및 이식용 카테터, 난자 조작용 유리피펫, 배양용 접시(특히 일회용 플라스틱 제품)등을 대상으로 난자에 유해한 물질의 오염여부를 판정하는 것이다. 또한 배양환경(배양기의 습도, 온도, CO₂ 가스의 정확도와 균일성, 배양실의 조건 등)의 총체적인 점검 수단으로 이용될 수 있다.

본 연구실의 경험에 따른 효율적인 검사 요령은 다음과 같다. 첫째, 검사자의 객관적인 기준 설정이 선결 되어야 한다. 검사자는 풍부한 경험을 기초로 하여 그 연구실의 총체적인 조건(동물의 유전적인 배경, 동물사육실과 배양실의 위생상태, 사용하는 물, 시약, 호르몬, 용기 등의 등급, 인력수급과 정신적

인 안정감에 따른 연구수행의 효율성 등)에 적합한 객관적인 기준을 설정하여야 하며, 그 기준을 발전적인 방향으로 유도하여야 한다. 둘째, 처음 구입된 기구와 용기는 반드시 검사를 실시하여 신속히 수용 여부를 결정한다. 셋째, 배양액과 혈청은 제조 즉시 검사를 실시하여 실제에 빨리 이용하도록 한다. 검사품이 보존과정에서 외형적인 변화(배양액의 색변화, 혈청의 분리)가 있을 때 재검사를 실시하도록 한다. 네째, 일회용 플라스틱 제품은 사용하기 전에 lot 또는 sleeve 단위로 무작위 선발에 의해 검사를 실시한다. 다섯째, 세척 소독 방법에 있어서 변화가 있을 때 반드시 검사를 실시 한 후 그 안정성을 확인하도록 한다. 특히 배양기의 정기적인 소독과 점검 후 시험가동 중에 검사를 실시한다. 여섯째, 품질 검사의 정확성과 효율성을 높이기 위해 2가지 방법을 동시에 실시하거나 또는 한 방법을 실시 할 때는 반복수를 많이 하도록 한다. 일곱째, 검사용 배양액의 품질검사를 실시한다. 검사용 배양액의 품질검사는 정기적인 검사시 실시하며, 그 이전 배양액의 품질을 기준으로 하여 판정한다. 여덟째, 품질 검사 후 나쁜 결과에 대해서는 가능한 범위에서 원인 분석을 실시하도록 한다. 특히 배양액의 경우에 이러한 원인분석을 성실하게 수행하므로써 그 품질을 일정하게 유지시킬 수 있다.

품질 검사방법은 연구소 또는 시험관아기 센터에 따라서 다양하지만, 자체적으로 적합한 방법을 선택하여 이용하고 있다. 예를 들면, 실험동물의 사육이 용이하지 않지만, 임상병리실(또는 정액검사실)을 갖춘 병원에서는 인간의 정자 또는 체세포(예, human fibroblast cell)에 의해 배양액과 용기의 cytotoxic effects를 검사할 수 있다.

체외배양조건의 품질검사 방법 중 가장 보편적인 방법은 생쥐 난자 배양법이다. 이 방법은 생쥐 난자의 발생생리가 인간 또는 다른 동물과 비슷한 점과 생쥐가 다른 동물에 비하여 다루기 쉽고 경제적이므로 많이 이용되고 있다. 이 방법은 체외수정을 위한 난모세포(Fukuda 등, 1987; Han 등, 1988; Jackson과 Kiessling, 1989), 1-세포 수정란(Quinn 등, 1984, 1985; John과 Kiessling; Ogawa 등, 1987; Ogawa와 Marrs, 1987), 투명대를 제거한(zona-free) 1-세포 수정란(Fleming 등, 1987) 또는 2-세포 수정란(Silverman 등, 1987; Rinehart 등, 1988)이 이용될 수

있다. 체외수정을 하거나 1-세포 또는 2세포 수정란을 배양하여 배반포까지의 발생을으로써 품질검사의 기준으로 삼는다. 특히 배반포의 부화(hatching 또는 hatched)는 더욱 중요한 기준이 된다(Schneider 1986; Jinn 등, 1987).

