

## 사람 및 생쥐 백혈병 억제인자가 소 체외성숙, 체외수정란의 발육에 미치는 효과

양부근·김정익  
강원대학교 축산대학

### Effects of Human or Mouse Leukemia Inhibitory Factors on the Development of Bovine IVM/IVF Embryos

Yang, B. K. and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

#### SUMMARY

The effects of human or mouse leukemia inhibitory factor(hLIF or mLIF) were examined as a means of increasing the development of *in vitro* matured(IVM) and *in vitro* fertilized (IVF) oocytes into morulae or blastocysts. Cell numbers of blastocysts were also counted using Hoechst dye staining. Two- to 8-cell embryos derived from bovine IVM /IVF oocytes were cultured 5 to 6 days in CRI aa with or without mLIF or hLIF. All culture media were contained 3mg /ml bovine serum albumin.

In experiment 1, the proportion of embryos developed to morulae and blastocysts in CRI aa containing 5,000U /ml mLIF(37.8%) was slightly higher than those of CRIaa containing 1, 000U /ml mLIF(34.6%) and 0 U /ml mLIF(27.4%;  $P>0.05$ ). In experiment 2, 0, 1,000 and 5,000 U /ml of hLIF added to CR1aa media yielded 27.6%, 43.0% and 35.5% morulae and blastocysts, respectively( $p>0.05$ ). These were no significant increases in cell number among treatments( $p>0.05$ ). These results were indicating that mLIF or hLIF can increase the proportion of embryos that develop into morulae and blastocysts without and increase in the cell number.

#### I. 서 론

미성숙 난포란을 채취하여 체외에서 성숙, 체외수정하여 생산된 수정란을 체외 발육시켜 이식 가능한 수정란을 다수 확보할 수 있는 기술의 개발은 체내의 수정과정을 규명하는데 유익한 수단이 될 뿐 아니라, 수정란 이식 및 핵이식 등과 같은 발생공학기법을 실용화시킬 수 있어 가축의 개량과 증식에 크게 기여할 것이다.

체외 수정후 생산된 초기배의 체외배양성적에 미치

는 여러 인자들을 규명하여 체외배양 체계를 확립하는 것은 매우 중요하나, 체외배양 체계에 대한 연구결과는 많지 않은 형편이다. 소에 있어서 체외성숙, 체외수정 시킨 수정란을 체외에서 배양할 때 8~16세포 발육 억제현상(Thibault, 1966)이 나타나 이식 가능한 수정란의 다수 확보에 많은 어려움이 있다. 이와 같은 8~16세포기 발육억제 현상을 극복하기 위하여 많은 연구자들은 trophoblastic vesicles(Camous 등, 1984; Rexroad와 Powell, 1988), 난관상피세포(Eyestone과 First, 1989; Ellington 등, 21990), 난구세포(Berg 와 Brem, 1990; Goto 등, 1988), vero

cell(Menezo 등, 1990), buffalo rat liver cells (Voelkel 과 Hu, 1992; Yan 등, 1994), 자궁 섬유아 세포(Voelkel 등, 1985) 및 mouse embryonic fibroblast cell (Takahashi 등, 1993)과 같은 체세포를 이용하여 초기배와 공동배양하여 좋은 결과를 얻고 있다.

최근에는 혈청이 첨가되지 않은 배양액에 성장인자인 Epidermal growth factor(EGF), Platelet-derived growth factor(PDGF), Transforming growth factor  $\alpha$  또는  $\beta$  및 Fibroblast growth factor(FGF)등과 같은 성장인자를 첨가하여 체세포의 공동 배양과 같은 수준이거나, 보다 좋은 체외배양성적을 얻고 있다(Yang 등, 1993; Flood 등, 1993; Thibodeaur 등, 1992; Larson 등, 1992). 그러나 이상과 같은 방법으로도 이식가능한 상질배기 이상의 수정란의 확보율은 극히 저조하다. 초기배의 체외발육성적을 향상시킬 수 있는 인자들에 대한 정보가 부족하므로 이들 인자들을 규명하는 연구가 필요하다.

