

동결액에 첨가된 macromolecule 및 EGF, FGF가 vitrification 법으로 동결한 소 수정란의 체외생존성에 미치는 영향

이 은 송 · 福井 豊*

강원대학교 수의학과
일본 오비히로축산대학*
(1998년 2월 13일 접수)

Serum or serum albumin in a vitrification solution and EGF or FGF affect *in vitro* viability of frozen-thawed bovine blastocysts after vitrification

Eun-song Lee · Yutaka Fukui*

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080, Japan*

(Received Feb 13, 1998)

Abstract : Cryopreservation of embryos by vitrification is a simple method to preserve bovine embryos for subsequent embryo transfer, but embryonic viability after vitrification has been inconsistent and low compared with conventional slow freezing. The aim of the present study is to examine the effect of serum or serum albumin in a vitrification solution and epidermal growth factor(EGF) or fibroblast growth factor(FGF) on *in vitro* viability of bovine blastocysts frozen by vitrification.

Bovine blastocysts were produced by *in vitro* maturation, fertilization of follicular oocytes and culture of embryos in a synthetic oviduct fluid medium(SOFM) containing BSA and 19 essential and nonessential amino acids. Blastocysts with excellent or good morphology were selected at 7 or 8 days after culture and utilized for vitrification. In experiment 1, blastocysts were vitrified in a solution containing semi-fetal calf serum(SFCS) or BSA(5 or 10mg/ml) and then their subsequent viabilities were examined by culturing thawed embryos in a SOFM containing BSA and 19 amino acids. Effect of EGF or FGF added to a SOFM containing polyvinyl alcohol(PVA) on the viability of vitrified-thawed blastocysts was investigated in experiment 2.

BSA added at 5 or 10mg/ml to a vitrification solution showed significantly higher($p<0.05$) developmental rate to expanded and hatching blastocysts than SFCS, but there was no significant difference in the developmental rate to hatched blastocysts after thawing. Supplementation of a culture medium with EGF and/or FGF significantly increased($p<0.05$) embryo development to

expanded blastocysts compared with control but showed no beneficial effect on the development to hatching or hatched blastocysts. Coculture of thawed embryos with granulosa cells in a TCM 199 containing 10% fetal calf serum(FCS) showed the highest developmental rate to expanded, hatching and hatched blastocysts among the groups tested.

In conclusion, supplementation of a vitrification solution with BSA at 5mg/ml and culture of thawed blastocysts in a medium containing EGF and/or FGF can improve *in vitro* viability of bovine blastocysts frozen by vitrification.

Key words : vitrification, bovine embryo, *in vitro* fertilization, macromolecule, EGF, FGF.

서 론

소 수정란 이식은 다양한 연구결과를 바탕으로 급속히 발전해 왔으며, 현재에는 세계 각국에서 수정란 이식의 상업적인 응용이 이루어지고 있다^{1,2}. 수정란 이식의 실용화 및 효율성 향상을 위해서는 수정란의 생존성을 유지하면서 안정적으로 보존할 수 있는 보존방법이 요구되는데 현재에는 컴퓨터 동결기를 이용한 완만동결법이 광범위하게 이용되고 있다^{3,4}. 그러나 완만동결법을 위해서는 특수한 동결기가 필요하므로 실험실 이외에서는 간편한 동결이 어렵다는 문제점이 있다. 이에 비해서 vitrification 동결법은 그 과정이 간편하고 단시간내에 야외에서도 즉시 수정란을 동결할 수 있는 장점이 있어 완만동결법의 단점을 보완할 수 있는 새로운 동결법으로 주목되고 있다^{5,6}. 그러나 현재 vitrification 법으로 동결된 수정란의 용해후 체외생존율 및 수란우에 이식후의 수태율은 완만동결된 수정란의 생존율보다 낮은 실정으로 이러한 문제점을 해결하기 위한 연구의 필요성이 인식되고 있다³⁻⁶. Vitrification 동결법에 있어서 동결수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인으로서 동결보호제의 종류, vitrification 동결액내의 평형시간 및 조성, 용해후의 동결보호제의 제거방법 등이 있다⁷⁻⁹. 동결액의 vitrification은 동결액내에 존재하는 polyethylene glycol, sucrose, trehalose 등의 비투과성 동결보호제 또는 BSA, FCS, anti-freeze glycoprotein 등의 존재에 의해 영향을 받게 되며, 이들 물질의 농도 및 동결액의 양, 냉각속도에 따라 vit-

