

배양액 첨가제가 마우스 초기배의 체외배양에 미치는 효과

이일동 · 박흠대* · 송해범
대구대학교 자연자원대학

Effects of the Additives in the Medium for *In Vitro* Culture of Mouse Embryos

Lee, I. D., H. D. Park and H. B. Song

College of Natural Resources, Taegu University, Kyungbuk, Korea

SUMMARY

These experiments were conducted to investigate the effects and optimal concentrations of RPMI 1640 amino acids, MEM vitamins and human follicular fluid(hFF) as additives in the medium for *in vitro* culture of mouse embryos. The results obtained were as follows.

1. The development rates of blastocyst stage were 54.5%, 65.4%, 48.2%, 57.4% and 35.5% when the medium was added to 0.25%, 0.5%, 1%, 2% of RPMI 1640 amino acid and control, respectively. The addition of 0.5% RPMI 1640 amino acid was the best concentration.
2. The development rates of blastocyst stage were 22.4%, 31.3%, 21.9%, 19.0% and 12.8% when the medium was added to 0.25%, 0.5%, 1%, 2% of MEM vitamin and control, respectively. The addition of 0.5% MEM vitamin was the best concentration.
3. The development rates of blastocyst stage were 20.9%, 21.9%, 18.9%, 29.4% and 20.6% when the medium was added to 2.5%, 5%, 10%, 20% of hFF and control, respectively.

(Key words : Mouse embryo, IVC, Additives)

I. 서 론

동물세포의 체외배양을 위한 새로운 배지의 개발(Ham, 1963; Menezo와 Testart, 1984; Quinn 등, 1985)은 꾸준히 발전되어 왔는데, 초기에는 림프액이나 혈장과 같은 단순한 biological fluid(腹水, 조직추출액 등)를 이용하였으나, 이들 천연물은 그 lot에 따라 세포증식 촉진에 현저히 달라지고 조성액 중에 포함된 밝혀지지 않은 물질의 생물학적 작용으로 배양액으로서 부적합한 점이 있으므로 세포의 성장에 요구되는 모든 필요충분조건을 충족시킬 수 있는 배양액을

개발하기 위해 화학적 조성이 확실한 chemically defined medium을 확립하려는 많은 연구가 진행되었다(Bavister 등, 1983; Bates 등, 1985).

그 결과 salt와 glucose로 만든 balanced salt solution 또는 physiological salt solution과 같은 단순 배양액이 개발되고, 이러한 배양액에 아미노산, 비타민 등을 첨가한 소위 synthetic medium 또는 chemically defined medium이 개발되었고, 각종 미량원소도 첨가하고 있으며, 실제 배양에는 혈청을 첨가한 complex synthetic medium을 개발하여 동물세포의 체외배양에 사용하게 되었다(Lee와 Fukui, 1995).

Eagle's basal medium은 Sanford 등(1951)이 개

*대구대학교 공과대학 (College of Engineering, Taegu University)
이 논문은 1998학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

발했던 중복배양법을 이용하여 아미노산은 glutamine 외에 12종류만, 비타민은 8종류만 첨가하고 아미노산과 비타민의 최적농도를 조합하여 포유류 세포의 배양에 적당한 배양액으로서 조제했으며, 이 배양액은 다른 배양액에 비해 조성이 간단하며 조제가 용이하기 때문에 현재 많이 사용하고 있는 배양액 중의 하나이다. Minimum essential medium(MEM)은 Eagle(1959)에 의해 개발되었고, HeLa세포를 분쇄하여 유리된 최소 필수아미노산의 종류 및 농도로 결정되었다.