생쥐에서 처음 분리된 당단백질인 백혈병 억제인자(leukemia inhibitory factor, LIF)가 My myeloid leukemia cell line의 증식을 억제하며 분화를 유지시키고, 또한 생쥐의 embryonic stem cell의 증식을 촉진시키며, 이 인자의 수용체(receptor)가 4세포기 생쥐 수정란에서 발견된 것이 규명되었다(Gough 등, 1998; Williams 등, 1988). 이와 같은 기능을 가지고 있는 LIF의 첨가배양은 초기배수정란의 체외 발육에 유익한 영향을 미쳐 체외발육성적을 증진 시킬 것으로 추측되므로, 본 연구에서는 생쥐와 사람의 백혈병억제 인자를 혈청이 첨가되지 않는 배양액에 첨가, 배양하여 소 체외수정란의 체외발육성적에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 체외성숙 배양

난포란의 체외성숙배양은 Yang 등(1993)의 방법에 의하여 실시하였다. 즉 도축장에서 회수한 난자를 0.1% polyvinylalcohol과 actibiotic-antimycotic액이 함유된 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS-PVA)내에 담아 2시간내에 실험실로 운반하였다. 운반한 난소를 DPBS-PVA로 2회 이상 세척시

킨 후 직경이 2~7mm의 난포로부터 미수정란을 채취한 후 DPBS-PVA와 성숙배양액으로 각각 2회씩 세척시킨 후 난구세포가 2~4층으로 둘러싸인 난포란을 회수하여 2시간 전에 평형시킨 100 $\mu$ l의 소적 배양액내로 옮겨 (15개/drop) 20~24시간 동안 탄산가스 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 39°C)내에서 배양시킨 후 체외수정에 사용하였다. 이때 성숙 배양액으로는 TC-199액(Gibco)에 10% FBS(Gibco), 0.5 $\mu$ g/ml FSH, 5 $\mu$ g/ml LH와 1 $\mu$ g/ml E<sub>2</sub>가 함유된 배양액을 이용하였다.

### 2. 정자의 처리 및 체외수정

정자의 처리 및 체외수정은 Yang 등(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. 정자의 처리는 동결정액을 Brakett와 Oliphant 배양액(Brackett와 Oliphant, 1975; BO 배양액)에 10mM caffeine이 함유된 배양액으로 2회 원심분리(1,500rpm, 10분)하여 정자의 농도가 2.5 $\times 10^6$ 정자/ml가 되도록 하여 정자 부유액을 준비하였다.

체외수정 배양액은 20 $\mu$ g/ml heparin과 20mg/ml Bovine Serum Albumin(BSA; Sigma)가 함유된 BO배양액을 이용하였다. 한편 체외수정은 난포란의 체외성숙배양과 체외수정용 배양액으로 각각 2회 세척시킨 후 50 $\mu$ l의 소적 수정배양액에 10개의 난자를 넣은 후 50 $\mu$ l의 정자 부유액을 넣어 실시하였다. 최종 체외수정 배양액의 농도는 caffeine 5mM, heparin 10 $\mu$ g/ml 및 1.25  $\times 10^5$  정자/ml였다. 수정 6~8시간 후 난자는 체외수정 배양액과 CR1a배양액(Rosenkrans와 First, 1991)으로 각각 2회씩 세척하여 난자 주위에 부착된 정자를 제거한 후 CR1a배양액내로 옮겨 40~44시간 배양을 실시하였다.

### 3. 초기배의 체외배양

CR1a배양액으로 2회 이상 세척된 난자는 CR1a배양액에 3%BSA가 함유된 배양액내에서 40~44시간 배양하여 2~8세포기로 발육된 난자만을 선별하여 체외 배양에 이용하였다. 즉 배양 40~44시간 후에 반복 pipeting으로 난구 세포를 제거한 후 CR1a배양액에 mouse Leukemia Inhibitory Factor 또는 human Leukemia Inhibitory Factor(mLIF or hLIF: Vitorian Institute of Animal Science, Australia)

가 각각 1,000단위와 5,000단위가 함유된 배양액내에서 5~6일간 배양 한 후 초기배의 발육상태를 검토하였다.

