

체외에서 생산된 한우 배반포의 발달에 미치는 삼투압의 효과

김재영 · 조영호 · 공건오¹ · 윤산현² · 이상민³ · 이상진⁴ · 송혜범¹ · 박홍대[†]
대구대학교 생물공학과

Effect of Hypertonic Solution on *In Vitro* Development of Hanwoo Blastocysts Produced *In Vitro*

J. Y. Kim, Y. H. Cho, K. H. Kong¹, S. H. Yoon², S. M. Lee³,
S. J. Lee⁴, H. B. Song¹ and H. D. Park[†]

Department of Biotechnology, Taegu University, Kyungsan 712-714, Republic of Korea

SUMMARY

This study was conducted to enhance the efficiency of embryo transfer and embryos produced *in vitro* according to select good quality blastocyst among *in vivo* or *in vitro* produced embryos.

After middle blastocyst(MB) and late blastocyst(LB) stages embryos that developed *in vitro* for 7~8 days were treated hypertonic solution(380 mOsm or 600 mOsm) and the rate of development to hatched blastocyst(HB) was examined. The results obtained were summarized as follows:

The proportion of embryos developed to HB was higher than that of control regardless of hypertonic solution treatment. However, it was related to culture time in hypertonic solution.

The proportion of embryos developed to HB of morphologically recovered embryos in 380 mOsm solution was higher than that of morphologically shrunk embryos. However, treatment time was not significantly different the rates of HB development. Especially, the proportion of embryos developed to HB of morphologically recovered embryos of the 30-min-treated group was significantly higher than that of control ($p < 0.05$).

The results suggest that hypertonic solution treatment should enhance the efficiency for criterion of transferable blastocyst quality.

(Key words: development, blastocyst, hypertonic, bovine)

서 론

체외에서 소 수정란의 적절한 배양방법의 개발

(Ball 등, 1984; Fukuda 등, 1988; Sirard 등, 1988)에 의해 오늘날은 도축된 소의 난소로부터 난포란을 회수하여 체외에서 성숙, 수정 그리고 배양을 통해 이식 가능한 배반포기 배를 생산하게 되었고,

본 연구는 1998년도 학술진흥재단의 연구지원에 의해 수행되었음

¹대구대학교 축산학과(Department of Animal Science, Taegu University)

²마리아 기초의학연구소(Maria Obstetrics and Gynecology)

³하나병원(Hana Women's Hospital)

⁴삼육대학교 동물자원학과(Department of Animal Science, Sahmyook College)

[†] Correspondence

(Hawk와 Wall 등, 1994; Lee 등, 1996) 나아가서 성장인자(Darkys 등, 1993; Flood 등, 1993; Yang 등, 1993), 아미노산(Rosenkrans 등, 1991), 비타민(Rosenkrans 등, 1991), 에너지원(Kim 등, 1993; Takahashi 등, 1993; Thompson 등, 1993)과 같은 영양분을 첨가한 배지의 개발, glucose(Thompson 등, 1991; Matsuyama 등, 1993)와 phosphate(Conaghan 등, 1993)의 유해성이 검정되어 이들 물질이 함유되지 않은 간단한 배양액의 개발(CR1aa: Rosenkrans 등, 1990; Rosenkrans와 First, 1991; SOF: Fukui 등, 1991; Carolan 등, 1995; CZB: Martino 등, 1996) 등에 의해 이식가능한 배반포를 20~40%로 일정하게 생산하게 되었다(Lee 등, 1996). 이렇게 생산된 배반포를 실제 수란우의 자궁에 이식하여 약 30~40% 정도가 임신에 성공하였다(Kajihara 등, 1992; Reichenbach 등, 1992; Van Soom 등, 1994; 박 등, 1999) 그러나 일반적인 방법으로 체외생산된 배반포를 광학현미경으로 관찰하였을 경우 의견상으로는 할구의 파괴나 변형이 없을지라도 이미 발육능력 및 대사작용이 현저히 저하된 것들이 존재한다(Massip 등, 1993). 이러한 배를 이식하였을 경우 착상에는 성공할지 몰라도 높은 유산율을 나타내고 있다(Overstr, 1996). 따라서 수정란 이식을 위한 양질의 배반포 선별의 필요성을 인식하여 많은 연구가 수행되고 있지만(Frank 등, 1986; Didion 등, 1990), 실제 현장에서는 적용되지 못하고 있는 실정이다.