배양액에 첨가되는 특이적 아미노산은 embryo 발생을 용이하게 하며, 체외배양시 발생하는 수정란의 발달중지현상을 완화시키는 것으로 보고되어 포유동물 초기배 발생에 있어서 아미노산의 유효한 영향이 중요시 되고 있다. 배양액에 비타민 첨가는 토끼와 햄스터 blastocyst의 hatching율과 발생율을 개선시키는 것으로도 보고되고 있다(Kane, 1988 ; Kane과 Bavister, 1988). 사람의 난포액은 난포벽의 헤파세포에 분포된 혈관에서 유래하여 기저층을 통하여 삼출된 혈장물질과 난포벽에서 합성된 분비물로 구성되어 있으며, 고농도의 steroids, polypeptide hormones 및 수정란의 발달에 적합한 성장인자를 함유하고 있는 것으로 보고되었고(Fakih와 Vijayakumar, 1990). 수정란의 체외배양에 단백질원으로 첨가될 때 체내조건과 가장 유사한 체외배양 조건을 제공할 수 있을 것이라고 추론했다(Cha 등, 1990).

본 실험은 배양액에 첨가한 아미노산, 비타민 및 난포액이 마우스 수정란의 체외배양에 미치는 영향과 최적의 첨가농도를 검토하기 위해 배양액에 20종류의 아미노산이 포함된 RPMI 1640 아미노산과 MEM 비타민 및 hFF 농도를 다르게 각각 첨가하여 수행하였으며, 궁극적으로는 가축과 사람에 있어서 IVF의 효율을 높일 수 있는 배양액을 개발하기 위해 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 본교 실험동물사육실과 국내에서 사육 중인 ICR 계통(이하 ICR)마우스로, 수컷은 생후 12~15주령, 체중 35g 이상된 것을 사용하였으며, 암

컷은 생후 3~6주령, 체중 15~25g인 것을 사용하였다. 일조시간은 12시간으로 고정하였으며, 고형사료와 물은 무제한 급여하였다. 실내온도는 18~24℃를 유지하였다. 또한 실험 1주일 전에 개체간의 차이를 최소화시키기 위하여 수컷은 1마리씩, 암컷은 3~4마리씩 분리하여 1개의 cage에 나누어 관리하였다.

2. 배양액

본 연구에 사용된 기초배양액으로는 3mg/ml의 BSA(bovine serum albumin, Sigma, USA)를 함유한 T₆ 배양액을 사용하였으며, 정자의 처리, 난자 회수용 및 수정용 배양액으로는 4mg/ml의 BSA를 함유한 TYH 배양액을 사용하였고, 수정란의 배양용으로는 기초배양액에 최종농도 100 μ M의 EDTA(Sigma, USA)를 첨가하여 사용하였다. 정자의 처리, 난자 회수용 및 수정용 배양액(TYH)의 pH는 7.4~7.8, 수정란의 체외배양용 배양액(T₆)의 pH는 7.2~7.4로 조정하여 사용하였다.

3. 정자의 준비

정자는 숫마우스를 경추탈골법으로 도살하여 음성생식기에서 정소상체미부를 적출하고, 정소상체미부를 정자부유용 배양액 소적(0.3ml)이 들어있는 petridish 내의 유동 paraffin oil 속에 침지한 다음, 실체현미경하에서 해부침으로 절개하여 누출된 정자괴를 배양액 소적으로 유도하여 정자의 부유를 확인하고, 37℃, 5% CO₂, 95% 공기조건의 CO₂ 배양기에서 1.5~2시간 동안 배양하여 정자의 수정능획득을 유기하였다.

4. 과배란 처리와 난자의 준비

암마우스는 5 IU의 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin; Sigma, USA)을 복강주사한 다음, 48시간째에 5 IU의 hCG(human chorionic gonadotropin; Sigma, USA)를 복강주사하여 과배란을 유도하였다. hCG주사후 10~20시간째에 마우스를 도살하여 외과적인 방법으로 난관을 적출한 후, 부착된 혈액과 불순물을 제거한 난관을 체외수정을 위한 배양액 소적(0.3ml)이 들어있는 조직배양용 petridish 내의 유동 paraffin oil 속으로 옮겨서, 40~60배의 실체현미경하에서 해부침을 사용하여 난관팬대부에서 난

구세포에 둘러싸인 난자를 회수하였다.