#### 4. 배반포 수정란의 세포수 조사

체외수정후 7~8일간 배양하여 얻은 배반포의 세포수를 조사하기 위하여 Pursel 등(1985)의 형광염색방법을 수정완료하여 실시하였다. 즉, 10~15 $\mu$ l의 mounting액(PBS:glycerol=1:1)을 slide glass에 떨어뜨린 후 mounting액내로 수정란을 옮겨놓고 Hoechst 33342용액 10 $\mu$ l을 수정란 위에 떨어뜨린 후 cover glass로 덮고 메니큐어로 봉입한 후 형광현미경(Zeiss, Germany)하에서 세포수를 조사하였다.

#### 5. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 Tukey's hsd test를 실시하여 통계처리를 하였다.

### III. 결 과

CRLaa배양액에 3mg/ml의 BAS가 함유된 배양액에 생쥐 및 사람의 백혈병억제인자를 각각 1,000단위와 5,000단위를 첨가한 배양액내에서 배양한 결과를 얻은 성적은 Table 1과 Table 2와 같다.

Table 1에서 나타난 바와 같이 체외에서 40~44시

간 동안 배양된 2~8세포기 체외수정란의 상실배기까지의 체외발육은 성적은 무첨가구, mLIF 1,000단위 첨가구 및 5,000단위 첨가구에서 각각 11.0%(8/73), 9.0%(7/78) 및 12.2%(9/74)로서 통계적인 유의차는 인정되지 않았다( $P>0.05$ ). 한편 2~8세포기의 체외 수정란의 배반포 이상까지 발육된 체외발육 성적은 16.4%, 25.6% 및 25.7%로서 각 처리구간의 통계적인 유의차는 인정되지 않았으나, 무첨가구에 비하여 mLIF첨가구가 높은 체외발육성적을 나타냈으며, 상실배기 이상 발육한 성적에서도 무첨가구(27.4%)에 비하여 mLIF 1,000단위 첨가구(34.6%)와 5,000단위 첨가구(37.8%)가 높은 체외발육 성적을 나타냈다.

한편 체외 수정란을 hLIF가 첨가된 CR1aa배양액내에 배양한 경우 상실배기 이상 발육된 체외발육성적은 hLIF 1,000단위 첨가구가 43.0%로서 무첨가구 27.6%와 hLIF 5,000단위의 첨가구 35.5%보다 높은 체외발육율을 얻었으나 통계적인 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 Hatched 배반포까지의 성적은 hLIF가 무첨가구에 비하여 유의하게 높은 성적을 나타내 ( $P<0.05$ ), mLIF 첨가구와는 다른 경향을 나타냈다.

2~8세포기의 체외수정란을 체외에서 5~6일동안 배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수를 형광염색으로 확인한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에서 나타난바와 같이 무첨가구, mLIF