rification 여부가 좌우된다¹⁰. 한편 소의 수정란 이식에 있어서 배반포 수정란은 일반적으로 자궁각 선단부에 이식되는데 포유동물의 생식기 내에서는 alanine, glycine, taurine 등 다양한 아미노산 및 insulin, IGF-I, FGF 등의 성장인자가 분비되며 몇가지 성장인자는 수정란의 배발육을 촉진하는 것으로 보고되었다^{11,12}. 현재까지 vitrification 동결액중의 macromolecule 및 배양액에 첨가된 EGF, FGF 등의 성장인자가 vitrification 법으로 동결한 소 수정란의 용해후의 생존성에 미치는 영향에 대해서는 그 연구결과가 부족한 실정이다^{13,14}.

이에 본 실험에서는 체외수정·체외배양유래 소 배반포수정란의 vitrification 동결법에 있어서 동결액에 첨가된 SFCS 또는 BSA 및 배양액중에 첨가된 EGF, FGF가 vitrification 법으로 동결된 소 수정란의 생존성에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

체외성숙 : 도축장유래 경산우 및 미경산우의 난소로부터 주사기를 이용한 난자흡인법으로 미성숙난자를 채취하였다^{15,16}. 채취한 미성숙난자로부터 4~5층 이상의 치밀한 난구세포가 부착되어 있고 균질한 세포질을 갖는 난자만을 선별하여 체외성숙에 사용하였다¹⁷. 미성숙난자의 채취와 동시에 Moor와 Trounson¹⁸의 방법에 준하여 과립막세포를 채취한 후 0.3%(w/v) BSA, 10mM HEPES 및 2mM NaHCO₃가 포함된 세정용 TCM199 내에 부유시켜 2회 원심·세정하였으며(500×g, 5분) 원심후 50×

10⁶개/ml의 세포부유액을 만들어 과립막세포의 최종농도가 2×10⁶개/ml가 되도록 성숙용 배양액내에 첨가하였으며, 성숙배양시작전 15~30분간 전배양하였다. 체외성숙에는 4-well dish(Nunclon, Denmark)를 이용하였으며, 10% FCS(Mitsubishi Kasei, Japan), 돼지 뇌하수체 전엽성 호르몬 0.02AU/ml(Antrin®, Denka, Japan) 및 1µg/ml estradiol을 첨가한 TCM199 (Dainippon, Japan)을 배양액으로 이용하였다. 미성숙난자를 세정용 TCM199으로 3회 세정후 성숙용 TCM199으로 1회 세정하여 과립막세포가 첨가된 4-well dish의 한 well에 30~40개를 넣어 39℃, 5% CO₂, 95% 공기 및 95% 이상의 습도조건을 갖춘 배양기(CO₂ 배양기)내에서 24시간 성숙배양하였다.

