

β -Mercaptoethanol 첨가에 의한 소 초기배의 체외발생 효과[†]

이홍준 · 서승운 · 이광희* · 김기동 · 이상호 · 송해범**

고려대학교 생명공학원

Effects of β -Mercaptoethanol Addition on Early Bovine Embryo during *In Vitro* Development

Lee, H. J., S. W. Seo, K. H. Lee*, K. D. Kim, S. H. Lee and H. B. Song**

Graduate School of Biotechnology, Korea Univ., Seoul 136-701

SUMMARY

Arrest in embryo development during *in vitro* culture has been reported in various mammals. Although some causes of the arrest have been suggested, little is known of the way that can overcome the arrest using *in vitro* culture system. The antioxidant, β -mercaptoethanol(β -ME), has been shown to play an important role in embryo development. This study was designed to examine the effect of β -ME on the developing bovine embryos produced *in vitro* by IVM and IVF. To select appropriate concentration of β -ME during whole culture period (7 days), various concentrations (10, 50 and 100 μ M) of β -ME were added to the CZB medium and their effects was significantly higher in 100 μ M of β -ME. The effects of protein sources(FCS or BSA) in the presence of 100 μ M β -ME were examined. Their effects on development of embryos cultured with and without somatic cells to blastocyst stage were greater in FCS treatment (56.6 and 29.3%) than in BSA treatment(25.5 and 12.8%). We also evaluated the effects of β -ME addition on the blastocyst formation when embryos at different stages were exposed to 100 μ M β -ME. β -ME promoted increased development of embryo to blastocyst stage and the effect was greater in 6-cell to morula embryos than in embryos fewer than 4-cells at the initiation of treatment. The results suggested that β -ME can improve bovine embryo development by overcoming the arrest in early development.

(Key words : Bovine embryo, CZB medium, Antioxidant, β -mercaptoethanol, *In vitro* Development)

I. 서 론

포유동물 초기배의 체외배양시 세포발달 증지는 자성 전사체의 고갈과 초기배의 계놈의 발현 사이의 전이 기간과 일치하며 이러한 현상은 특정 수준 이하로

[†] 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구사업 핵심전문과제 연구지원('94~'96)에 의해 수행되었음(과제번호 : 941-0600-067-2).

* 수의과학연구소 (Veterinary Research Institute, Anyang 440-016)

** 대구대학교 축산학과 (Department of Animal Science, Taegu Univ., 713-714)

자성 전사체의 양적 감소에 기인하는 것으로 보고되고 있다. 체외에서 공급되는 물질의 불균형에 의한 부적절한 초기배 대사에 의해 세포발달중지 현상이 일어나는 것으로 보여진다. 예를 들면, 생쥐 초기배 배양시 glucose를 첨가하게 되면 대사 작용에 의해 glycogen의 축적으로 인한 세포발달을 저해시킨다고 하며 이러한 문제점은 배양액 내의 glucose를 제거함으로써 해결될 수 있다고 보고하였다(Chatot 등, 1989). 소 초기배의 배양시 문제가 되고 있는 8~16 세포기의 체외 발달중지 현상을 극복하기 위하여 배양액에 thiol 화합물, 성장 인자 및 단백질질을 첨가하거나(Xu 등, 1987; Fukui 등, 1982; Takahashi 등, 1993; Thibodeaux 등, 1993; Caamano 등, 1996; Giles 등, 1996), 난구세포, 난관상피세포 및 buffalo rat 간세포 등을 이용한 체세포와의 공동배양에 의해 배반포까지의 발달을 증진시켰다고 보고하였다(Camous 등, 1984; Hensleigh 등, 1985; Goto 등, 1988; Rehman 등, 1994). 또한 Li 등(1993b)은 높은 산소압에서 배양한 초기배는 해로운 유리기(free radical)의 생성에 의해 발달이 저해된다고 하였으며, Pabon 등(1989)은 유리산소기(free oxygen radical)가 초기배 발달중지 현상의 한 원인이라고 제시하였다. 체외 배양액 내에 존재하는 유리기를 제거하기 위해 Li 등(1993a)은 항산화제를 첨가함으로써 발달중지 현상을 극복할 수 있었다고 보고하였다. 황을 함유한 β -amino acid인 taurine은 자성생식기액과 초기배에 높은 농도로 존재하며 독성 물질의 회색과 삼투압 조절자로서의 세포막 보호 작용을 한다고 하였다(Uchida 등, 1991). 세포 내에서 thiol 화합물인 glutathione은 세포 분화와 아미노산 수송, DNA와 단백질의 합성, 이황화물의 환원 반응 등 세포 내에서 중요한 생물학적 기능을 가지며, 특히 산화 반응에서 세포를 보호하는 항산화적 작용을 한다고 하였다(Kosower 등, 1978; Meister 등, 1983). 본 실험은 일부 체세포배양에서 항산화제로 이용되고 있는 β -ME을 발생단계별로 소 초기배에 첨가하여 체외발달중지 현상을 극복하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시 약