**Table 1. Effects of mLIF on development of bovine IVM/IVF embryos in CRLaa with BSA**

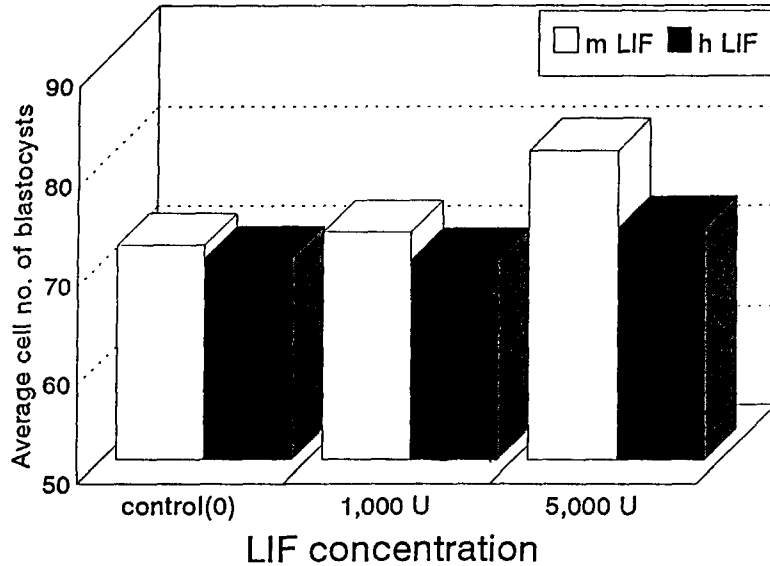
Concentration mouse LIF(U)	No. of embryos	No. of embryos developed to;				Morula plus blastocyst(%)
		2-8 cell	Morula	Blastocyst	Hatched	
0	73	53	8	11	1	20 <sup>a</sup> (27.4)
1000	78	51	7	19	1	27 <sup>a</sup> (34.6)
5000	74	46	9	17	2	28 <sup>a</sup> (37.8)

Values with in columns with same superscripts are not different,  $P>0.05$

**Table 2. Effects of hLIF on development of bovine IVM/IVF embryos in CRLaa with BSA**

Concentration mouse LIF(U)	No. of embryos	No. of embryos developed to;				Morula plus blastocyst(%)
		2-8 cell	Morula	Blastocyst	Hatched	
0	76	55	9	11	1	21 <sup>a</sup> (27.6)
1000	79	45	8	23	3	34 <sup>a</sup> (43.0)
5000	76	49	6	17	4	27 <sup>a</sup> (35.5)

Values with in columns with same superscripts are not different,  $P>0.05$



**Fig. 1. Average cell no. of blastocysts developed to bovine IVM/IVF embryos in CR1aa with or without hLIF and mLIF.**

1,000단위 및 5,000단위 첨가구의 배반포기 수정란의 세포수는 각각  $71.7 \pm 4.9$ ,  $73.0 \pm 4.4$ , 및  $81.2 \pm 4.8$ 로서 mLIF 5,000단위 첨가구가 무첨가구와 mLIF 1,000단위 첨가구보다 다소 많은 세포수를 나타냈으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다. (P. 0.05)

hLIF 첨가의 경우에도 hLIF 5,000단위 첨가구 ( $73.4 \pm 5.9$ )가 hLIF 1,000단위 첨가구 ( $70.2 \pm 3.8$ )와 무첨가구 ( $70.4 \pm 4.2$ )보다 다소 많은 세포수를 나타내 mLIF 첨가구와 비슷한 경향을 나타냈다.

#### IV. 고 찰

본 연구의 결과는 소의 미성숙난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 혈청이 함유되지 않은 배양액에 생쥐와 사람의 백혈병 억제인자를 첨가하여 배양할 경우 체외수정란의 체외배양에 어떠한 영향을 미치는가를 검토하였다.

일반적으로 체외에서 성숙, 수정된 체외수정란은 수란축에 이식되거나, 동결보존하기 전 체외에서 일정기간 동안 배양 또는 보존되어 이식 가능한 수정란으로 유지되어야 하는데 이 기간 동안 체외배양할 경우 많은