5. 체외수정

배란된 성숙난자는 0.3ml의 TYH+4mg/ml BSA 소적으로 옮긴 다음, 수정능획득이 완료된 정자를 최종농도 $1\sim 2 \times 10^6$ /ml정자로 조절하여 난자가 들어있는 소적으로 옮겨서 37℃, 5% CO₂, 95% 공기조건의 CO₂ 배양기에서 6시간 동안 배양하면서 수정을 유도하였으며, 전핵과 극체의 유무로 정상적인 수정 여부를 관찰하였다.

6. 체외배양

정자와 난자를 체외에서 수정시킨 후 제2극체와 2개의 전핵이 확인된 수정란을 무작위로 선별하여 기초배양액(T₆)에서 2~3회 세척하고, 100μM EDTA가 함유된 배양액 소적에 배양하였다. 배양액 소적은 15μl의 크기로 하였으며, 1개의 소적당 10~15개의 수정란을 옮긴 다음 37℃, 5% CO₂, 95% 공기조건의 CO₂ 배양기에서 계속 배양하면서 매 24시간 간격으로 5일 동안 배발달 상태를 5회 반복하여 관찰하였다.

체외배양은 기초배양액에 첨가농도를 각각 다르게 한 RPMI 1640 아미노산의 첨가, MEM 비타민의 첨가, 사람 난포액의 첨가 등으로 나누어 배발달 상태를 대조구와 비교하여 적정 첨가농도를 확인하였다.

1) RPMI 1640 아미노산의 첨가

T₆ 배양액을 기초배양액으로 RPMI 1640 아미노산의 첨가농도를 각각 0%(대조구), 0.25%, 0.5%, 1%, 및 2% 로 달리하였으며, 배반포 단계의 배발달 상태를 관찰하여 체외발생에 미치는 영향과 적정 첨가농도를 확인하였다.

2) MEM 비타민의 첨가

T₆ 배양액을 기초배양액으로 MEM 비타민의 첨가농도를 각각 0%(대조구), 0.25%, 0.5%, 1%, 및 2% 로 달리하였으며, 배반포 단계의 배발달 상태를 관찰하여 체외발생에 미치는 영향과 적정 첨가농도를 확인하였다.

3) 사람 난포액(human follicular fluid ; hFF)의 첨가

T₆ 배양액을 기초배양액으로 59℃에서 35분 동안 비동화시킨 사람의 성숙난포액의 첨가농도를 각각 0%(대조구), 2.5%, 5%, 10% 및 20% 로 달리하였으며, 배반포 단계의 배발달 상태를 관찰하여 체외발생에 미치는 영향과 적정 첨가농도를 확인하였다.

7. 통계분석

수정란의 체외발생에 대한 실험결과를 백분율로 표시하였고, 통계분석은 SAS package를 이용해서 수행되었고, 처리 평균간에는 LSD test를 실시해서 5%의 유의수준에서 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 아미노산의 영향

기초배양액(T₆)에 RPMI 1640 아미노산을 각각 0%(대조구), 0.25%, 0.5%, 1% 및 2% 농도로 첨가하여 5일간 배양하고, 배반포 단계까지의 배발달 상태를 관찰한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 배반포까지의 배 발달율은 대조구(0%) 35.5%(21/59), 0.25% 첨가구 54.5%(30/55), 0.5% 첨가구 65.4%(36/55), 1% 첨가구 48.2%(27/56) 및 2% 첨가구 57.4%(31/54) 로 배반포 발달율은 0.5% 첨가구에서 65.4%(36/55)로 가장 높게 나타났으며, 대조구의 35.5%(21/59)에 비해 통계적인 유의차가 인정되었으나, 타 비교구와는 유의차가 인정되지 않았다.

Mehta와 Kiessling(1990)은 마우스 초기배의 체외배양을 위한 배양액에 아미노산을 첨가했을 때 배반포 형성율이 향상되었다고 하였으며, Chatot 등(1989)은 필수아미노산이 첨가된 처리구에 glutamine이 포함되었을 때에는 배 발달율이 개선되었다고 하였지만, Gardner와 Lane(1993)은 비필수아미노산과 glutamine은 마우스 배의 발달을 촉진시키지만 glutamine을 첨가하지 않은 필수아미노산은 마우스 배의 발달을 억제한다고 하였다. Bavister와 Arlotto(1990)는 배양액에 첨가되는 아미노산의 종류가 햄스터 초기배의 분할율에 중요한 역할을 하는데, glycine, cystine, lysine은 발생을 촉진시키지만, 이러한 아미노산을 leucine과 함께 첨가하였을 경우 발생이 약간 억제되는 경향을 보였고, tyrosine의 억제경향도 aspartic acid, tryptophan, methionine과 함께 첨