일반적인 난자 배양액 조제에 이용한 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U. S. A)와 BDH Chemical Co.(Poole, U. K.)에서 구입하였다.

2. 생식세포

본 실험에 이용된 난자는 평택 도축장으로부터 한우 난소를 회수한 후 미성숙 난자를 채취하여 이용하였으며, 정자는 국립종축원과 한우개량사업소로부터 구입한 동결 정액을 이용하였다.

3. 난자의 체외성숙

도축장에서 채취한 난소를 37℃의 생리 식염수가 들어 있는 보온병에 담아 실험실로 운반하여 세정한 후, 18G 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 직경 3~5mm의 난포로부터 난자를 흡입·회수하였다. 회수된 난포내용물은 15ml glass tube에 정치시켜 상정액을 제거한 후 60mm dish에 넣어 균일하게 부착되어 있는 난자·난구세포복합체(oocyte-cumulus cells; OCCs)만을 골라 Wash 배양액으로 3회 세정하였다. 세정된 난자·난구세포복합체를 TCM199 + FCS(Gibco Life Technologies Inc. Grand Island, N. Y., U. S. A.)로 3회 세정한 후 TCM199 + 20% FCS + Gn(PMSG, hCG; 10 IU/ml : Folligon, Intervet Co., Boxmeer, Holland)로 옮겨 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 동안 체외성숙·배양하였다.

4. 체외수정

1) 정자의 준비

유우 및 한우 동결 정액 straw를 액체질소 tank로부터 꺼내어 37℃ 물에서 1분간 용해하였다.

2) 성숙난자의 준비

22~24시간 체외성숙 배양한 난자 중에서 난구세포가 잘 확장된 난자만을 성숙난자로 선별하였다. 난구세포가 확장된 난자를 300U/ml hyaluronidase와 3% sodium citrate로 처리하여 난구세포를 제거하였다. 제1극체가 보이는 난자만을 Fert 배양액으로 3회 세정한 후, Fert 5 μ l 당 난자 1개의 비율로 난자를 준비하였다. 1ml 90% Percoll 용액과 1ml Fert 용액을

회석하여 만든 45% Percoll 용액과 2ml 90% Percoll 용액을 준비한 다음 90% Percoll 용액은 하층에, 45% percoll 용액은 상층에 gradient층이 형성되게 15ml conical tube에 넣은 후 2시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 용해한 정자를 45% Percoll 용액 상층에 gradient층이 형성되게 한 후 2,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상정액을 제거하였다. 생존 정자만을 포함하고 있는 정자 pellet을 회수하여 6~8ml Fert 배양액에 회석한 800 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 100 μ l Fert 배양액에 정자 pellet을 회석하였다(Florance 등, 1992).

3) 체외수정

10 μ g/ml heparin과 40 μ l/ml PHE 용액이 첨가된 50 μ l Fert 수정용 배양액에 10개의 성숙난자를 넣은 후 4 μ l 정자농축 용액을 첨가하여 1~2 \times 10⁶ 정자/ml의 농도로 체외수정을 실시하였다.

5. 공배양 체세포의 준비

도축장에서 채취한 소 난관에 부착되어 있는 지방 및 기타 결체조직을 모두 제거한 후 생리 식염수로 5회 세정하였다. 생리 식염수가 들어 있는 90mm Petri dish에 난관을 넣고 glass slide를 이용하여 난관을 smear하여 난관 상피세포를 추출하였다. 추출된 난관 상피세포를 Wash 및 TCM199 배양액으로 각각 3회 원심분리하여 세정하였다. 세정한 소 난관상피세포를 15% 소태아혈청(FCS)이 함유된 50 μ l의 TCM199 배양액에서 배양하였으며 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였다.