한편 체외에서 생산된 배반포의 품질은 현미경에 의한 할구의 분포상태, 투명도 등의 형태적인 평가(Linder와 Wright, 1983)와, 염색에 의한 배반포의 세포수(Papaioannou와 Ebert, 1988) 및 배반포의 부화율 등의 질적인 평가방법이 있다. 이들 방법중 형태적인 평가방법은 연구자의 주관에 의존될 수 있는 문제점이 있고, 염색에 의한 평가는 배반포의 생존성 및 배반포의 부화는 현장적용의 불가능 등의 문제가 지적되고 있다. 따라서 체외생산된 배반포 중에서 높은 생존율과 이식가능한 양질의 배반포를 객관적으로 정확하게 선별할 수 있는 방법을 개발하여 체외수정란의 생산효율과 이식에 의한 가축생산의 효율성이 증진됨으로써 수정란이식의 산업화가 이루어질 것이다.

본 연구에서는 체외성숙·수정된 한우의 수정란으로부터 생산된 배반포의 품질을 객관적으로 판단할 수 있는 방법개발의 일환으로서 고삼투압 용액으로 배반포를 처리한 후 배 발생율을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수 및 체외성숙

경상남도 울주군 언양읍에 소재한 화신산업에서 도축된 한우로부터 난소를 수집하여 25 mg/ml gentamycin 함유 30~33°C의 생리식염수가 들어 있는 보온병에 담아, 도축 후 2~4시간 이내 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 2~3회 세척하여 난소에 존재하는 이물질을 제거한 후, 18 gauge 주사침이 부착된 1회용 10 ml주사기를 이용하여 직경 2.0~5.0 mm의 가시난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 난포란의 회수용 배지로서는 25 mM HEPES와 3 mg/ml의 Fraction V-BSA 첨가 TALP 용액을 이용하였다. 회수한 난포란 중 난구세포가 치밀하고 세포질이 균일한 것만(Wiemer 등, 1991)을 실험현미경(×80)하에서 선별하여 35×10 mm petri dish (Falcon, 3001)에 mineral oil로 피복된 전배양했던 0.2 mg/ml pyruvate, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco 26140-079), 1 μg/ml follicle stimulating hormone 함유 50 μl의 TCM199(Gibco, 12340-030) 용액에 15~20개씩 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 난포란의 체외성숙을 유도하였다.

2. 체외성숙 난포란의 체외수정

한우 동결정액 1~2 straw를 실온에서 10초간 방치 후, 37°C 항온수조에 30초간 침지하여 용해하였다 용해된 정액을 15 ml 원심분리관(Falcon, 2097)에 담겨져 있는 80% percoll 3 ml 용액 위에 조심스럽게 놓았다 2,000 rpm, 20분간 원심분리 후 하층부의 정자과만을 회수하였다. 회수한 정자과를 10 μg/μl heparin과 6 mg/ml BSA(Sigma, A9647) 첨가 TALP(Fer-TALP)용액으로 2회 원심분리(1,000 rpm, 10분)하여 세척 후, 정자능도가

2.5×10^6 cells/ml이 되도록 조절하였다. 한편 형태적으로 난구세포가 확장된 난포란만을 선별하여 0.03% hyaluronidase 첨가 Fer-TALP 용액으로 처리하여 난구세포를 제거하고, 체외수정에 제공하였다.

체외수정은 35×10 mm petri dish에 mineral oil로 피복된 46 μ l의 Fer-TALP용액에 10~15개씩의 난포란을 넣어 2 μ l의 heparin(10 μ g/ml)과 최종 정자농도가 1×10^6 cells/ml가 되도록 미리 준비된 정자 2 μ l를 첨가하여, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

3. 체외수정란의 체외배양

체외수정란의 체외배양용 기초 배지는 마리아 병원 불임연구실에서 시험관아기 생산시 이용하는 YS(윤 등, 1994)용액이며, FBS와 human follicle fluid(hFF)를 각각 첨가하여 사용하였다. hFF는 마리아병원으로부터 일반적인 방법에 준하여 생산된 것을 제공받았다. 체외수정 후 22~24시간째에 실험미경하에서 극체의 유무와 관계없이 형태적으로 정상이라고 판단한 것만을 회수하여, 20% hFF 함유 YS 용액으로 2~3회 세척한 후, 미리 준비한 50 μ l 용액에 10~15개씩 난자를 넣고 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양(day 1)하였다. day 3에 4~8 세포기의 배를 10% hFF와 10% FBS 함유 YS 용액, 10 μ l에 배지의 교환없이 배양하였다. day 7과 8에 형성된 배반포 중 원래의 투명대 크기와 같고, 포배강이 50% 이상 형성된 것을 middle blastocyst(MB), 원래의 투명대 크기보다 1.5배 크고 포배강이 100%정도 형성된 것을 late blastocyst(LB)로 평가하여 실험에 공시하였다.