연구자들은 배양액에 혈청을 첨가하여 배양하였는데, 이때 첨가되는 혈청의 종류와 등급에 따라 체외발육에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Zheng와 Sirard, 1992; Mckiernan와 Bavister, 1992) 또한 사람의 체외 수정란의 체외 배양시 혈청의 첨가가 초기배의 체외 발육에 유해하다는 보고 (Menezes 등, 1984)가 있어, 혈청이 함유되지 않은 체외 배양 체계의 확립이 필요하다. 한편 수정란의 체외 배양시 체외 발육을 증가시키기 위하여 배양액에 여러 종류의 energy source 인 pyruvate, lactate 및 glucose 등과 같은 단백질원이 이용되어 왔고 (Bavister 등, 1992), 최근에는 혈청이 함유되지 않은 배양액에 여러 가지 체외수정란의 체외 발육을 증진시키는 인자, 즉 growth factor의 첨가배양, 배양액내에서 발생하는 superoxide radical을 제거하기 위하여 antioxidants의 첨가 배양과 온도 및 gas분압 (Li 등, 1993, Tompson 등, 1991 Yang 등, 1994) 체세포 (Fukui 등, 1991)와 공동배양 또는 체세포와 공동배양액에 일정량의 growth factor의 첨가배양 (Yang 등, 1994) 등이 검토되어 좋은 결과를 얻고 있다.

Fry 등 (1992)은 배양액에 체외발육을 증가시키

기 위하여 당단백질인 사람 백혈병억제인자 1,000단위/ml을 배양액에 첨가하여 양의 상실배 또는 배반포기 수정란을 배양할 경우 hatched 배반포의 비율이 증가하고 퇴행란의 비율이 감소하는 것을 보고하여 백혈병억제인자가 수정란의 체외발육을 촉진시킨다는 것을 암시했다.

본 연구에서는 체외에서 성숙, 수정시킨 소의 체외 수정란을 체외에서 배양할 때 혈청이 함유되지 않은 CR1aa 배양액에 생쥐 백혈병 억제인자 1,000단위와 5,000단위를 각각 첨가 배양하였을 때 상실배이상 발육된 성적인 34.6%와 37.8%의 성적을 얻어 그다지 높지 않은 성적을 얻었으나, Yang 등(1993)이 CR-1aa배양액에 체외발육 증진인자인 EGF(10ng/ml)을 첨가하여 배양하였을 때 23%의 체외 발육성적보다는 다소 높은 결과를 얻었다. 또한 사람의 백혈병 억제인자 1,000단위와 5,000단위를 각각 첨가하여 체외성숙, 수정란을 5~6일간 배양하였을 때 상실배이상 발육된 성적이 각각 43.0%와 35.5%로서 무첨가구의 27.6%보다 높은 성적을 얻어 생쥐 백혈병 억제인자의 첨가, 배양과 비슷한 경향을 나타냈다.

이상의 결과는 Fry 등(1992)이 사람 백혈병 억제인자를 배양액에 첨가하여 양의 배반포수 정란을 배양한 결과 hatched 배반포로 발육된 비율이 약 4배 정도 증가하였다는 결과와 Robertson 등(1990)이 사람 백혈병 억제인자가 첨가된 배양액내에서 8세포기 생쥐 수정란을 배양하였을 때 높은 체외 발육율을 얻은 결과와도 일치하는 경향을 보였다. 한편 Fry 등(1992)은 양의 수정란을 생쥐의 백혈병 억제인자를 첨가한 배양액내에서 배양할 경우 유의한 효과가 없었다고 보고하였는데 그 이유는 양의 백혈병 억제인자와 생쥐 백혈병 억제인자간의 homology 정도의 차이에 기인한다고 지적하였다.

본 실험의 결과는 생쥐 또는 사람 백혈병 억제인자가 소의 체외수정란의 체외발육을 촉진시키는 인자라는 것을 시사해 줄 뿐 아니라, 소의 백혈병 억제인자와 사람 및 생쥐 백혈병 억제인자간에는 소의 수정란의 체외 발육을 억제시킬 만큼 homology의 차이가 크지 않음을 간접적으로 나타나는 것으로 사료된다.