6. β -Mercaptoethanol (β -ME) 첨가 효과

1) 초기배 발생속도에 따른 초기배의 배반포 형성

수정 후 빠른 난할 속도를 보이는 초기배에서 높은 배반포 형성을 보인다는 보고가 있어, 수정 72시간에 2세포, 3~4세포, 6~8세포기 초기배를 각 실험구로 나누어 배반포 형성율을 조사하였다.

2) 농도별 소 초기배 발생 효과

세포발달중지 단계인 6~8세포 초기배에 β -ME을 농도별로 첨가하여 초기배 발생에 미치는 효과를 조사

하였다. 0, 10, 50 및 100 μ M 농도로 하여 공배양을 한 실험구와 공배양을 하지 않은 실험구로 구분하여 수정 후 168시간째에 배반포 및 나화 배반포 형성율을 조사하였다.

3) FCS와 BSA 첨가에 따른 소 초기배 발생 효과

배양액에 100 μ M β -ME을 첨가한 후 15% FCS와 4mg/ml BSA에 따른 초기배 발생효과를 검토하고자 6~8세포의 소 초기배를 7일 동안 배양한 후 배반포 및 나화배반포를 조사하였다.

4) β -ME 첨가에 따른 세포발달중지기 이전의 초기배 발생

수정 3일째에 3~4세포기, 6~8세포 초기배에 100 μ M β -ME을 첨가하여 배발생율을 조사하였다.

5) β -ME 첨가에 따른 세포발달중지기 이후의 초기배 발생

수정 4일째에 상실배 시기의 초기배에 100 μ M β -ME을 첨가하여 배발생율을 조사하였다.

7. 초기배 발생의 분석

수정 후 72시간째에 초기배를 회수한 후 7일 동안 배양하여 배반포 및 나화배반포를 조사하여 배발생율을 확인하였다.

8. 사진촬영

난자 및 초기배의 형태는 Nikon 위상차 현미경 사진기하에서 ASA 100 필름을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 초기배 발생속도에 따른 초기배의 배반포 형성

수정 후 난할 속도가 빠른 초기배에서 배반포까지 발달율이 높다고 하였으며, 발생이 지연된 초기배에서 체외발달중지 현상이 일어나는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 초기난할속도에 따른 배반포 형성율을 조사하고자 수정 후 72시간째에 체외발생된 초기배를 각각 2-세포, 3~4-세포, 6~8-세포기로 분류한 후 각 실험구별로 배반포 형성율을 조사하였다. 2세포기 330개, 3~4세포기 120개, 6~8세포기 이상 122개 등 총

Table 1. *In vitro* development of bovine embryos selected after 3 days of fertilization

Cell stage	No. of embryos used	No. of embryos developed upto following stages at 168 hpi ¹ (%)					
		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	Morula	Blastocyst
≥ 6~8-cell	122	—	—	28(22.9)	22(18.0)	35(28.7)	37(30.4)
3~4-cell	120	—	56(46.7)	54(45.0)	10(8.3)	—	—
2-cell	330	238(72.1)	90(27.3)	2(0.6)	—	—	—

¹, hpi : hour postinsemination.

572개의 수정란을 배양하여 배반포 형성율을 조사한 결과, 6~8세포기 초기배의 경우 30.4%(37/132)의 배반포 형성율을 보여 주었으나 2세포기는 8-세포, 3~4세포기 초기배들은 16-세포기까지만 발달하였고 배반포까지는 발달되지 않음을 알 수 있었다(Table 1). 이와 같은 결과는 초기 난할속도가 빠른 초기배에서 높은 배반포 형성율을 보인다는 다른 보고자의 결과와 유사하였다.