체외수정 : 정자의 준비 및 체외수정은 modified Tyrode's medium(mTALP)^{19,20}을 기본배양액으로 Parrish *et al*²¹의 방법에 준하여 실시하였다. 난자의 성숙배양 22시간후에 소 동결정액을 37℃의 온수에 용해하여 정자의 운동성을 확인한 후 Pasteur pipette으로 1ml의 수정능 획득용 mTALP가 들어있는 9~10개의 플라스틱 시험관(Becton Dickinson Labware, USA)의 저부에 약 0.2ml의 정액을 분주하여 CO₂ 배양기내에서 1시간 swim-up 처리하였다. Swim-up 종료후 운동성이 활발한 정자를 포함하는 시험관 상층액 약 0.8ml를 흡인하여 원심관에 모은 후 2회 원심·세정하였으며(500×g, 5분), 혈구계산관으로 정자의 수를 산정하여 50×10⁶ sperm/ml가 되도록 정자부유액을 작성하였다. 정자부유액에 동량의 200µg/ml heparin(Sigma Chemical Co., USA) 용액을 첨가하여 CO₂ 배양기내에 15분간 정치함으로써 수정능 획득을 유도하였다. 체외수정을 위하여 플라스틱 petri dish(60×15mm, Becton Dickinson Labware, USA)에 수정용 mTALP로 43µl의 미소적을 만든 후 미네랄 오일(Sigma Chemical Co., USA)을 도포하여 CO₂ 배양기내에 정치하였다. 성숙배양 23시간째에 체외성숙난자를 회수하여 세정용 mTALP로 3회 세정한 후 4~6개의 난자를 3µl의 배양액과 함께 흡인, 미리 작성해둔 수정용 미소적내에 주입하였으며 여기에 정자농도가 2×10⁶ sperm/ml가 되도록 정자부유액 4µl를 첨가하여 5% CO₂ 배양기내에서 30시간 체외수정하였다²².

체외배양 : 배양액은 BSA 농도를 8mg/ml로 낮춘 합성 난관배양액²³을 기초배지로 여기에 2%(v/v) Minimum Essential Medium(MEM) 필수아미노산 및 1%(v/v) MEM 비필수아미노산(Life Technologies Inc., USA)을 첨가하여 사용하였다. 체외수정 30시간후 난자를 회수하여 10mM

HEPES 및 2mM sodium bicarbonate가 포함된 세정용 SOFM 내에서 가볍게 pipetting 함으로써 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였으며, 분할된 수정란만을 선별하여 배반포 생산을 위한 체외배양에 사용하였다. 체외배양은 미리 작성해둔 30µl의 SOFM 미소적에 4~6개의 수정란을 넣어 39℃, 5% CO₂, 7% O₂, 88% N₂ 및 습도가 포화상태인 배양기내에서 수정후 8일간 배양하였으며 체외배양후 7일 및 8일째에 배반포로 발육한 수정란을 회수하여 동결실험에 사용하였다.

Vitrification에 의한 수정란의 동결 및 융해 : 수정후 7일 및 8일째에 회수한 배반포 수정란을 Lindner와 Wright²⁴의 방법에 준하여 형태학적으로 분류하였으며, excellent 및 good 등급의 수정란만을 vitrification 동결에 사용하였다. 배반포를 20% SFCS(Mitsubishi Kasei, Japan)가 첨가된 Dulbecco's PBS(D-PBS; Life Technologies Inc.)로 2회 세정한 후 vitrification 법으로 동결하였다²⁵. 먼저 배반포 수정란을 10% glycerol(Waco, Japan) 및 20% SFCS가 포함된 D-PBS에 넣어 실온에서 5분간 정치시킨 후 1M sucrose(Sigma), 30% ethylene glycol(Waco, Japan) 및 20% SFCS 또는 BSA(5, 10mg/ml)로 구성된 vitrification 동결액내에서 30~40초간 평형시켰다. 그후 1~5개의 수정란을 0.25ml의 straw에 흡인하여 봉하고(Fig 1) 직접 액체질소에 침지하여 동결하였다. 액체질소내에서 1일~5개월간 보존후 수정란이 들어있는 straw를 꺼내어 공기중에서 약 5초, 37℃ 온수에 10초간 노출시켜 용해한 후 straw를 흔들어서 내부의 동결액을 sucrose 및 난황이 들어있는 희석액과 혼합하였다. Straw로부터 수정란을 회수한 후 0.5M sucrose, 20% SFCS 및 5% 난황이 첨가된 D-PBS에 넣어 실온에서 10분간 정치하였으며, 다시 수정란을 20% SFCS 및 5% 난황이 첨가된 D-PBS에서 10분간 정치함으로써 동결보호제를 제거하였다. 동결보호제 제거후 20% SFCS 첨가 D-PBS로 2회 세정하였으며, 수정란의 체외 생존성을 확인하기 위하여 실험설계에 따라 BSA 또는 PVA 및 19종류의 MEM 필수·비필수아미노산이 포함된 SOFM으로 30µl의 미소적을 만들고 여기에 4~5개의 수정란을 넣어 39℃, 5% CO₂, 7% O₂, 88% N₂ 및 습도가 포화상태인 배양기내에서 3일간 배양하였다. 실험 2에서는 실험 1의 결과를 바탕으로 vitrification 동결액에 5mg/ml의 BSA를 첨가하여 사용하였으며, positive control인 과립막세포 공배양군은 10% FCS를 포함한 TCM 199을 배양액으로 하여 5% CO₂ 및 95% 공기의 기상조