Table 1. The effects of amino acids on development of 1-cell mouse embryos cultured *in vitro*

Concentration of amino acids(%)	No.(%) of embryos	
	Cultured	Developed to blastocyst
0	59	21(35.5) ^b
0.25	55	30(54.5) ^{ab}
0.5	55	36(65.4) ^a
1	56	27(48.2) ^{ab}
2	54	31(57.4) ^{ab}

^{ab} Means within a column with superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

가하였을 경우에는 완전히 극복되었다고 보고하고, 이러한 현상을 객관적으로 설명하기는 어렵지만 서로 다른 아미노산의 상호작용이 존재하는 것으로 추론하였다.

이상의 보고와 같이 본 실험에서도 마우스 초기배의 발생에 있어서 배양액에 첨가한 아미노산이 배양액 내에서 단백질 합성, 에너지원 제공 및 pH 조절의 기능을 함으로써 배반포 발생율을 향상시킨 것으로 사료된다(Bavister, 1995).

2. 비타민의 영향

기초배양액(T₆)에 MEM 비타민을 각각 0%(대조구), 0.25%, 0.5%, 1% 및 2% 농도로 첨가하여 5일간 배양하고, 배반포 단계까지의 배 발달상태를 관찰한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 배반포까지의 배 발달율은 대조구(0%) 12.8%(5/39), 0.25% 첨가구 22.4%(11/49), 0.5% 첨가구 31.1%(14/45), 1% 첨가구 21.9%(9/41) 및 2% 첨가구 19.0%(8/42)로 배반포 발달율은 0.5% 첨가구에서 31.1%(14/45)로 가장 높게 나타났으며, 대조구의 12.8%(5/39)에 비해 통계적인 유의차가 인정되었으며, 타 비교구와는 유의차가 인정되지 않았다.

Gardner와 Sakkas(1993)는 마우스의 배반포에 있어서 해당작용은 배양액에 아미노산과 비타민을 첨가함으로써 유의하게 감소하였다고 보고했고, Gardner 등(1994)은 면양의 배반포에 의해 glucose 흡수와 lactate 생산이 증가된다는 사실은 마우스의 배반포에 미치는 아미노산과 비타민의 영향과는 대조적이므로 면양과 마우스의 초기배에 있어 배반포 발생의 특성이 다른 것 때문인 것으로 생각된다고 보고하였다.

Kane(1988)은 inositol, pyridoxins, riboflavin 및 niacinamide와 같은 비타민은 탄수화물대사나 아미노산대사에 조효소로서 필수적인 역할을 하므로 햄스터와 토끼 초기배의 나화를 위한 단순배양액에 비타민의 첨가가 필수적이라고 보고했다.

Kane과 Bavister(1988)는 배양액에 비타민을 첨가했을 때 토끼나 햄스터의 나화 배반포가 증가하였다고 보고했으나, Rosenkrans와 First(1994)는 소 초기배의 발생에 있어 MEM 비타민이 유해한 영향을 미치는 것은 MEM 비타민의 혼합물에 함유되어 있는 비타민의 불균형과 부적합한 농도가 원인인 것으로 추론했다.

본 실험의 결과에서도 배양액에 MEM 비타민 0.5% 첨가구가 대조구에 비해 배반포 발생율이 높은 것으로 나타나 비타민이 배반포 발생율에 좋은 영향을 미치는 것으로 사료된다.