2. β -ME 농도에 따른 체외발생

8~16 세포기에서 일어나는 소 초기배 세포발달중지 현상을 극복하기 위해서 세포의 산화·환원 상태의 유지 및 산화물의 유해한 작용으로부터 세포를 보호하는데 중요한 역할을 해주는 β -ME를 농도별로 첨가하여 세포발달중지 현상을 극복할 수 있는 적정 농도를 결정하고자 하였다. 소 난관 상피단층세포와 공배양한 처리구에는 432개, 소 난관 상피세포가 없는 처리구에는

431개 등 총 863개의 6~8세포 초기배에 β -ME를 첨가한 후 7일째까지 체외배양하였다. 소 난관 상피단층세포와 공배양한 경우 배반포 형성율은 대조구(0 μ M), 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M의 β -ME를 첨가하였을 때 각각 37.8%(37/98), 43.2%(48/111), 42.3%(47/111) 및 56.3%(63/112)로 나타났고, 공배양하지 않은 처리구에서는 대조구(0 μ M), 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M에서 각각 26.5%(26/98), 29.4%(32/109), 33.6%(37/110) 및 42.1%(48/114)로 나타났다(Table 2와 Fig. 1). 소 난관 상피단층세포와 공배양한 경우가 공배양하지 않은 처리구에 비해 배반포형성율이 높았으며, 100 μ M의 β -ME를 첨가하였을 때가 공배양 유·무에 관계없이 배반포까지의 발생율이 높은 것으로 나타났다. Takashi 등(1993)은 TCM 199에 50 μ M의 β -ME를 첨가한 경우에서 가장 높은 배반포 및 나화 배반포 형성율을 보였다고 보고한 반면, Caamano 등(1996)은 TCM 199에 10 μ M의 β -ME

Table 2. Effects of β -mercaptoethanol on development of bovine 6~8-cell stage embryos cultured in CZB + 15% FCS¹

BOEC	β -ME ¹ (μ M)	No. of embryos used	No. of embryos developed upto following stages at 168 hpi(%)		
			Blastocyst	Hatched blastocyst	Total
+	0	98	32 / 98(32.6)	5 / 98(5.1)	37 / 98(37.8)
	10	111	43 / 111(37.8)	5 / 111(4.5)	48 / 111(43.2)
	50	111	38 / 111(34.2)	9 / 111(8.1)	47 / 111(42.3)
	100	112	54 / 112(48.2)	9 / 112(8.0)	63 / 112(56.3)
-	0	98	25 / 98 (25.5)	1 / 98(1.0)	26 / 98(26.5)
	10	109	31 / 109(28.4)	1 / 109(0.9)	32 / 109(29.4)
	50	110	33 / 110(30.0)	4 / 110(3.6)	37 / 110(33.6)
	100	114	43 / 114(37.7)	5 / 114(4.4)	48 / 114(42.1)

¹. Abbreviations are β -ME, β -mercaptoethanol ; hpi : hour postinseminations.