4. 체외생산 배의 삼투압 처리

체외에서 생산된 MB와 LB의 배를 NaCl로 삼투압이 380 mOsm과 600 mOsm로 조정된 PBS용액으로 처리하였다. 처리시간은 MB를 각각의 삼투압용액에 처리하였을 때 수축현상이 일어나기 시작하는 시간의 각각 3배와 6배에 해당한다(Fig. 1). 한편, 배를 각각의 삼투압 용액으로 처리한 후 세척하는 과정에서 배가 형태적으로 회복되는 것들과 회복되지 않은 것들을 구분(Fig. 1)하여 10%

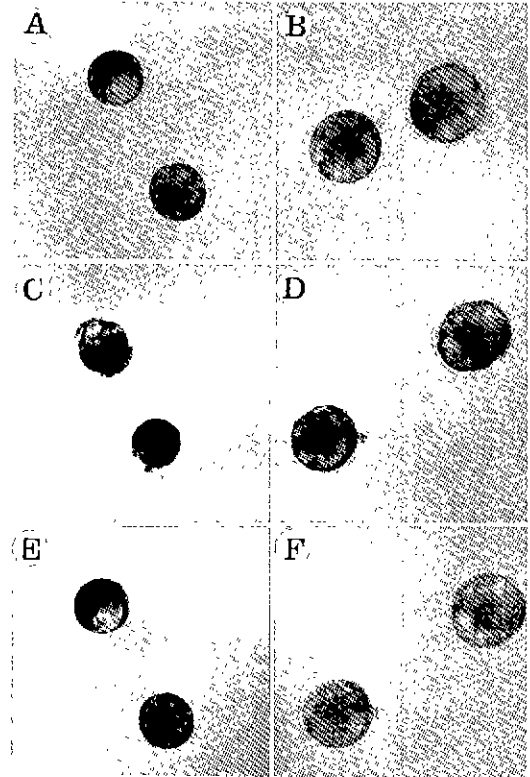


Fig 1. Treatment in hypertonic solution of bovine embryos(×100)

- A: MB
- B: LB
- C: Shrunked ≤MB
- D: LB after hypertonic solution (380 mOsm 15 min or 600 mOsm 6 min).
- E: Morphological recovery ≤MB
- F: LB after washing

FBS와 10% hFF가 첨가된 10 μ l YS용액에 배양하여 부화배반포로의 발달을 관찰하였다.

5. 통계처리

실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test 를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

1. MB의 고삼투압처리 효과

배양 7일째에 형성된 MB를 380 mOsm, 600

mOsm용액에 각각 15분, 6분간 처리하였다. 처리 시간은 각각의 용액에서 수축이 일어나기 시작하는 시간의 3배에 해당하는 시간이다. 처리 후 LB 또는 HB로의 배발달율의 결과는 Table 1과 같다.

380 mOsm 용액에서의 LB 및 HB로의 발달율은 각각 39.3%(11/28) 및 14.3%(4/28)로서, 대조구의 38.5% 및 7.7%와 거의 비슷하였다. 그리고 LB 중 HB로의 발생율은 36.4%(4/11)로서 대조구의 20.0% 보다 약간 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다. 한편 형태적으로 회복된 구에서의 LB, HB, HB/LB로의 발달율은 각각 40.0%(10/25), 16.0%(4/25), 40.0%(4/10)로서 회복되지 않은 구의 각각 33.3%(1/3), 0.0%(0/3), 0.0%(0/0)보다는 상승하였다.

600mOsm 용액에서의 LB 및 HB로의 발달율은 각각 50.0%(14/28) 및 28.6%(8/28)로서, 대조구보다 높았지만 유의차는 인정되지 않았다. 그리고 LB중 HB로의 발달율도 57.1%(8/14)로서 대조구보다 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다. 한편 형태적으로 회복된 구에서의 LB, HB, HB/LB로의 발달율은 각각 56.3%(9/16), 25.0%(4/16), 44.4%(4/9)로서 회복되지 않은 구의 각각 41.7%(5/12), 33.3%(4/12), 80.0%(4/5)보다 낮았다. 특히 회복되지 않은 구의 HB/LB로의 발달율은 대조구보다도 유의하게 높았다.