3. hFF의 영향

기본배양액(T₆)에 hFF를 각각 0%(대조구), 2.5%, 5%, 10% 및 20% 농도로 첨가하여 5일간 배양하고, 배반포 단계까지의 배 발달상태를 관찰한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 배반포까지의 배 발달율은 대조구(0%) 20.6%(6/36), 2.5% 첨가구 20.9%(9/43), 5% 첨가구 21.2%(7/33), 10% 첨가구 18.9%(7/37) 및 20% 첨가구 29.4%(10/34)로 배반포까지의 발달율에 있어서 대조구와 비교구 사이에 통계적인 유의차는 인정되지 않았으나, 배 발달율은 20% 첨가구에서 가장 높게 나타났다.

Yanagimachi(1970)와 McNatty 등(1979)은 배양액에 단백질원으로 첨가되는 hFF가 마우스 배의 배반포 발생율을 개선시키며, 이러한 결과는 난모세포의

Table 2. The effects of vitamins on development of 1-cell mouse embryos cultured *in vitro*

Concentration of vitamins (%)	No. (%) of embryos	
	Cultured	Developed to blastocyst
0	39	5(12.8) ^b
0.25	49	11(22.4) ^{ab}
0.5	45	14(31.1) ^a
1	41	9(21.9) ^{ab}
2	42	8(19.0) ^{ab}

^{ab} Means within a column with superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

Table 3. The effects of hFF on development of 1-cell mouse embryos cultured *in vitro*

Concentration of hFF (%)	No. (%) of embryos	
	Cultured	Developed to blastocyst
0	36	6(20.6)
2.5	43	9(20.9)
5	33	7(21.2)
10	37	7(18.9)
20	34	10(29.4)

성장에 물리·생리적 환경이 되는 난포액의 성분이 마우스 수정란의 배 발달에 유효하게 작용하는 것으로 추측할 수 있다고 하였으나, Hung과 Millard(1985)는 난포액에는 초기배 발달을 억제하는 물질을 포함하고 있다고 하였으며, Richards 등(1990)은 사람의 난포액 성분 중에는 마우스 초기배 발달을 억제하는 물질이 있고, 이 난포액의 억제효과는 난자의 발달 잠재성과 관련이 있는 것으로 보고하였다.

김 등(1996)은 마우스 수정란의 체외발달율이 20%의 hFF(94.8%) 첨가구에서 가장 높았으며, 단백질원에 따른 배 발달율은 hFF(93.7%) 첨가구가 제대혈청(81.5%), 모체혈청(83.7%) 및 혈청알부민(81.7%) 첨가구보다 높게 나타났다고 보고하였다. 박 등(1992)은 혈청알부민, 제대혈청 및 난포액 등 각기 다른 단백질원을 함유하는 배양액에서 1세포기 마우스 배를 배반포까지 배양한 결과, 배 발달율은 각각 51.6%, 54.6% 및 68.4%로 본 실험의 결과 보다 좋은 것으로 보고하였으나, 20%의 hFF 첨가구에서 가장 높은 배 발달율을 보인 것은 비슷한 경향이었다.

IV. 적 요

본 실험은 마우스 초기배의 체외배양에 있어서 배양액 첨가제로서 기초배양액에 RPMI 1640 아미노산, MEM 비타민 및 사람의 성숙 난포액(hFF)을 각각 5가지의 농도로 구분하여 첨가했을 경우, 각 첨가제가 배 발달에 미치는 영향과 각 첨가제의 적정 첨가농도를 검토하고자 수행하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 배양액에 RPMI 1640 아미노산을 무첨가, 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 첨가했을 때 배반포 발생율은 각각 35.5%, 54.5%, 65.4%, 48.2% 및 57.4%로 나타났으며, 0.5% 첨가구에서 유의하게 높았다.
2. 배양액에 MEM 비타민을 무첨가, 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 첨가했을 때 배반포 발생율은 각각 12.8%, 22.4%, 31.1%, 21.9% 및 19.0%로 나타났으며, 0.5% 첨가구에서 유의하게 높았다.
3. 배양액에 hFF를 무첨가, 2.5%, 5%, 10% 및 20%의 농도로 첨가했을 때 배반포 발생율은 각각 20.6%, 20.9%, 21.2%, 18.9% 및 29.4%로 나타났으며, 20% 첨가구에서 가장 높았다.