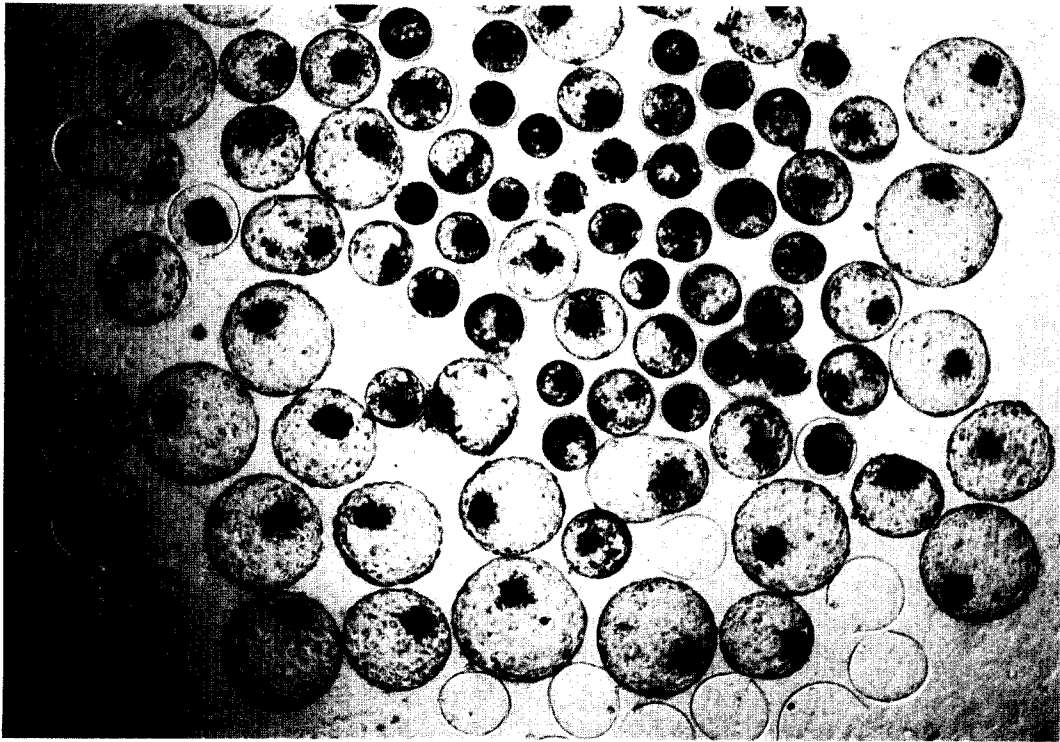


Fig. 1. Blastocysts produced *in vitro* using CZB medium, supplemented with 100 μ M β -ME and 15% FCS. Magnification is 40 \times .

을 넣어 주었을 때 가장 높은 배반포 형성율을 보여 주었다고 하였다. Giles 등(1996)은 5종류의 복합배양액 및 단순배양액에 100 μ M의 β -ME만을 첨가하여 실험한 결과 단순배양액보다는 복합배양액인 DMEM

에서 가장 높은 67%의 배반포 형성율을 보였다고 하였다. 본 실험에서는 적정 β -ME의 첨가 농도는 다른 보고자들과 차이가 있었지만, β -ME를 첨가하였을 때 가 무첨가구에 비해 배반포 형성율이 높아지는 것으로

Table 3. Effects of β -mercaptoethanol on the development of 6~8-cell embryos cultured in CZB + FCS or BSA

BOEC	Sera	β -ME ¹ (μ M)	No. of embryos used	No. of embryos developed to following stage at 168hpi ¹ (%)		
				Blastocyst	Hatched blastocyst	Total
+	FCS	0	102	29/102(28.4)	4/102(3.9)	33/104(31.7)
		100	99	48/99(48.5)	8/99(8.1)	56/99(56.6)
	BSA	0	97	12/97(12.4)	2/97(2.1)	14/97(14.4)
		100	98	23/98(23.5)	2/98(2.0)	25/98(25.5)
-	FCS	0	100	14/100(14.0)	2/100(2.0)	16/100(16.0)
		100	99	23/99(23.2)	6/99(6.1)	29/99(29.3)
	BSA	0	99	7/99(7.1)	0/99(0.0)	7/99(7.1)
		100	102	12/102(11.8)	1/102(0.9)	13/102(12.8)

¹. Abbreviations are β -ME, β -mercaptoethanol ; hpi ; hour postinseminations.

나타나 일치된 결과를 얻을 수 있었다.

3. FCS 또는 BSA 존재 하에서 β -ME 첨가 효과

소 난관 상피단층세포와 공배양한 처리구에는 396개, 공배양하지 않은 경우에는 400개의 수정란을 사용하여 $100\mu\text{M}$ 의 β -ME 존재 하에 FCS와 BSA에 따른 배반포 형성율을 조사하였다(Table 3). 수정 후 3일째에 6~8 세포 초기배를 소 난관 상피단층세포와 공배양하고 FCS의 존재 하에 배반포 형성율은 대조구($0\mu\text{M}$)에서 31.7%(33/102)와 $100\mu\text{M}$ 의 β -ME를 첨가하였을 때 56.6%(56/99)로 나타났으며 BSA의 존재 하에서는 대조구($0\mu\text{M}$)에서 14.4%(14/97)와 $100\mu\text{M}$ 의 β -ME 첨가구에서 25.5%(26/98)로 나타났다. 소 난관 상피단층세포와 공배양하지 않고 FCS를 처리하였을 때 대조구($0\mu\text{M}$)에서 16.0%(16/100)와 $100\mu\text{M}$ 의 β -ME를 첨가하였을 때 29.3%(29/99)로 나타났으며 BSA의 존재 하에서는 대조구($0\mu\text{M}$)에서 7.1%(7/99)와 $100\mu\text{M}$ 의 β -ME 첨가구에서 12.8%(13/102)로 나타났다. $100\mu\text{M}$ 의 β -ME의 존재 하에 FCS와 BSA간의 혈청에 따른 초기배 발생은 소 난관 상피단층 세포와 공배양한 경우와 공배양하지 않은 처리구 모두에서 BSA 보다는 FCS를 첨가하였을 때 높은 배반포 형성율을 보이는 것을 알 수 있었다.

