

난구세포, Glucose, SOD 첨가가 소 수정란의 체외발생에 미치는 영향에 관한 연구

김 상 근 · 이 종 진
충남대학교 수의과대학

Effects of Cumulus Cells, Glucose and SOD Levels During the *In Vitro* Culture in Medium on *In Vitro* Developmental Rates of Bovine Oocytes

S. K. Kim and J. J. Lee

College of Vet. Med., Chungnam National Univ.

SUMMARY

The study was conducted to determine the optimal cumulus cells, glucose and superoxide dimutase(SOD) levels during the *in vitro* culture of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* for morulae and blastocyst development. Oocytes were cultured for 0~8 days in TCM-199 medium supplemented with 20% FCS, cumulus cells and with differrent glucose and SOD levels.

The results are summarized as follows;

1. The *in vitro* developmental rates of bovine oocytes cultured in TCM-199 medium containing cumulus cells and 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mM glucose levels 0~3 and 0~8 days after insemination were 21.1, 25.0, 23.3, 17.9 and 26.3, 25.7, 23.1, 19.4% respectively and there was significant differences on the development to the molurae and blastocysts stage among the cumulus cells and glucose levels.
2. The *in vitro* developmental rates of bovine oocytes cultured in TCM-199 medium containing 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mM glucose levels 0~3 and 0~8 days after insemination were 11.3~24.5% and 17.3~25.0%, respectively.
3. The *in vitro* developmental rates bovine oocytes cultured in TCM-199 medium containing 100, 200, 300, 500 μg /ml SOD levels 0~3 and 0~8 days after insemination were 12.5~22.9% and 12.9~22.2%, respectively. Hight levels of SOD(500 μg /ml) significantly reduced the rates of molurae and blastocysts stage($P < 0.05$).

(Key word : cumulus cell, glucose, SOD, *in vitro* developmental rates)

I. 서 론

최근에는 수정란의 체외배양 기법이 진보되어 배반포의 발생율이 점차 향상되고 있으나 체내수정란에 비

하면 배반포기의 발생율과 이식 후의 수태율은 아직도 저조하여 이의 개선이 시급한 실정이다.

Rose와 Bavister(1992) 및 Tiffin 등(1991)은 glucose대사는 소 수정란의 2 cell로부터 배반포기에 현저히 증가된다고 하였으며, Javed와 Wright

(1991)는 16세포기까지는 glucose 이용율이 낮지만 상실배에서는 급격히 상승하고 배반포, 확장배반포 및 hatching 배반포에서는 glucose 이용율이 높다고 보고하였다. Gardner와 Leese(1990)는 소 수정란의 난구세포는 glucose를 소비하여 pyruvic acid를 생산한다고 보고하였으며, Lu 등(1988), Goto 등(1988) 및 Fukuda 등(1990)은 소난포란을 이용하여 난관상피세포와 공배양에 의해 상실배 또는 배반포를 성공적으로 생산했다고 하였으며, Takahashi와 First(1992)는 TCM-199 배양액에 함유되어 있는 5.56mM의 glucose 농도는 초기배의 발생을 저해한다고 보고하였다. 수정란은 배양에서 glucose 등의 에너지를 취한 후 胚의 사립체에서 전자전달계의 산소분자가 증가하고 결과적으로 free radical인 super oxide (O_2)가 산생된다. 방출된 O_2 는 세포내의 방이기구에 의해 과산화수소로 변환되지만 그 때의 불균화산소로서 SOD가 작용하여 특히 과산화수소를 불과 산소로 변환시키는 효소로서 생체내에서는 glutathione, peroxidase(GPX), catalase 등이 작용한다. 그러나 세포내의 과산화수소는 금속과 결합함에 따라서 급속히 penton 반응을 일으키고 hydroxyl radical 반응성은 극히 높아 지질의 과산화를 일으키고, 단백질합성 저해, 세포막 파괴 등의 강한 세포장해를 일으킨다(Puglia와 Powell, 1984).

대부분의 연구자들이 사용한 배양액은 3~5 mM 농도의 glucose수준과 1.5mM만의 SOFM(synthetic oviduct fluid medium)으로 배양한 성적이었다(Flood와 Wiebold, 1988; Seshagiri와 Bavister, 1989). 그러나 glucose의 첨가는 배반포의 발생을 증가(Betterbed와 Wright, 1985) 또는 억제(Seshagiri와 Bavister, 1989; Schini와 Bavister, 1988; Ellington 등, 1990) 한다고 보고하였다. 한편 소 수정란의 8세포기 이후는 glucose가 요구되며 다른 여러 종의 포유동물에서 발생단계의 존성을 나타냈다고 보고하였다(Flood와 Wiebold, 1988; Seshagiri와 Bavister, 1989; Thompson 등, 1989).