1-세포 수정란은 2-세포 수정란 보다 유해인자 또는 비생리적인 요인에 대해 더욱 민감하므로 1-세포 수정란이 많이 이용되고 있다(Quinn 등, 1984; Ogawa 등, 1987; Davidson 등, 1988, John과 Kiessling, 1988). 그러나 1-세포 수정란은 수정여부를 확인하기 위해서 난구세포를 제거 함으로써 발생율이 현저히 저하된다. 이와 같은 배반포까지의 발생율이 낮으므로 상실배 또는 그 이전 단계까지 발생율을 기준으로 삼게 된다. 이러한 측면에서 1-세포 수정란의 이용성에 문제점을 제기하고 있다(Boone와 Shapiro, 1990). 또한 생쥐의 계통(strain)에 따라서 수정란이 선호하는 배양액이 다를 수 있으며(Dandekar 와 Glass, 1987), 생쥐 수정란과 인간(또는 다른동물)의 수정란이 대사작용에 있어서 다른 점(Chi 등, 1988)이 밝혀지면서 생쥐 수정란에 의한 품질검사는 한계성이 있는 것으로 간주되고 있다.

한편 Rinehart 등(1988)은 hamster sperm에 의한 품질검사법을 보고하였다. 햄스터 정자는 유해인자에 매우 민감하게 반응 할 뿐 아니라, 경제적이며 검사 기간도 짧기 때문에 일반화될 가능성이 높은 것으로 시사된다. 더욱 검사결과와 임신율과는 매우 신뢰성이 높은 것으로 밝혀졌다.

품질 검사의 실제

본 연구에서는 최근 18개월 동안 약 800명의 산모의 태아 제대(fetal cord)로 부터 혈액을 채취하여 F₁(C57BL×CBA) 생쥐 2-세포 수정란에 의해 품질검사를 실시하였다. 이중 1989년 초반기에 1772개의 2-세포 수정란에 의해 검사된 116점의 제대 혈청의 질전 분포도는 그림1과 같다(문 등, 1989).

검사용 배양액은 modified krebs Ringer Bicarbonate solution(m-KRB)을 이용하여, 1점의 혈청을 검사하는데 10~15개의 수정란을 사용하였다. 대조군(m-KRB+0.4% BSA)에서 발생율(팽윤 배반포 이상의 비율)은 98.1%(106/108)였으며, 처리군(m-KRB+10% human fetal cord serum)에서의 발생율

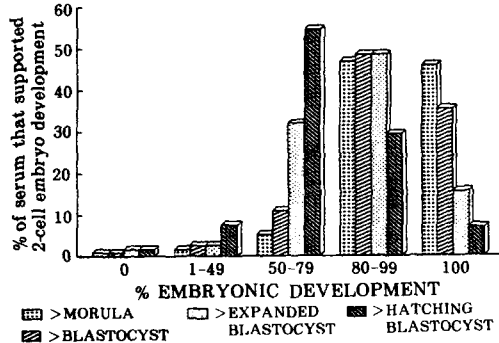


Fig. 1. Qualitative variation of Human cord sera that supported development of mouse 2-cell embryos in m-KRB medium supplemented with the respective serum.

은 혈청에 따라서 다양하게 나타났다.

수정란의 100%를 부화배반포까지 발생을 촉진시킨 혈청은 6.9%에 불과하였으며, 수정란의 100%를 팽윤배반포 이상 발생을 촉진 시킨 혈청은 15.5%였다. 한편 수정란의 80% 이상을 팽윤배반포로 발생을 촉진 시킨 혈청은 63.8%로써 전체 혈청의 약 2/3에 해당하였다. 이 기준을 통과한 혈청을 시험관아기 프로그램에 이용하였다.