건하에서 수정란을 배양하였다. 배양개시후 24시간 간격으로 수정란을 관찰하여 재확장된 배반포상을 가지며 정상적인 형태를 지닌 수정란 및 부화배반포로 발육한 수정란을 생존한 것으로 판정하였다.

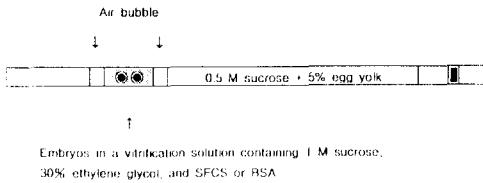


Fig 1. Diagram of a straw for embryo freezing by vitrification.

실험설계 : 실험 1에서는 20% SFCS 또는 5, 10mg/ml의 BSA가 첨가된 vitrification 동결액으로 수정란을 동결하여 이들 macromolecule이 용해후 수정란의 생존성에 미치는 영향을 검토하였다. 실험 2에서는 vitrification 법으로 동결된 수정란을 용해후 MEM 필수·비필수아미노산 및 PVA가 첨가된 SOFM에 EGF(Boehringer Mannheim GmbH, Germany; Cat No 1376454) 또는 FGF(Boehringer Mannheim GmbH, Germany; Cat No 1104616)를 첨가하여 수정란을 배양함으로써 EGF, FGF가 수정란의 생존성에 미치는 영향을 조사하였다.

통계학적 분석 : 각 실험에 있어서 동결·용해 수정란의 확장배반포 및 부화중 또는 부화배반포로의 체외발육률은 Statistical Analysis System(SAS)²⁶의 Categorical Data Modeling procedure를 이용하여 각 처리군간의 유의성을 검정하였다.

결 과

Vitrification 동결액에 첨가되는 macromolecule의 효과를 검토하기 위하여 20% SFCS 및 5, 10mg/ml의 BSA를 첨가한 동결액으로 배반포 수정란을 동결, 용해하여 생존성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Macromolecule로서 5mg/ml 또는 10mg/ml의 BSA를 첨가한 군은 각각 87%, 80% 및 60%, 43%의 확장배반포 및 부화배반포로의 발육률을 보여 SFCS를 첨가하여 동결한 수정란의 60% 및 20%에 비해 유의적으로 높은 생존성을 나타내었으나($p < 0.05$), 부화배반포로의 발육률은 세 군간에 유의적인 차이가 인정되지 않았다.

한편 배양액중에 첨가된 EGF 및 FGF가 vitrification법

Table 1. Effect of serum or serum albumin added to a vitrification solution(VS) on *in vitro* viability of frozen-thawed bovine blastocysts

Macromolecule in VS	No. of blastocysts vitrified ^a	No. (%) of blastocysts		
		Expanded	Hatching	Hatched
SFCS(20%)	45	27(60) ^b	9(20) ^b	9(20)
BSA(5mg/ml)	45	39(87) ^c	27(60) ^c	15(33)
BSA(10mg/ml)	51	41(80) ^c	22(43) ^c	12(24)

^a Three replicates.

^{bc} Different superscripts in the same column differ significantly($p < 0.05$).