이에 본 연구는 소 수정란의 체외수정과 체외발생에 미치는 영향을 구명하기 위하여 배양액에 적정 난구세포, SOD 및 glucose 첨가수준을 구명하고자 본 시험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 난포란의 회수

도살자우로부터 난소를 적출하여 100 IU/ml의 penicillin G와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮겨 주사기로 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실체현미경(20×)하에서 형태적으로 우수한 난포란을 선별하여 회수하였다.

2) 배양액

TCM-199(Whittaker, M.A. Bioproducts Co., USA)를 기본 배양액으로 하여 배양액에 20%(v/v)의 FCS(Sigma Co., USA)와 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate(Sigma Co, USA)를 첨가하여 이용하였다.

직경 5~10 mm의 난포를 적출하여 난포 주변의 간질조직을 제거한 후 난구세포를 회수하여 500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 10% FCS(v/v)+TCM-199액 2~3 ml를 첨가하여 2회에 걸쳐 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 회수한 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 의 난구세포와, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0mM의 glucose, 100, 200, 300, 500 μ g/ml의 SOD를 배양액에 첨가하여 수정 0~3일 및 4~8일간 배양하였다.

2. 방 법

1) 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 난구세포가 충실하게 부착된 난포란을 45 μ l의 배양액 소적당 5개를 주입한 후 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 20~24시간 동안 38℃, 100% 습도, 95% air, 5% CO_2 로 조정된 CO_2 배양기(Sanyo Co., Japan)내에서 배양하였다.

2) 체외수정

성숙배양한 난포란을 45 μ l의 배양액 소적에 5개씩 주입 후, BO액 1 ml에 용해한 정액 0.2 ml를 시험관

내에서 혼합하여 배양기에서 swim-up시킨 다음, 약 0.5 ml의 상층액을 1,500 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 정자 pellets을 동량의 heparin 용액과 함께 혼합하여 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유기시킨 정자부유액 2 μ l(1~5 \times 10⁶ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 다음 38 $^{\circ}$ C의 CO₂ 배양기에서 5~7시간 매정에 의해 수정시켰다.

3) 수정 및 생존성의 판정

수정의 판정은 배양액으로 배양하면서 상실배 또는 배반포로의 발생상태를 관찰하거나, Shea 등(1976)과 Ball 등(1984)의 방법을 병행하여 실시하였으며, 생존성의 판정은 Schilling 등(1982)의 FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 형광 현미경하에서 생존 score를 산정하거나 배양을 통해 발생상태를 관찰하면서 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 난구세포와 glucose의 첨가에 따른 체외발생율

1) 수정 0~3일째의 체외발생율

수정 0~3일째에 난구세포와 각 수준의 glucose를 첨가한 TCM-199 배양액에서 배양하였을 때 소 수정란의 체외발생율은 Table 1과 같다.

수정일로부터 3일에 걸쳐 배양액내 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 21.1, 25.0, 23.3, 17.9%로서 glucose를 첨가하지 않은 대조군보다 군에서 가장 높은 체외발생율

을 나타냈다. 한편, 체외배양시 난구세포와 0.5mM glucose를 배양액에 첨가한 군에서 가장 높은 체외발생율을 나타냈다.

이러한 결과는 Konishi 등(1994)이 소 수정란을 이용하여 CR1a에 2% 자우혈청을 첨가한 기초배양액에 난구세포와 0.1mM의 glucose를 첨가하여 0~8일간 배양하였을 때 3일째부터 첨가한 구에서 높은 체외발생율을 나타냈으며, 매정 후 7일에 상실배 및 배반포로의 체외발생율은 각각 30.0, 24.6%를 나타냈다는 보고와 비교할 때 유사한 성적이었다. 한편, Rosenkrans 등(1993)은 배양에 있어서 5.5mM의 glucose를 배지에 첨가하면 배반포로의 발생은 인정되지 않았다고 하였는데, 이는 난구세포가 glucose를 소비하여 초기배의 발생에 유리한 pyruvic acid가 산생되어 glucose의 초기배의 발생저해 작용이 경감되지만 높은 glucose 농도는 그 영향이 남아서 배반포의 발생율이 낮은 것으로 추찰된다.