또한 본 연구는 수정란에 대한 혈청의 특성으로써 절대적인 면과 상대적인 면을 관찰 할 수 있었다. 즉, 일부 혈청은 모든 2-세포 수정란을 부화 배반포까지 발달을 촉진시킨 반면에 다른 일부 혈청은 모든 수정란을 초기 발생단계에서 발생을 억제시켰다(혈청의 절대적인 특성). 그러나 다수의 혈청은 수정란의 일부를 부화배반포까지 발생을 촉진 시킨 반면에 일부는 발생을 억제 시켰다. 이 비율은 혈청에 따라서 차이를 보였다.

배양액의 품질검사에 있어서 복합배양액의 Ham's F10은 약 60% 그리고 단순배양액 m-KRB는 약 80%가 본 연구실의 기준을 통과하였다. 이 두 배양액은 동일한 연구자에 의해 동일한 HPLC-water로 제조 되었으며, 두 배양액의 일부는 공히 100%의 2-세포 수정란을 배반포까지 발생을 촉진시킨 점을 감안할때 복합배양액의 제조와 품질 검사에 더욱 신경을 써야 되리라 생각된다.

배양시스템의 품질검사는 연구소 또는 시험관아기 센터에 따라서 매우 다양할 뿐 아니라 최근에는 새로운 방법이 개발 되고 있다. 이 방법은 체외 환경조건(특히, 유해인자 또는 비생리적인 조건)에 민감한

반응을 보이는 1-세포 또는 2-세포 수정란을 이용하고 있다. 1-세포 수정란은 2-세포 수정란에 의해 검출되지 않은 유해효과를 감지할 수 있으므로 그 선택도가 높다(Ogawa등, 1987; Davidson등, 1988; John과 Kiessling, 1988).

결 론

배양액의 품질은 생식세포의 체외생존성에 결정적인 영향을 미칠 수 있다. 특히, 체외배양과정에서 수정란의 생리적, 물리적 손상은 이식 후 수정란의 발생과 직접적인 연관이 있는 것으로 이해되고 있다. 따라서 배양액과 기타 배양조건은 엄격히 품질검사되어야 한다.

품질검사를 효율적으로 수행하기 위해서는 유해물질의 오염을 사전에 예방하는 것이 무엇보다도 중요하다. 유해물질의 오염원은 배양액 제조용 물, 용기 및 시약으로 함축될 수 있다. 물은 종류, 탈이온화 및 초여과 과정을 통하여 순수도를 높일 수 있도록 정제한 후 24시간 이내 사용하도록 한다. 이 과정에서 보존용기의 재질과 박테리아의 증식에 각별한 주의를 요한다. 용기는 붕소규산염으로 제조된 것을 이용하고, 세척과 건조 및 멸균 과정에서 방법과 약제의 선택은 매우 중요한 요인이 된다. 시약은 각각의 화학적 특성을 먼저 이해하고 보존(온도, 습기) 및 이용방법에 신경을 써야 한다.

배양액의 제조 및 보존 과정에서 특정성분(CaCl₂, pyruvate, NaHCO₃)의 변성으로 인하여 유해물질이 생성될 수 있으므로 시약과 배양액의 특성에 적합한 방법이 모색되어야 한다. 또한 배양액 보존 용기와 여과기에 독성인자의 잔류 가능성도 고려하여 이들 용기는 행균이 필요하다.

혈청은 생리적 용액이므로 각각의 출처에 따라서 그 성분이 다양할 수 있다. 특히, 유해 성분의 양과 종류도 다양할 수 있음을 인지하여야 한다. 또한 혈청은 혈액의 채취 및 제조과정에 따라서 품질의 변화가 있을 수 있다. 그러므로, 혈청의 품질검사는 반드시 실시되어야 한다.

품질검사 방법은 생쥐 1-세포 또는 2-세포 수정란의 체외배양법이 가장 일반적으로 이용되고 있지만, 최근에는 보다 간편하고 정확한 방법이 개발되고 있다. 인간 또는 햄스터 정자에 의한 검사법은 향후 일반화될 가능성이 높은 방법으로 시사되고 있

다.