4. 세포분열중지기 이전의 β -ME 첨가 효과

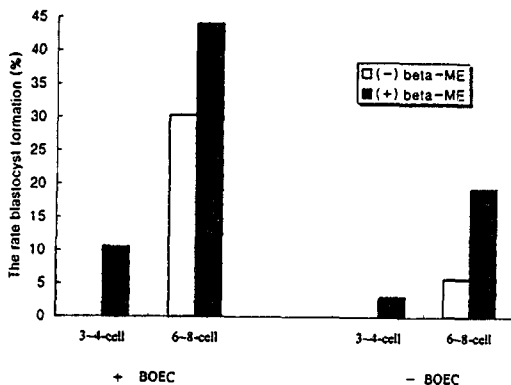


Fig. 2. Effects of β -mercaptoethanol supplemented at different stage on *in vitro* development of bovine embryo culture.

수정 후 72시간째에 3~4세포기와 6~8세포기로 발달한 세포분열 중지기 이전의 초기배에 $100\mu\text{M}$ 의 β -ME를 첨가한 후 세포발달 중지현상이 극복되는지를 알아보기 위하여 소 난관 상피단층세포와 공배양한 경우 458개, 공배양하지 않은 처리구에 341개의 초기배를 이용하여 배반포 형성율을 조사하였다(Fig. 2). 소 난관 상피단층세포와 공배양한 후 3~4세포기의 무첨가구와 첨가구에서 각각 0%(0/120)와 10.5%(12/114)를 나타냈으며 6~8세포기의 경우에는 무첨가구는 30.4%(37/122), 첨가구에서는 44.1%(45/102)의 배반포 형성율을 보여주었다. 소 난관 상피단층세포와 공배양하지 않은 경우에는 3~4세포기의 무첨가구와 첨가구에서 각각 0%(0/96)와 3.0%(2/66)를 나타냈으며 6~8세포기의 경우에는 무첨가구는 5.8%(5/86), 첨가구에서는 19.4%(18/93)의 배반포 형성율을 보여주었다. 본 실험에 의해 소 난관 상피단층 세포와 공배양한 경우와 공배양하지 않은 처리구 모두에서 세포분열 중지기 이전의 초기배에 β -ME를 첨가함으로써 산화물에 의한 초기배의 발달 저해를 극복하여 배반포 형성율이 증진되는 것을 알 수 있었다.

5. 세포분열중지기 이후의 β -ME 첨가 효과

수정 후 체외배양 4일 째에 상실배에 $100\mu\text{M}$ 의 β -ME를 첨가하여 배 발생율을 증진시키는가를 알아보기 위하여 소 난관 상피단층세포와 공배양한 경우 55개, 공배양하지 않은 처리구에 56개의 초기배를 각각 이용하여 배반포 형성율을 조사하였다(Table 4). 소 난관 상피단층세포와 공배양한 후 β -ME를 첨가하였을 때 상실배에서 배반포 및 나화배반포로의 발달율은 81.8%(45/55)로 나타났고, 공배양하지 않고 β -ME를 첨가하였을 때는 상실배 중 46.4%(26/56)의 초기배만이 배반포 및 나화배반포로 발달하였다. 본 실험에 의해 소 난관 상피단층 세포와 공배양하면서 $100\mu\text{M}$ 의 β -ME를 첨가하였을 때 높은 배반포 형성율을 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

IV. 적 요

본 실험에서는 8~16세포기에서 세포발달중지가 일어나는 소 초기배 체외배양 성적을 개선하기 위해 세

Table 4. Effect of 100 μ M β -mercaptoethanol on the development of morula embryos to blastocyst stage

Media	BOEC	No. of the embryos used	No. of embryos developed to following stage at 120hpi ¹ (%)		
			Blastocyst	Hatched blastocyst	Total
CZB	+	55	36(65.5)	9/55(16.4)	45/55(81.8)
	-	56	24(42.9)	2/56(3.6)	26/56(46.4)

¹, hpi : hour postinseminations.