일반적으로 체외에서 성숙, 수정시킨 후 체외에서 배반포까지 발육시켜 얻은 수정란을 체내에서 회수된 배반포의 수정란보다 세포수가 적어 이식후 착상과 임

신율에 유해한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

본 실험의 경우 생쥐 및 사람 백혈병 억제인자를 각각 1,000단위와 5,000단위를 첨가하여 배양할 경우 배반포의 세포수에서는 생쥐와 사람의 백혈병 억제인자 5,000단위를 첨가하였을 때 각각 81.2과 73.4로서 다른 처리구보다 다소 높은 경향을 보였으나 커다란 차이는 인정되지 않았다. 이상의 결과는 Yang 등 (1993)이 EGF, TGF $\beta$  및 PDGF를 첨가하였을 때 배반포의 세포수에는 커다란 차이가 나타나지 않은 결과와 일치하는 경향을 보였다.

본 실험의 결과를 요약하여 볼 때 혈청이 첨가되지 않은 semi-simple media인 CR1aa에 생쥐 또는 사람 백혈병 억제인자의 첨가 배양이 소 체외성숙, 수정란의 체외 배양율을 증가시킬 수 있는 효과적인 첨가제로 이용이 가능하나 체외발육 후 생산된 배반포의 세포수에는 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 앞으로 체외 성숙, 체외수정란의 체외 배양시 첨가되는 단백질원에 대한 체계적인 연구와 체외 발육후 생산된 배반포 수정란의 세포수를 증가시킬 수 있는 배양체계의 확립에 대한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

## V. 적 요

본 연구는 소의 체외수정시킨 수정란의 체외배양 성적을 향상시키기 위한 실험으로써, 체외 수정후 40~44시간에 얻은 2~8 세포기의 체외수정란을 혈청이 첨가되지 않은 배양액인 CR1aa 배양액에 사람과 생쥐 백혈병억제인자(mLIF, hLIF)를 첨가하여 배양하였을 때 상실배 이상 발육된 체외수정란의 세포수를 검토하고자 실시하였다. 체외 수정 후 체외에서 40~44시간 배양하여 얻은 2~8세포기 체외수정란을 CR-1aa 배양액에 각각 1,000단위와 5,000단위의 hLIF 또는 mLIF를 첨가하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub>와 고습도의 조건 하에서 5~6일간 배양하여 얻은 체외수정란의 체외 발육성과 체외배양 후 얻은 배반포수정란의 세포수를 조사한 결과는 다음과 같다. CR1aa 배양액에 1,000단위와 5,000단위의 mLIF를 첨가하여 배양하였을 때 상실배기 이상으로 발육된 수정란의 체외발육율은 34.6%(27/78)와 37.8%(28/74)로서 무첨가구의 27.4%(24/76)보다 높은 성적을 얻었다. 한편 CR1aa배

양액에 무첨가, 1,000단위 및 5,000단위의 hLIF를 첨가하여 배양한 경우 상실배기 이상 발육된 체외 발육율은 27.6%(21/76), 43.0%(34/79)와 35.5%(24/76)의 성적을 얻어 1,000단위의 hLIF첨가구가 여타구 성적보다 높은 결과를 나타냈다. 그러나 체외에서 배반포로 발육된 수정란의 세포수를 조사한 결과 무첨가구, mLIF 및 hLIF 첨가구 간에는 유의차가 인정되지 않았다( $P>0.05$ ). 이상의 연구로 볼 때 혈청을 첨가하지 않은 배양액(CR1aa)에 mLIF 와 hLIF을 첨가하여 체외수정란을 체외배양 할 경우 체외발육율을 증가시키는 경향을 보였으나 배반포의 세포수에는 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