* 배양액과 혈청의 품질검사 및 논문준비에 도움을 준 유연미, 송남희씨에게 감사를 표합니다.

참 고 문 헌

- Abramczuk JW. and Lopata A. 1986. Incubator performance in the clinical in vitro fertilization program: importance of temperature conditions for the fertilization and cleavage of human oocytes. *Fertil. Steril.* 46:132-134.
- Aoyagi, Y, Kukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M, Minegishi Y and Ono. H. 1989. Effects of culture system on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 31(1):168.
- Anry M, Nachtigall L and Quagliarello J. 1987. The effect of preimplantation culture condition on murine embryo implantation and fetal development. *Fertil. Steril.* 48:861-865.
- Ball CD. and Aaker DV. 1989. Human fetal cord serum vs amnionic fluid as an embryo culture medium. *Biol. Reprod.* 40(suppl 1):66, abst.
- Bastianns B, Vemer H and Rolland R. Development of mouse embryos in different culture media. In: Rolland R et al(eds), *Development of mouse embryos in different culture media.* Elseviere science publishes, 1985. pp.109-113.
- Bavister BD. Analysis of culture media for in vitro fertilization and criteria for success. In: Mastroianni L Jr., and Biggers JD.(eds), *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*, Plenum Press, New York, 1981, pp.41-60.
- Bavister BD. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology* 29(1):143-154.
- Bavister BD. and Andrews JC. 1988. A rapid sperm bioassay procedure for quality-contrl testing of water and culture media. *J.Vitro Fert. Embryo Transfer* 5:67-75.
- Bigger JD, Whitten WK. and Whittingham DG. 1971. The cultur of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC.(eds), *Methods in Mammalian Embryology*, Freeman, San Francisco, pp.86-116.
- BonDurant RH., Anderson GB, Boland, MP, Cupps, PT and Hughes MA. 1982. Preliminary studies n bovine embryo survival following short term storage at 4 °C. *Theriogenology* 17:223-230.
- Boone WR. and Shapiro SS. 1990. Quality control in vitro fertilization laboratry. *Theriogenology* 31(1): 23-50.
- Brinster RL. 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. the effect of osmolarity and hydrogen ion concentratin. *J. Exp. Zool.* 158:49-58.
- Carney EW. and Bavister BD. 1987. Regulation of hamster embryo development in vitro by carbon dioxide. *Biol. Reprod.* 36:1155-1163.
- Caro CM and Trounsn A. 1984. The effect of protein on preimplantion mouse embryo development in vitro. *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer* 1:183-187.
- Chapman KG, Alegnani WC, Heinze GE, Flemming GV, Kochling J, Croll DB, Kladko M, Lehman WJ, Smith DC, Adair FW, Amos RL, Enzinger RM, Grant DE and Soli TC. Protection of water treatment systems, part 1:the Problem. *pharm. Technol.* 7(5):48-57.
- Chatot CS, Klein NW, Clapper ML, Resor SR, Singer WD, Russman BS, Holmes GL, Mattson RH. and Cramer JA: Human serum teratogenicity studied by rat embryo culture: epilepst, anticonvulsant druge and nutrition. *Epilepsia.* 25:205.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL and Torrs I. 1989. An improved culture medium supports development of randm-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fert.* 86:679-688.
- Chen RF. 1967. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* 242:173-181.
- Chi MMY, Manchester JK, Yang VC, Curato AD, Strickler RC. and Lowry DH. 1988. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biol. Reprod.* 39:295-307.