일반적으로 배반포의 품질을 평가하는 데 있어

서 지금까지의 방법은 실제 수정란이식의 현장에서 이용하는 데에는 여러 가지 문제점을 내포하고 있다. 그러나 본 실험에서는 배반포의 부화율로서 품질을 평가하였다 고삼투압 용액으로 MB를 처리하였을 경우는 수축현상에 의해 배반포의 부화율에 상당한 영향을 미친다는 것을 알 수 있으며, 비록 발생단계에 따라 다르지만, 배의 발달에 고삼투압용액의 처리는 난자의 생리활성에 있어서 어떤 자극을 가함으로 효과적이라고 한 보고를 (Overstrom, E W 등, 1989; Anbari, K 등, 1993; Ho 등, 1994) 간접적으로 증명할 수 있기 때문에 고삼투압 용액의 처리는 배의 품질을 객관적으로 평가할 수 있는 방법이라고 사료된다. 한편 600mOsm 용액처리에서 회복되지 않은 구에서의 배반포의 부화율이 높았던 것은 배의 수축과정에서 세포막의 손상(Pedro 등, 1997)의 영향 때문일 것이라고 생각한다.

2. MB에 삼투압용액의 처리 시간에 따른 효과
 체외수정 후 7일째에 형성된 MB를 380mOsm용액에 15분, 30분간 처리하였을 경우 배발달율의 결과는 Table 2와 같다.

15분 처리구에서의 LB 및 HB로의 발달율은 각각 44.0%(11/25) 및 20.0%(5/20)로서, 대조구의 40.9% 및 18.2%와 비슷하였다. 그리고 LB 중 HB

Table 1. Effect of different hypertonic solutions on *in vitro* development of MB stage bovine embryos

Treated solution (mOsm)	Treated time (min.)	No. of examined MB	No. of morphologically recovered embryos(%)		No.(%) of embryos developed to		HB/LB(%)
					LB	HB	
Control		26			10(38.5) ^a	2(7.7) ^a	2/10(20.0) ^a
380	15	28	+	25	10(40.0) ^a	4(16.0) ^{ab}	4/10(40.0) ^{ab}
			-	3	1(33.3) ^a	0(0.0) ^{ab}	0/ 1(0.0) ^{ab}
			total	28	11(39.3) ^a	4(14.3) ^{ab}	4/11(36.4) ^{ab}
600	6	28	+	16	9(56.3) ^a	4(25.0) ^{ab}	4/ 9(44.4) ^{ab}
			-	12	5(41.7) ^a	4(33.3) ^b	4/ 5(80.0) ^b
			total	28	14(50.0) ^a	8(28.6) ^{ab}	8/14(57.1) ^{ab}

¹⁾ + recovered, - not recovered

²⁾ MB middle blastocyst, LB late blastocyst, HB: hatched blastocyst

^{ab} Values with different superscripts in the same column were significantly different(p<0.05)

로의 발달율은 45.5%(5/11)로서 대조구의 44.4%와 비슷하였다. 한편 형태적으로 회복된 구에서의 LB, HB, HB/LB로의 발달율은 각각 53.3%(8/15), 26.7%(4/15), 50.5%(4/8)로서 회복되지 않은 구의 각각 30.0%(3/10), 10.0%(1/10), 33.3%(1/3)보다는 상승하였다.

30분 처리구에서 LB 및 HB로의 발달율은 각각 28.0%(7/25) 및 20.0%(5/20)로서, 대조구와 비슷하였다. 그리고 LB 중 HB로의 발달율은 71.4%(5/7)로서 대조구보다 상승 비슷하였다. 한편 형태적으로 회복된 구에서의 LB, HB, HB/LB로의 발달율은 각각 25.0%(4/16), 21.4%(3/16), 75.5%(3/4)로서 회복되지 않은 구의 각각 33.3%(3/9), 22.2%(2/9), 66.6%(2/3)와 비슷하였다.