V. 인용문헌

1. Bates, R. D., J. A. Kontio and W. R. Dukelow. 1985. Chemically defined and serum supplemented media effects on mouse embryo development. *Theriogenology*, 23:697-700.
2. Bavister, B. D. 1995. Culture of preimplantation embryos : Factors and artifacts. *Hum. Reprod.*, 1:91-148.
3. Bavister, B. D., M. L. Leibfried and G. Lieberman. 1983. Development of preimplantation embryos of golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.*, 28:235-247.
4. Bavister, B. D. and T. Arlotto. 1990. Influence of single amino acids on the development of hamster one-cell embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 25:45-51.
5. Cha, K. Y., D. H. Choi, J. J. Koo, S. Y. Han and T. K. Yoon. 1990. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil. Steril.*, 51:109-113.
6. Chatot, C. L., C. A. Ziomek, B. D. Bavister, J. L. Lewis and I. Torres. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 86:679-688.
7. Eagle, H. 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130:432.
8. Fakhri, H. and R. Vijayakumar. 1990. Improved pregnancy rates and outcome with gamete intrafallopian transfer when follicular fluids used as a sperm capacitation and gamete transfer medium. *Fertil. Steril.*, 53:515-520.
9. Gardner, D. K. and M. Lane. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Bio. Reprod.*, 48:377-385.
10. Gardner, D. K., M. Lane, A. Spitzer and P. A. Batt. 1994. 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.
11. Gardner, D. K. and M. Sakkas. 1993. Mouse embryo cleavage, metabolism and viability : role of medium composition, *Hum. Reprod.*, 8 : 228-295.
12. Ham, R. G. 1963. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster cell lines. *Exp. Cell Res.*, 29:505-521.
13. Hung, T. T. and M. M. Millard. 1985. Identification of mouse embryo inhibiting factor in the human preovulatory follicular. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61:899-905.
14. Kane, M. T. 1988. The effects of water-soluble vitamins on the expansion of rabbit blastocysts *in vitro*. *J. Expl. Zool.*, 245:220-223.
15. Kane, M. T. and B. D. Bavister. 1988. Vitamins requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 39:1137-1143.
16. Lee, E. S. and Y. Fukui. 1995. Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 44:71-83.
17. McNatty, K. P., D. M. Smith, A. Markris, R. Osathanonch and K. T. Ryan. 1979. The microenvironment of the human antral follicle : Interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 49:851-860.
18. Mehta, T. S. and A. A. Kiessling. 1990. De-

- elopment potential of mouse embryos conceived *in vitro* and cultured in ethylenediamine tetraacetic acid with or without amino acids or serum. Biol. Reprod., 43:660-606.
19. Menezo, Y. J. R. and J. Testart. 1984. Perone serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture and transfer. Fertil. Steril., 42:750-754.
 20. Quinn, P., J. F. Kerin and G. M. Warnes. 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.
 21. Richards, C. W., P. Ruinn, B. A. Stone and R. P. Marr. 1990. Effect of human follicular fluids from pregnant and nonpregnant patients on the development of mouse zygotes *in vitro*. Fertil. Embryo Transfer, 7:22-27.
 22. Rosenkrans, C. F. and N. L. First. 1994. Effect of free amino acids and vitamins of cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. H. Anim. Sci., 72:434-437.
 23. Sanford, K. K., W. R. Earle, V. J. Evans, H. K. Waltz and J. E. Shannon. 1951. The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nucleic. Natl. Cancer Inst., 11:773.
 24. Yanagimachi, R. 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J. Reprod. Fert., 23:193-196.
 25. 김동훈, 지희준, 김지연, 구정진, 장상식, 정길생. 1996. 생식보조기술시 단백질원으로서 인간 난포액의 적합성 및 효율성에 관한 연구 : II. 인간 난포액이 생쥐난포란의 체외성숙에 미치는 효과. 대한불임학회지., 23:95-102.
 26. 박세영, 이정재, 김선행, 구병삼. 1992. 성숙난포액을 이용한 생쥐배아의 발달에 관한 연구. 대한불임학회지., 19:125-131.
- (접수일자 : 1998. 7. 14. / 채택일자 : 1998. 8. 20.)