- Condon-Mahony M, Wortham JWE Jr., Bundren JC, Witmyer J and Shirley B. 1985. Evaluation of human fetal cord sera, Han's F-10 medium and in vitro culture materials with a mouse in vivo fertilization system. *Fertil. Steril.* 44:521-525.
- Cummins JM, Breen TM, Fuller SM, Harrison KL, Wilsn LM, Hennessey JF, Shaw JM and Shaw G. 1986. Comparison of two-media in human in vitro fertilization program: lack of significant differences in pregnancy rate. *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer* 3:326-330.
- Dandekar PV and Quigley MM. 1984. Laboratory setup for human in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 42:1-12.
- Dandekar PV and Glass RH. 1987. Development of mouse embryos in vitro is affected by strain and culture medium. *Gamete Res.* 17:279-285.
- Davidson A, Vermesh M, Lobo RO and Paulson RJ. 1988. The temporal effects of changes in in vitro fertilization culture media on the one-cell mouse embryo system. *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer* 5:149-152.
- Davidson A, Vermesh M, Lobo RA and Paulson RJ. 1988. Mouse embryo culture as quality control for human in vitro fertilization: the one-cell versus the two-cell model. *Fertil. Steril.* 49(3):516-521.
- Dieleman SJ, Bevers MM, Wurth YA, Gielen JT and Willemse AH. 1989. Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. *Theriogenology* 31(2):473-488.
- Donardson LE and Ward DN. 1986. Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. *Vet. Rec.* 119:625-626.
- Ebert KM and Papaioannou VE. 1989. In vivo culture of embryos in the immature mouse oviduct. *Theriogenology* 31(2):299-308.
- Edward RG. 1981. Test-tube babies, 1981. *Nature* 293:253-256.
- Eppig JJ, Schroeder AC, van de Sandt JJM, Ziomek CA and Bavister BD. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes that grow and maturation in culture: the effect of modification of the protocol. *Theriogenology* 33(1):89-100.
- Fishel S, Jackson P, Webster J and Faratian B. 1988. Endotoxins in culture medium for human in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 49(1):108-111.
- Fleetham J and Mahadevan MM. 1988. Purification of water for in vitro fertilization and embryo transfer. *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer* 5:171-174.
- Fleming TP, Pratt HPM and Braude PR. The use of mouse preimplantation of embryos for quality of culture reagents in human in vitro fertilization program: a cautionary note. *Fertil. Steril.* 47:858-860.
- Fortune JE, Sirois and Quirk SM. 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29(1):95-110.
- Fukuda A, Nada Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J and Mori T. 1987. Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer* 4:40-45.
- Gaddum-Rosse P, Blandau RJ, Langley LB, and Battaglia DE. 1984. In vitro fertilization in the rat: observations on living eggs. *Fertil. Steril.* 42:285-292.
- Gerrity M and Shapir SS. 1985. The use of a mobile laboratory cart in a successful university-based human in vitro fertilization program. *Fertil. Steril.* 43:481-484.
- Graves WM, Dickey JF and McConnell JC. 1977. In vitro development of porcine embryos. *J. Anim. Sci.* 45(Suppl. 1):164, abstr.
- Han MD and Kiessling AA. 1988. In vivo development of transferred mouse embryos conceived in vitro in simple and complex media. *Fertil. Steril.* 50:159-163.
- Herr C and Wright RW Jr. 1986. Storage life of Whitten's embryo culture medium. *Theriogenology* 25:158(Abstr).
- Herr CM and Wright RW Jr. 1988. Cold storage of mouse embryos of different stages of development.