고삼투압용액에 배반포를 처리하였을 경우 배의 형태적인 회복과 관계없이 LB 또는 HB로의 발생이 가능하였다. 이것은 아마도 처리 후 회복되는 시간의 차이라고 생각한다. 그러나 Pedro 등(1997)과 Yang 등(1990)은 배를 고삼투압용액으로 처리할 경우 과도한 수축현상으로 인한 막의 손상이 없을 정도의 처리시간만 잘 조절한다면 형태적으로 회복된 난자가 회복되지 않은 난자보다 질적으로 우수하다고 보고한 것과는 약간의 차이는 있었지만, 이러한 차이는 배의 발달단계와도 관계가 있다고 사료된다. 한편 같은 용액에서 처리시간이 길

어질수록 배에 대한 삼투압의 영향이 나타났다. 즉 30분 처리구에서의 LB로의 발달율은 대조구나 15분처리구보다 낮았지만, HB로의 발달율은 다른 구와 비슷하였다. 특히 LB중 HB로 발달했던 것은 다른 구보다 상승하였다. 이것은 MB를 긴 시간 동안 처리한 후 LB로 발달하면 양질의 배반포일 것이라고 사료된다.

3. LB의 삼투압용액 처리 시간 효과

체외수정 후 8일째에 형성된 LB를 380mOsm용액에 15분, 30분간 처리하였을 경우 배발달율의 결과는 Table 3과 같다.

15분 처리구에서의 HB로의 발달율은 52.9%(9/17)로서, 대조구의 30.8%(4/13)보다 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다. 한편 형태적으로 회복된 구와 회복되지 않은 구에서의 HB로의 발달율은 각각 53.8%(7/13)와 50.0%(2/4)로서 역시 대조구보다 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다.

30분 처리구에서의 HB로의 발달율은 66.7%(10/15)로서, 대조구보다 높았지만, 유의차는 인정되지 않았다. 한편 형태적으로 회복된 구와 회복되지 않은 구에서의 HB로의 발달율은 각각 70.0%(7/10)와 60.0%(3/5)로서 역시 대조구보다 높았으며, 특히 형태적으로 회복된 구에서는 유의하게 높았다($p < 0.05$).

Table 2. Effect of treatment time of 380 mOsm solution on *in vitro* development of *in vitro* produced MB stage embryos

Treated time (min.)	No. of examined MB	No. of morphologically recovered embryos(%) ¹⁾		No.(%) of developed to		HB/LB(%)
				LB	HB	
Control	22			9(40.9) ^a	4(18.2) ^a	4/ 9(44.4) ^a
15	25	+	15(60.0)	8(53.3) ^a	4(26.6) ^a	4/ 8(50.0) ^a
		-	10(40.0)	3(30.0) ^a	1(10.0) ^a	1/ 3(33.3) ^a
		total	25	11(44.0) ^a	5(20.0) ^a	5/11(45.5) ^a
30	25	+	16(64.0)	4(25.0) ^a	3(21.4) ^a	3/ 4(75.0) ^a
		-	9(36.0)	3(33.3) ^a	2(22.2) ^a	2/ 3(66.7) ^a
		total	25	7(28.0) ^a	5(20.0) ^a	5/ 7(71.4) ^a

¹⁾ + recovered, - not recovered

²⁾ MB middle blastocyst, LB late blastocyst, HB hatched blastocyst

^a Values with same superscripts were not significantly different($p < 0.05$)

Table 3. Effect of treatment time of 380 mOsm solution on *in vitro* development of *in vitro* produced LB stage embryos

Treated time (min.)	No. of examined LB	No. of morphologically recovered embryos(%) ¹⁾		No of embryos developed to HB(%)
Control	13			4(30.8) ^d
15	17	+	13(76.5)	7(53.8) ^{ab}
		-	4(23.5)	2(50.0) ^{ab}
		total	17	9(52.9) ^{ab}
30	15	+	10(66.7)	7(70.0) ^b
		-	5(33.3)	3(60.0) ^{ab}
		total	15	10(66.7) ^{ab}

¹⁾ + recovered, -: not recovered

²⁾ LB: late blastocyst, HB: hatched blastocyst

^{ab}: Values with different superscripts in the same column were significantly different(p<0.05).

Table 2와 함께 고찰한다면, Mazur와 Schneider (1986)는 배발달단계에 따라 고삼투압 용액에 대한 세포의 민감성이 다양하다는 것과 일치하였으며, Pedro 등(1997)과 Yang 등(1990)이 보고한 형태적으로 회복된 난자가 회복되지 않은 난자보다 질적으로 우수하다고 보고한 것과 같은 결과였다. 따라서 고삼투압 처리의 경우는 후기배일수록 그 효과가 뛰어나며, 특히 형태적으로 회복되는 난자가 양질의 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 체내·외에서 생산된 배반포 중에서 이식가능한 양질의 것을 선별함으로써 배의 체외 생산과 수정란이식의 효율성을 높이기 위하여 체외생산된 한우 난포란유래의 배반포(MB 또는 LB)를 NaCl로 조정된 380mOsm과 600mOsm 등의 고삼투압 용액으로 처리한 후 HB로의 발달을 검토하였다. 그 결과, 처리한 삼투압과는 관계없이 배반포의 부화율은 증진하였으나, 처리시간과는 상관성을 가지고 있다. 그리고 380mOsm 용액에서는 형태적으로 회복된 배반포의 부화율은 처리시간과는 큰 차이는 없었으나, 회복되지 않은 구보다 높았다. 특히 30분간의 처리구는 대조구보다 유의하게 높았다(p<0.05). 따라서 고삼투압 처리 후 형