으로 동결된 소 수정란의 체외생존성에 미치는 영향을 검토한 결과 EGF, FGF를 단독 및 동시첨가한 군이 각각 82%, 73% 및 73%의 확장배반포로의 발육률을 보여 대조군의 39%에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타내었으나($p < 0.05$) 부화중 및 부화배반포로의 발육률에는 유의적인 차이가 없었다. 과립막세포 공배양군(positive control)은 각각 40% 및 40%의 확장배반포 및 부화배반포로의 발육률을 나타내 다른 모든 군에 비해 유의적으로 높은($p < 0.05$) 생존성을 보였다(Table 2).

Table 2. *In vitro* viability of frozen-thawed bovine blastocysts cultured in a medium containing EGF and/or FGF after thawing

Treatment	No. of blastocysts vitrified ^b	No. (%) of blastocysts		
		Expanded	Hatching	Hatched
Gr-cell ^a (TCM199)	47	42(89) ^c	19(40) ^c	19(40) ^c
Control (SOFM+PVA)	46	18(39) ^d	9(20) ^d	9(20) ^d
EGF(20ng/ml)	49	40(82) ^c	13(27) ^{cd}	5(10) ^d
FGF(1ng/ml)	49	36(73) ^c	9(18) ^d	4(8) ^d
EGF+FGF	48	35(73) ^c	17(35) ^{cd}	5(10) ^d

^a Granulosa cells.

^b Three replicates.

^{bc} Different superscripts in the same column differ significantly($p < 0.05$).

고 찰

Vitrification 동결법은 소 수정란 이식의 실용화 및 효율성을 증가시키기 위한 방법으로 활발히 연구되어 왔다³⁻⁶. 현재 vitrification 동결액에는 macromolecule로서 혈

칭이나 다양한 농도(0.3%~6%)의 BSA가 첨가되어 사용되고 있으나^{9,25,27} 혈청 및 BSA의 첨가량이나 농도는 연구자에 따라 다양하며, 동일한 vitrification 동결법을 이용하여 이들 macromolecule이 용해후의 생존성에 미치는 영향을 검토한 연구결과는 많지 않다.

배양액에 첨가되는 동물의 혈청 및 혈청알부민은 배양환경중의 독성물질을 제거하거나 수정란의 발육에 이로운 호르몬, 성장인자 등의 물질을 제공함으로써 수정란의 발육을 촉진하는 작용이 있으며^{28,29}, 액체의 동결과정에 있어서 vitrification 가능성을 증가시키는 것으로 보고되었다¹⁰. 한편 배발육에 대한 혈청 및 혈청알부민의 효과를 검토한 결과를 보면 혈청에는 각종 호르몬, 아미노산 및 성장인자가 포함되어 있으며 또한 수정란 또는 세포의 증식을 저해하는 물질도 포함되어 있는 것으로 알려져 있다^{30,31}. 소에 관한 혈청의 효과로서 Pinyopumintra와 Bavister³⁰는 혈청이 소 수정란의 제1분열을 억제하나 상실배 및 배반포의 발육을 촉진한다고 하였으며, Gardner *et al*³², McGowan *et al*³³은 혈청이 포함된 배양액에서 발육한 배반포 수정란은 영양막세포에 지질과 유사한 미소적이 침착되어 검게 보이며, 동결용해후의 생존성이 저하된다고 보고하였다. BSA에 관해서 Kane과 Headon²⁹은 BSA가 배양액내에 존재하는 독성물질을 흡착함으로써 발육환경을 개선하고 BSA에 포함될 수 있는 성장인자 또는 저분자량 물질이 수정란의 발육을 촉진한다고 보고하였다. 본 실험에서 vitrification 동결액중에 첨가된 SFCS와 BSA의 영향을 검토한 결과 SFCS보다는 BSA를 첨가하여 수정란을 동결하는 것이 용해후 생존성을 유지하는데 있어 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 동결보존액내에서의 평형과정 및 vitrification 과정에서 사용된 혈청이 수정란의 생존성에 직접 영향을 미쳤는지 또는 혈청성분이 vitrification 과정 자체에 영향을 미쳤는지는 확실하지 않다. 혈청내에는 그 성분을 명확히 알 수 없는 많은 성분이 포함되어 있는데 혈청이 포함된 배양액에서 발육한 수정란은 체내유래 수정란에 비해 지질함량이 높으며³⁴, 세포내 지질함량이 높을 경우 동결·용해후 수정란의 생존성이 저하된다고 보고되었다³⁵. 본 실험에서 혈청 첨가군에서 낮은 생존성을 보인 원인은 정확히 알 수 없으나 혈청내 성분이 동결과정중 수정란의 대사 또는 vitrification 과정을 변화시켜 생존성에 영향을 미친 것으로 추측된다.