- Theriogenology 29(3):765-770.
- Jackson KV and Kissling AA. 1989. Fertilization and cleavage of mouse oocytes exposed to the conditions of human oocyte retrieval for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 51:675-681.
- Jinno M and Lizuka R. 1987. An embryotoxic effect of serum prepared by delayed centrifugation of whole blood can be overcome by immediate cooling and centrifugation. Fifth World Congress on In vitro fertilization and Embryo. Transfer, Norfolk, VA 19 87, abstr 99-112.
- John DP and Kiessling AA. 1988. Improved pronuclear mouse embryo development over an extended pH range in Ham's F-10 medium without protein. *Fertil. Steril.* 49:150-155.
- Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wilkes C, Witmyer J, Wortham JE and Wright G. 1982. The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil. Steril.* 38:14-21.
- Kaighan ME. 1984. Standards and testing procedures for media supplements and supplies. In: Uses and standardization of vertebrate cell culture, *In vitro Monogr.* No. 5, edited by Patterson MK Jr, Gaithersburg, M. K. Patterson, Jr. Gaithersburg, MD: Tissue culture Assoc., pp.83-90.
- Kane MJ. 1987. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 37: 775-778.
- Leung PCS, Gronow MJ, Kellwo GN, Lopata A, Speirs AL, McBain JC, du Plessis YP. and Johnston I. 1984. Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development. *Fertil. Steril.* 41:3 6-39.
- Lopata A, Johnston IWH, Hoult IJ and Speirs AI. 1980. Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg. *Fertil. Steril.* 33:117-120.
- Mahadevan MM, Fleetham J, Church RB, and Taylor PJ. 1986. Growth of mouse embryos in bicarbonate media buffered by carbon dioxide, HEPES, or phosphate. *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer* 3:304-308.
- Marrs RP, Saito H, Yee B and Brown J. 1984. Effect of variation of in vitro culture techniques upon oocyte fertilization and embryo development in human in vitro fertilization procedures. *Fertil. Steril.* 41(4):519-523.
- Mather J, Kaczarowski F, Gabler R and Wilkins F. 1986. Effects of water purity and addition of common water contaminants on the growth of cells in serum-free media. *Biotechniques* 4:56-63.
- Miyamoto H, Toyoda Y and Chang MC. 1974. Effect of hydrogen-ion concentration on in vitro fertilization of mouse, golden hamster and rat eggs. *Biol. Reprod.* 10:487-493.
- Nagle DL, Maurer RR and Foote RH. 1969. Effect of osmolarity on in vitro development of rabbit embryos in a chemically defined medium. *Exp. Cell Res.* 58:331-333.
- Naz RK, Janousek JT, Moody T and Stillman RJ. 1986. Factors influencing murine embryo bioassay: effects of proteins, aging of medium and surgical glove coatings. *Fertil. Steril.* 46:914-919.
- Ogawa T, Ono T and Marrs RP. 1987. The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos in vitro. *J. Vitro Fertil. Embryo transfer* 4:153-158.
- Padilla SL, Howe PA and Boldt JP. 1988. Effects of charcoal extracted serum as a growth medium supplement on in vitro development of mouse embryos. *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer* 5(5):286-289.
- Plante L, Bousquet D and Guay P. 1986. Effect of different culture conditions on in vitro bovine embryo development. *Theriogenology* 25:182(abst).
- Pomp D, Critser ES and Rutledge JJ. 1988. Lower sodium lactate in Whitten's medium improves in vitro development capacity of one-cell mouse embryos. *Theriogenology* 29(5):1019-1026.
- Pope CE, Pope VZ and Beck LR. 1982. Development of baboon preimplantation embryos to post-implantation stages in vitro. *Biol. Reprod.* 27:915-923.
- Plante L, Bousquet D and Guay P. 1986. Effect of different culture conditions on in vitro bovine embryo development. *Theriogenology* 25:182, abst.