## VI. 인용문헌

1. Bavister, B. D., T. A. Rose-Hellekant and T. Pinyopummintr. 1992. development of *in vitro* matured /*in vitro* fertilized bovin embryos into morulae and blascysts in defined culture media. *theriogenology* 37:127-146.
2. Berg, U. and G. Brem. 1990. Developmental rates of *in vitro* produced IVM-IVF bovine oocytes in different cell co-culture systems. *Theriogenology* 33:195 abstr.
3. Brackett, B. G. and G. Olipaant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Repord.* 12:260-274.
4. Camous, S., Y. Heymen and Y. Menezo. 1984. *In vitro* culture of early bovine embryos with trophoblastic vesicle; cleavage through the block stage, follorwed by pregnancy after transfer. *Theriogenology*, 21(abstr. 226)
5. Ellington, J.E., P.B. Farrell, M.E. Simkin, R.H. Foote, E.E. Goldman and A.B. McGrath. 1990. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to moulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with oviduct epithelial cells. *J. reprod. Fertil.* 89:293-299.
6. Eystone, W.H. and N.L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* 85:715-720.
7. Flood, M.E., T.L. Gage and T.D. Bunch. 1993. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo developemt on vitro. *Theriogenolgy* 39:823-833.
8. Fry, R.C., P.A. Batt, Fairclough and R. A. Parr. 1992. Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultures bovine embryos. *Biol. Reprod.* 46:470-474.
9. Fukui, Y., L. T. Mcgowan R. W. James, P. A. Pugh and H. R. Tervit 1991. Factors affecting the *in vitro* development to balstocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 92:125-131.
10. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koda, Y. Nakanishi and k. Ogawa. 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.
11. Gough, N. H., Gearing, D. P., K. A. King, T. A. Wilson, D. J. Hilton, N. A. Nicola and D. Metcalf. 1988 / Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding for myeloid leukemia-inhibitory factor. *Proc. Nalt. Acad. Sci.* 85:2623-2627.
12. Larson, R.C., G.G. Ignotz and W. B. Currie. 1992. Transforming growth factor  $\beta$  and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 33:432-435.
13. Li, J., R. H. Foote and M. Simkin. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.* 48:33-

- 37.
14. Mckiernan, S. H. and B. D. Bavister. 1992. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate *in vitro* development of hamster embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 28A:154-156.
  15. Menezo, Y., J. F. Guerin and J. C. Czyba. 1990. Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of vero cells. *Biol. Reprod.* 42:301-306.
  16. Menozo, Y., J. Testart and D. Perrone. 1984. Serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture and transfer. *Fertil. Steril.* 42:750-755.
  17. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24:687-691.
  18. Rexroad, C. E. and A. M. Powell. 1988. Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 29:387-397.
  19. Robertson, S. A., T. C. Lavranos and R. F. Seamark. 1990. *In vitro* models of the maternal fetal interface. In : Wegmann, T. G., Nisbett-Brown and T. J. Gill(eds) the molecular and cellular immunology of the maternal-fetal interface. 111:191-206.
  20. Rosenkrans, C. F., Jr. and N. L. First. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage:Effect of amino acids and vitamins. *Theriogenology* 35:266 abstr.
  21. Takahashi, S., T. Tokunage and H. Imai. 1994. Co-culture system using mouse embryonic fibroblast cells for *in vitro* fertilized and nuclear transplanted bovine embryos. *Theriogenology* 41:311.
  22. Thibodeaux, J. K., R. P. Vecchio and W. Hansel. 1993. Role of Platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *J. Reprod. fert.* 98:61-66.
  23. Tompson, J. G. E., A. C. Simpson. P. A. Pugh, P. E. Donnelly and H. R. Tervit. 1990. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.* 89:573-578.
  24. Voelkel, S. A., G. F. Amborski, K. G. Hill and R. A. Godke. 1985. Use of a uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. *Theriogenology* 24:271-281.
  25. Voelkel, S. A. and Y. X. Hu. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 37:1117-1131.
  26. Willams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Wilson, C. L. Stewart, D. P. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola and N. M. Gough. 1988. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684-687.
  27. Yang, B. K., J. R. Giles., X. Yang and R. H. Foote. 1994. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine oocytes in a simple defined(KSOM) medium. *Theriogenology* submitted.
  28. Yang, B. K., X. Yang and R. H. Foote. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 40:521-530.
  29. Zheng, Y. S. and M. A. Sirard. 1992. The effect of sera and bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 37:779-790.