포 내에서 산화물 생성을 억제하는 환원된 β -ME를 첨가하여 배반생육을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수정 72시간째에 6~8세포기로 발생된 초기배에서 높은 배반포 형성율을 보였으며 2-세포 및 3~4-세포기의 초기배는 배반포까지 발달되지 못함을 알 수 있었다.
2. 소 초기배 체외배양시 10, 50 및 100 μ M의 β -ME를 첨가하여 배반포 형성율을 조사한 결과 100 μ M 농도에서 소 난관상피단층세포와의 공배양 유·무에 관계없이 가장 높은 배반포 형성율을 보여주었다.
3. 100 μ M의 β -ME 존재 하에 FCS와 BSA의 첨가에 따른 체외발생 효과를 검토한 결과, 소 난관상피단층세포와 공배양 유·무에 관계없이 FCS 첨가구가 BSA 첨가구보다 높은 배반포 형성율을 보여주었다.
4. 수정 후 72시간째에 3~4세포기와 6~8세포기의 세포분열 중지기 이전의 초기배에 100 μ M의 β -ME를 첨가한 후 소 난관 상피단층세포와 공배양하였을 때 3~4세포기의 무첨가구와 첨가구에서 0%와 10.5%, 6~8세포기의 경우에는 30.4%와 44.1%의 배반포 형성율을 보여주었다. 공배양하지 않은 경우에는 3~4세포기의 무첨가구와 첨가구에서 0%와 3.0%, 6~8세포기는 5.8%와 19.4%의 배반포 형성율을 보여주었다.
5. 체외배양 4일째에 상실배에 100 μ M의 β -ME를 첨가하여 발생율을 증진시키는가를 알아보기 위하여 소 난관상피단층세포와 공배양한 경우 배반포 발달율은 81.8%(45/55)로 나타났고, 공배양하지 않은 경우에는 46.4%(26/56)의 발생율을 보여주었다.

V. 인용문헌

1. Caamano, J. N., Ryoo, Z. Y. and Youngs, C. R. 1996. Beneficial effects of cysteine and β -mercaptoethanol on development of bovine IVM/IVF embryos in a cell-free, serum-free culture system. *Theriogenology*, 45: 196(Abstr.).
2. Camous, S., Heyman, Y., Haziou, W. and Menezo, Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 72: 479-485.
3. Chatot, C. L., Ziomek, C. A., Bavister, B. D., Lewis, J. L. and Torres, I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 86: 679-688.
4. Florence, L. H. N., Liu, D. Y. and Baker, H. W. G. 1992. Comparison of percoll, mini-percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen sample. *Human Reprod.*, 7: 261-266.
5. Fukui, Y., Terawaki, Y. and Ono, H. 1982. Effect of gonadotropin, steroids and culture on bovine oocyte maturation. *Theriogenology*, 18: 161-175.
6. Goto K., Kajihara S., Kosaka M., Koba Y. and Ogawa K. 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.
7. Hensleigh, H. C. and Hunter, A. G. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. J. Dairy. Sci., 68: 1456-1462.
 8. Kosower, N. S. and Kosower, E. M. 1978. The glutathione status of cells. Int. Rev. Cytol., 54: 109-160.
 9. Li, J., Foote, R. H. and Simkin, K. 1993a, Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. Biol. Reprod., 49: 33-37.
 10. Li, J., Foote, R. H. and Simkin, K. 1993b, Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. J. Reprod. Fertil., 98: 163-167.
 11. Meister, A. and Anderson, M. E. 1983. Glutathione. Ann. Rev. Biochem., 52: 711-760.
 12. Pabon, W. E., Findley, W. E. and Gibbons, W. E. 1989. The toxic effect of short exposure to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertil. Steril., 51: 896-900.
 13. Rehman, N. A., Collins, R., Suh, T. K. and Wright, R. W. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes co-cultured with buffalro rat liver cells. Theriogenology, 41: 1453-1462.
 14. Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, and Okano, A. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol. Reprod., 49: 228-232.
 15. Thibodeaux, J. K., Del Vecchio, R. P. and Hansel, W. 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.
 16. Uchida, S., Nakanishi, T., Kwon, H. M., Preston, A. S. and Handler, J. S. 1991. Taurine behaves as an osmolyte in Madin-Darby canine kidney cells ; protection by polarized, regulated transport of taurine. J. Clin. Invest., 88: 656-662.
 17. Xu, K. P., Greve, T., Callssen, H. and Hyttel, P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 81: 501-504.
- (접수일자 : 1997. 11. 16 / 채택일자 : 1997. 12. 5)