- Pratt HPM. 1987. Isolation, culture and manipulation of preimplantation mouse embryos. In: Mink M(eds), *Mammalian development: a practical approach*, IRL Press, 13-42.
- Quinn P, Kerin JF and Warnes GM. 1985. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.* 44:493-498.
- Quinn P, Warnes GM, Kerin JF and Kirby C. 1984. Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.* 41:202-209.
- Quinn P, Kerin JF and Warnes GM. 1985. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.* 44:493-498.
- Rexroad CE Jr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology.* 31(1):105-114.
- Rinehart JS, Bavister BD and Gerrity M. 1988. Quality control in the in vitro fertilization laboratory: comparison of bioassay systems for water quality. *J. Vitro Fert. Embryo Transfer.* 5:335-342.
- Saito H, Berger T, Mishell DR Jr and Marrs RP. 1984. The effect of serum fractions on embryo growth. *Fertil. Steril.* 41:761-765.
- Schiewe MC, Schmidt PM, Widt DE and Rall WF. 1990. Quality control measures in an embryo research program. *Theriogenology* 33(1):9-22.
- Schmidt PM, Monfort SL and Wildt DE. 1986. Pregnant mare's serum gonadotropin source influences fertilization and fresh or thawed embryo development, but the effect is genotype specific. *Gamete Res.* 23:11-20.
- Schneider U. 1986. In vitro development and hatching of mouse embryos in protein-free medium. *Theriogenology* 25:196, abstr.
- Seidel GE Jr. Short-term maintenance and culture of embryos. In: Betteridge KJ(ed), *Embryo Transfer in Farm Animals*, Monograph 16, Canada Department of Agriculture, Ottawa, 1977, pp.20-24.
- Silver IA: Some effects of *Escherichia coli* endotoxin on cells in culture. In, *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 62, Edited by Majde JA and Person RJ, New York, AR Liss, 1981, p.86.
- Silverman IH, Cook CL, Sanfilippo JS, Yussman MA, Schultz GS and Hilton FH. 1987. Ham's F10 constituted with tap water supports mouse conceptus development in vitro. *J. Vitro Fert. Embryo Transfer* 4:185.
- Snyman E and Van der Merwe JV. 1986. Endotoxin-polluted medium in a human in vitro fertilization program. *Fertil. Steril.* 46:273-276.
- Sokoloski JE and Wolf DP. Laboratory details in an in vitro fertilization and embryo transfer program. In: Wolf DP and Quigley M(eds), *Human In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, Plenum Publishing Corporation, New York, 1984, pp.275-296.
- Stewart-Savage J and Bavister BD. 1988. Deterioration of stored culture media as monitored by a sperm motility bioassay. *J. Vitro Fert. Embryo Transfer* 5:76-80.
- Taylor WG. 1984. Toxicity and hazards to successful culture: cellular response to damage induced by light, oxygen or heavy metals. In: *Uses and standardization of Vertebrate cell cultures, In vitro Monogr. No. 5*, edited by M. K. Patterson, Jr, Gaithersburg, MD: Tissue Culture Assoc., pp.55-77.
- Uarner DD, Blanchard TL, Meyers PJ and Meyers SA. 1989. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology* 32(4):515-526.
- Waymouth C. 1970. Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells. *In Vitro* 6:109-127.
- Well EF, Loskutoff NM, Reed ML, Nemecek LA, French LL and Kraemer DC, 1988. Reduced embryo viability associated with specific micropore filters used for medium sterilization. *Theriogenology* 29:324(Abstr.)
- Whitten WK. 1971. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Adv. Biosci.* 6:129-141
- Whittingham DG. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil.(Suppl)* 14:7-21.

- Wood C and Kovacs G. 1983. Extracorporeal fertilization. In, Studd J.(eds): "Progress in Obstetrics and Gynecology." Vol. 3. London: Churchil, Livingstone, pp.267-279.
- Xu KP, Hoier R and Greve T. 1988. Dynamic changes of estradiol and progesterone concentration during in vitro oocyte maturation in cattle. Theriogenology 30(2):235-244.
- 김상근. 1988. 가축 수정란이식. 유한사
- 문신용, 신창재, 정구민, 오선경, 방명걸, 장운석. 1989. 생쥐 2-세포 배아에 의한 시험관아기 배양용 태아제대 혈청의 질적 평가에 관한 연구. 대한 불임학회지 16(2): 139-146.
- 정구민. 1990. 소와 생쥐초기 난자의 체외발생능과 초급속동결에 영향을 미치는 생리적, 물리적 요인에 관한 연구. 서울대학교 대학원 박사학위 논문.