2) 수정 4~8일째의 체외발생율

수정 4~8일째에 난구세포와 glucose를 첨가한 TCM-199 배양하였을 때 소 수정란의 체외발생율은 Table 2와 같다.

수정 4일로부터 8일에 배양액내 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 26.3, 25.7, 23.1, 19.4%로서 대조군에 비해 약간 높은 체외발생율을 나타냈다.

이러한 결과는 Konishi 등(1994)이 소 수정란을 이용하여 CR1a에 2% 자우혈청을 첨가한 기초배양액에 난구세포와 0.1mM에 glucose를 첨가하여 0~8일

Table 1. Effects of cumulus cells and glucose in TCM-199 (days 0 to 3) medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes

Supplements of CU & glucose(mM)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of morulae & blastocyst
Cont.	35	27(77.1)	6(17.1)
0.1	38	29(76.3)	8(21.1)
0.5	40	30(75.0)	10(25.0) ^a
1.0	43	33(76.7)	10(23.3) ^a
5.0	39	29(74.4)	7(17.9) ^b

CU : Cumulus cells

^{a, b} P<0.05

Table 2. Effects of cumulus cells and glucose in TCM-199 (days 4 to 8) medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes

Supplements of CU + glucose(mM)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of morulae & blastocyst
Cont.	35	27(77.1)	6(17.1)
0.1	38	30(78.9)	10(26.3) ^a
0.5	35	27(77.1)	9(25.7) ^a
1.0	39	29(74.4)	9(23.1)
5.0	36	27(75.0)	7(19.4) ^b

CU : Cumulus cells

^{a, b} : P<0.05

간 배양하였을 때 3일째부터 첨가한 구에서 높은 체외 발생율을 나타냈다는 보고와 유사한 성적이었다. 한편 이들은 확장배반포로의 발생율은 glucose를 매정후 3일째부터 첨가한 구와 수정일로부터 계속해서 첨가한 구가 무첨가구나 매정 3일까지 첨가한 구에 비해 유의적으로 높은 결과를 나타냈다고 보고하였다.

2. Glucose첨가에 따른 체외발생율

1) 수정 0~3일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 0~3일째에 각 수준의 glucose를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 소 수정란의 체외발생율은 Table 3과 같다.

수정일로부터 3일에 배양액내 0.05, 0.1, 0.3mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 19.2, 20.0, 24.5%였으며, 0.5, 1.0, 3.0mM의 glucose를 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 21.2, 20.0, 11.3%로서 glucose를 첨가하지 않은

대조군에 비해 높은 체외발생율을 나타냈으나 유의한 차이는 인정되지 않았다. 한편, 0.3mM의 glucose 첨가가 다른 glucose 농도의 첨가보다 높은 체외발생율을 나타냈다.

이러한 결과는 Matsuyama 등(1993)의 소 난포란을 이용하여 SOFM 배양액에 0.188mM의 glucose를 배양일로부터 3일에 첨가하였을 때, 가장 높은 분할율과 배반포로의 발생율을 나타냈다는 보고와 유사한 성적이었다. 한편 Javed와 Wright(1991)는 소 배에서 16세포기까지는 배의 glucose 이용율은 낮지만 상실 배에서는 급격히 상승하고, 배반포, 확장배반포 및 hatching 배반포에서 glucose 농도는 초기배의 발생을 저해한다고 보고하였다.

2) 수정 4~8일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 4~8일째의 각 수준의 glucose를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 소 수정란의 체외발생율은 Table 4와 같다.

Table 3. Effects of glucose levels in TCM-199 medium (days 0 to 3) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes

Concentration of glucose (mM)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of morulae & blastocyst
Cont.	50	37(74.0)	7(14.0)
0.05	52	39(75.0)	10(19.2)
0.1	55	42(76.4)	11(20.0)
0.3	53	41(77.4)	13(24.5)
0.5	52	40(76.9)	11(21.2)
1.0	50	38(76.0)	10(20.0)
3.0	53	40(75.5)	6(11.3)

Table 4. Effects of glucose levels in TCM-199 medium (days 4 to 8) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes

Concentration of glucose (mM)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of morulae & blastocyst
Cont.	50	37(74.0)	7(14.0)
0.05	54	40(74.1)	12(22.2)
0.10	56	44(78.6)	13(23.2)
0.30	52	41(78.8)	13(25.0)
0.50	57	44(77.2)	13(22.8)
1.00	53	40(75.5)	11(20.8)
3.00	52	41(78.8)	9(17.3)

수정 4일로부터 8일에 0.05, 0.1, 0.3mM의 glucose를 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 22.2, 23.2, 25.0%였다. 또한, 0.5, 1.0, 3.0mM의 glucose를 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 각각 22.8, 20.8, 17.3%로서 glucose를 첨가하지 않은 군에 비해 다소 높은 체외발생율을 나타냈으나 유의한 차이는 인정되지 않았다. 한편, 0.3mM의 glucose 첨가가 다른 glucose 농도의 첨가보다 높은 상실배 및 배반포로의 발생율을 나타냈다.

이러한 결과는 Matsuyama 등(1993)의 소 난포란을 이용하여 SOFM 배양액에 0.188mM의 glucose를 배양일로부터 3일에 첨가하였을 때 가장 높은 분할율과 배반포로의 발생율을 나타냈다는 보고와 비교할 때 차이가 있었다.

3. SOD첨가에 따른 체외발생율

1) 수정 0~3일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 0~3일째의 각 수준의 SOD를 첨가한 TCM-

199 배양액에서 배양하였을 때 소 수정란의 체외발생율은 Table 5와 같다.

수정일로부터 3일에 100, 200, 300, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 SOD를 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 21.9, 22.9, 15.2, 12.5%로서 유의한 배 발생의 촉진효과는 인정되지 않았으며, 고농도의 SOD첨가는 유의한 감소를 나타내어 배 발생이 저해되는 경향이였다. 이러한 결과는 McCord와 Fridovich (1969)에 의해 SOD가 발견된 후 Umaoka 등(1992)이 마우스 배 발생을 유의하게 촉진시킨다는 보고와 비교할 때 상이하지만 이는 동물종간의 차이로 판단되며, 아울러 과잉의 SOD는 발생과정 중 catalase가 H_2O_2 를 처리하지 못해 배발생을 저해하는 것으로 판단된다.

2) 수정 4~8일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 4~8일째에 각 수준의 SOD를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 소 수정란의 체외발생율은 Table 6과 같다.

Table 5. Effects of SOD levels in TCM-199 medium (days 0 to 3) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes

Concentration of SOD ($\mu\text{g/ml}$)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of morulae & blastocyst
Cont.	30	20(73.3)	5(16.7)
100	32	24(75.0)	7(21.9)
200	35	27(77.1)	8(22.9) ^a
300	33	24(72.7)	5(15.2) ^b
500	32	22(68.8)	4(12.5) ^b

^{a, b} : $P < 0.05$

Table 6. Effects of SOD levels in TCM-199 medium (days 4 to 8) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes

Concentration of SOD ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of morulae & blastocyst
Cont.	30	20(73.3)	5(16.7)
100	34	24(73.5)	7(20.6)
200	36	25(69.4)	9(22.2) ^a
300	32	21(65.6)	6(18.8)
500	31	20(64.5)	4(12.9) ^b

^{a, b} : $P < 0.05$

수정 4일로부터 8일에 100, 200, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SOD를 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 20.6, 22.2, 18.8, 12.9%로서 SOD를 첨가하지 않은 군에 비해 다소 높은 체외발생율을 나타냈으나 유의한 배발생의 촉진효과는 인정되지 않았으며, 고농도의 SOD첨가는 유의한 감소를 나타내어 배발생이 저해되는 경향이였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 수정 0~3일째의 SOD를 첨가하여 배양하였을 때의 체외발생율과 유사한 경향으로서 유의한 배발생 촉진효과는 인정되지 않았다. SOD에 의해 배분활율이 향상되는 것은 catalase와 함께 효소적으로 작용하여 cell block현상을 제거한다고 보고하고 있다(Matsuyama와 Fukui, 1994).

IV. 적 요

본 연구는 소 수정란의 체외수정과 체외발생에 미치는 영향을 구명하기 위하여 20% FCS + TCM-199 배양액에 난구세포와 각 수준의 glucose와 SOD를 첨가하여 배양하였을 때 체외수정율 및 체외발생율을 조사하였다.