동결수정란을 용해후 EGF 및 FGF를 첨가한 배양액에

배양한 결과 EGF 및 FGF의 단독, 동시첨가시 확장배반포로의 발육률이 유의적으로 증가하였다. 이 결과는 직접적으로 비교할 수는 없으나 EGF가 마우스 수정란의 체외발육을, EGF 및 FGF가 소 수정란의 체외발육을 증가시켰다는 선인들의 보고^{36,37}와 일치하였다. 과립막세포나 난관상피세포와 같은 체세포도 아미노산, 성장인자 등 배발육을 촉진시키는 물질을 분비하며, 배양액에 첨가된 혈청은 소 수정란의 부화를 촉진시킨다고 알려져 있다³⁸. 본 실험에서 FCS가 포함된 TCM199으로 과립막세포와 공배양한 군은 다른 모든 군에 비해 유의적으로 높은 확장배반포 및 부화배반포로의 발육률을 나타내어 선인들의 연구결과와 일치하였다. 소 동결·용해 수정란에 있어서 EGF 및 FGF 수용체의 존재 및 세포와의 결합여부, 동결액내의 BSA의 최적 첨가농도 및 vitrification 법으로 동결된 수정란의 체내이식후의 수태율에 관해서는 앞으로 더욱 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

소 배반포 수정란의 동결보존에 있어서 vitrification 동결액중의 혈청이나 혈청알부민의 첨가 및 EGF, FGF가 vitrification 법으로 동결된 소 수정란의 용해후 생존성에 미치는 영향을 검토하였다. Vitrification 동결액에 첨가되는 macromolecule로서 BSA를 첨가시 확장배반포 및 부화중 배반포로의 발육이 증가되어 SFCS를 첨가한 경우보다 유의적으로 높은 체외생존성을 나타내었다. 또한 vitrification 법으로 동결된 수정란을 용해후 체외에서 배양한 결과 과립막세포와 공배양한 경우가 실험군중에서 가장 높은 생존성을 나타내었으며, 단순합성배지에 첨가된 EGF 및 FGF는 무첨가군에 비해 확장배반포로의 발육을 유의적으로 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 vitrification 동결액의 macromolecule로서는 SFCS 보다는 BSA를 첨가하는 것이 효과적이며, EGF 및 FGF는 동결수정란의 용해후 생존성을 증가시키는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Evans G. Application of reproductive technology to the Australian livestock industries. *Reprod Fert Dev*,