1. 수정 0~3일 및 4~8일에 TCM-199 배양액에 난구세포와 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mM의 glucose를 첨가하여 소 수정란을 배양하였을 때 체외발생율은 각각 21.1, 25.0, 23.3, 17.9 및 26.3, 25.7, 23.1, 19.4%로서 대조군에 높은 체외발생율을 나타냈다 ($P < 0.05$).
2. 수정 0~3일 및 4~8일에 TCM-199 배양액에 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 mM의 glucose를 첨가하여 소 수정란을 배양하였을 때 체외발생율은

각각 11.3~24.5% 및 17.3~25.0%였다.

3. 수정 0~3일 및 4~8일에 TCM-199 배양액에 100, 200, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SOD를 첨가하여 소 수정란을 배양하였을 때 체외발생율은 각각 12.5~22.9% 및 12.9~22.2%로서 고농도의 SOD첨가는 유의한 체외발생율의 감소를 나타냈다 ($P < 0.05$).

V. 인용문헌

1. Ball, G. D., M. L. Leibfried, R. L. Ax and N. L. First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. J. Dairy Sci., 67: 2775-2785.
2. Betterbed, B. and R. W. Jr. Wright. 1985. Development of one cell ovine embryos in two culture media under two gas atmosphere. Theriogenology, 23:547-553.
3. Ellington, J. E., E. W. Carney, P. B. Farrell, M. E. Simkin and R. H. Footh. 1990. Bovine 1~2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct systems. Biol. Reprod., 43:97-104.
4. Flood, M. R. and J. R. Wiebold. 1988. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. J. Reprod. Fert., 84:7-12.
5. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 244: 6049-6055.
6. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y.

- Toyoda, 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured fertilized and cultured with cumulus cell *in vitro* on to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42: 114-119.
7. Gardner, D. K. and H. J. Leese. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 88:361-368.
 8. Goto, Y., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, 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. Fert.*, 83:753-758.
 9. Javed, M. H. and R. W. Wright. 1991. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology*, 35:1029-1037.
 10. Konishi, M., H. Itakura and Y. Aoyagi. 1994. Effect of glucose in CR1aa on the development into blastocyst of *in vitro* fertilized bovine oocytes co-cultured with cumulus cells. *J. Reprod. and Develop.*, 40(6):59-64.
 11. Lu, K. H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.*, 122:539-540.
 12. Matsuyama, K. and Y. Fukui. 1994. Effects of oxygen concentration and free-radical scavengers on the *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Japanese Reprod. Develop.*, 40(6):73-79.
 13. Matsuyama, K., H. Miyakoshi and Y. Fukui. 1993. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 40:595-605.
 14. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. *J. Reprod. Chem*, 244: 6049-6055.
 15. Puglia, C. D. and S. R. Powell. 1984. Inhibition of cellular antioxidants: A possible mechanism of toxic cell injury. *Environ. Health Perspect.*, 57:307-311.
 16. Rose, T. A. and B. D. Bavister. 1992. Effect of oocyte maturation on *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod.*, 31:71-77.
 17. Rosenkrans, C. F., G. O. Zeng, G. T. Mcnamara, P. K. Schoff and N. L. First. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.*, 49:459-462.
 18. Schilling, E., H. Niemann and D. Schmidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15:245-248.
 19. Schini, S. A. and B. D. Bavister. 1988. Two cell block to development of cultured hamster embryos in caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.*, 39:1183-1192.
 20. Seshagiri, P. B. and B. D. Bavister. 1989. Glucose inhibits development of hamster 8 cell embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 40: 599-616.
 21. Shea, B. F., J. P. A. Latour, K. N. Berdin and R. D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. *J. Anim. Sci.*, 43:809-815.
 - the Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37:963-978.
 22. Takahashi, Y. and N. L. First. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37:963-978.
 23. Thompson, J. G. E., G. A. Pardon, G. W. Cruickshank, J. F. Smith and R. G. Wales,

1989. Development of sheep preimplantation embryos in media supplemented with glucose and acetate. *Theriogenology*, 25:591-600.
24. Tiffin, G. J., K. J. Betteridge, B. R. Yadav and W. A. King. 1991. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in reaction to sex and stage of development. *J. Reprod. Fert.*, 93:125-132.
25. 김상근, 이봉구. 1994. 돼지 수정란의 체외수정 및 발생에 미치는 호르몬 및 glucose 첨가에 영향에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 9(3):235-241.