- 3:627-650, 1991.
2. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, *et al.* Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-152, 1995.
 3. Han YM, Yamashina H, Koyama N, *et al.* Effect of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. *Theriogenology*, 42:645-654, 1994.
 4. Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, *et al.* Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology*, 48:563-579, 1997.
 5. Lee ES, Okamoto Y, Yamashina H, *et al.* Pregnancy rates after transfer of fresh or frozen bovine blastocysts developed from serum-free or protein-free media. *Theriogenology*, 47:350, 1997.
 6. Ohboshi S, Etoh T, Sakamoto K, *et al.* Effects of bovine serum proteins in culture medium on post-warming survival of bovine blastocysts developed *in vitro*. *Theriogenology*, 47:1237-1243, 1997.
 7. Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Van Vlaenderen I, *et al.* A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on *in vitro* survival of vitrified bovine embryos. *Theriogenology*, 39:1291-1302, 1993.
 8. Palasz AT, Gustafsson H, Rodriquez-Martinez H, *et al.* Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. *Theriogenology*, 47:865-879, 1997.
 9. van Wagtenonk-de Leeuw AM, den Daas JHG, Rall WF. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, 48:1071-1084, 1997.
 10. Arav A. Vitrification of oocytes and embryos. In Lauria A, Gandolfi F eds, *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*, Portland Press, London:255-264, 1992.
 11. Gandolfi F, Brevini TAL, Modena S, *et al.* Role of the oviduct during early embryogenesis. *Reprod Dom Anim*, 28:189-192, 1993.
 12. Watson AJ, Watson PH, Arecellana-Panlilio M, *et al.* A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. *Biol Reprod*, 50:725-733, 1994.
 13. Willemsen D, Palma GA, Wolf E. Vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos after culture in medium supplemented with insulin-like growth factor-I(IGF-I). *Theriogenology*, 43:352, 1995.
 14. Palasz AT, Del Campo MR, Mapletoft RJ. The effect of macromolecules in an ethylene glycol/sucrose medium for the vitrification of *in vivo*-derived bovine blastocysts. *Theriogenology*, 45:167, 1996.
 15. Lee ES, Fukui Y. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acids uptake by *in vitro* produced bovine morulae and blastocysts. *Biol Reprod*, 55:1383-1389, 1996.
 16. 노상호, 이병천, 황우석. Glucose가 소 초기배의 분할 및 발육에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 12:161-169, 1997.
 17. Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ, *et al.* Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 26:222-226, 1990.
 18. Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fert*, 49:101-109, 1977.
 19. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology*, 24:537-549, 1985.
 20. Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 26:40-46, 1990.
 21. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, *et al.* Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 5:591-600, 1986.
 22. Lee ES, Fujii Y, Fukui Y. A comparative study on de-

- velopmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 45:1151-1162, 1996.
23. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fert*, 30:493-497, 1972.
 24. Lindner GM, Wright Jr RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20:407-416, 1983.
 25. Kuwayama M, Tasaka M, Hamano S. In straw dilution of bovine IVF-blastocysts cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 41:231, 1994.
 26. SAS User's Guide: Statistics, Version 6, Cary, NC: Statistical Analysis System Institute Inc, 1990.
 27. Saha S, Takagi M, Boediono A, *et al*. Direct rehydration of *in vitro* fertilized bovine embryos after vitrification. *Vet Rec*, 134:276-277, 1994.
 28. McLaughlin KJ, McLean DM, Stevens G, *et al*. Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. *Theriogenology*, 33: 1191-1199, 1990.
 29. Kane MT, Headon DR. The role of commercial bovine serum albumin preparations in culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. *J Reprod Fert*, 60:469-475, 1980.
 30. Pinyopummintr T, Bavister BD. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod*, 45:736-742, 1991.
 31. Falloon MN, Rammell CG, Hoogenboom JJJ. Amino acids in bovine sera. *NZ Vet J*, 36:96-98, 1988.
 32. Gardner DK, Lane M, Spitzer A, *et al*. 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, 1994.
 33. McGowan LT, Wells RW, Pugh PA, *et al*. Culture conditions affect the freezability of *in vitro* produced cattle embryos. *Proc Aust Soc Reprod Biol*, 25:66, 1993.
 34. Greve T, Avery B, Callesen H. Viability of *in-vivo* and *in-vitro* produced ovine embryos. *Reprod Dom Anim*, 28:164-169, 1993.
 35. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman R, *et al*. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*, 41:113-118, 1994.
 36. Lee ES, Fukui Y. 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, 1995.
 37. Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:4756-4760, 1990.
 38. Zhang L, Flood MR, Bunch TD, *et al*. Evaluating bovine oviduct cells used in combination with bovine cumulus cells to co-culture IVF-derived bovine embryos *in vitro*. *Proc 12th Congr Anim Reprod & Artif Insem*, 3:1375-1377, 1992.