태적으로 회복되는 배반포가 질적으로 다소 우수하기 때문에 체외생산된 배반포의 품질을 객관적으로 판단할 수 있는 방법으로 고삼투압 용액의 처리는 효과적이라고 사료된다.

참고문헌

- Anbari K and Schultz RM. 1993. Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rates of protein synthesis in preimplantation mouse embryos *in vitro*. Mol Reprod Dev 35:24-28.
- Ball GD, Leibfried ML, Ax RL and First NL. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. J Dairy Sci 67:2775-2785.
- Carolan C, Longergan P, Van Langendonck A and Mermillod D. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Theriogenology 43 1115-1128.
- Conaghan J, Handyside AH, Winston RML and Lcese HJ. 1993. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro*. J Reprod Fertil 99:87-95.

- Darkys, Lin YC. 1993. Effect of epidermal growth factor(EGF) and defined simple media on *in vitro* bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology* 39:475-484.
- Didion BA. 1990. Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 33:1165-1174.
- Flood MR, Gage TL and Bunch TD. 1993. Effect of various growth promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro*. *Theriogenology* 39:823-833.
- Franks GS, Colcy SL, Betterbed B and Page RD. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology* 26:135-144.
- Fukuda YM, Ichikawa K, Naito and Toyoda Y. 1988. Normal development of bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro*. Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Dublin, Vol. 3, No.327.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocyst of bovine oocytes and matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fertil* 92:125-131.
- Hawk HW and Wall RJ. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. II. Media and co-culture cells. *Theriogenology* 41:1585-1594.
- Ho Y, Doherty AS and Schultz RM. 1994. Mouse preimplantation embryo development *in vitro*. Effects of sodium concentration in culture media on RNA synthesis and accumulation and gene expression. *Mol Reprod Dev* 38:131-141.
- Kajihara YN, Kometani Y, Shitanaka S, Saito Y, Yamaguchi K, Hishiyama and Endo M. 1992. Pregnancy rates and births after the direct transfers of frozen-thawed bovine IVF embryos. *Theriogenology* 37:233(Abstract).
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Kuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol Reprod* 48:1320-1325.
- Lec ES, Fujiiy and Fukui Y. 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1-and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 45:1151-1162.
- Linder GE and Wright RW Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction* 54:1059-1069.
- Massip A, Mermillod P, Wils C and Dessy F. 1993. Effect of dilution procedure and culture condition after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in vitro*. *J Reprod Fert* 97:65-69.
- Matsuyama K, Miyaakoski H and Fukui Y. 1993. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct medium on *in vitro* development of bovine oocyte matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 40:595-605.
- Mazur P and Schneider U. 1986. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implication. *Cell Biophys* 8:259-284.
- Overstr MEW. 1996. *in vitro* assessment of embryo viability. *Theriogenology* 45:3-16.
- Overstrom EW, Benose DJ and Biggers JD. 1989. Synthesis of Na⁺/K⁺ ATPase by the preimplantation rabbit blastocyst. *J Reprod Fertil* 85:283-295.
- Papaioannou VE and Ebert KM. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Develo-*

- pment 102:793-803.
- Pedro BP, Takashi S, Keisuke E and Magosaburo K. 1997. Effects of osmotic shrinkage on the survival of mouse oocytes and embryos at various developmental stages. *J Mamm Ova Res* 14:66-71.
- Reichenbach HD, Leibrich J, Berg U and Brem G. 1992. Pregnancy, rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *J Reprod Fertil* 95:363-370.
- Rosenkrans CF and First NL. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology* 35:266(abstr).
- Rosenkrans Jr. CF, Zerg GZ, Schoff PK and First NL. 1990. A simple medium for *in vitro* development of bovine embryos. *J Anim Sci* 68(Suppl):430 abstr.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried, Rutledge ML and First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod* 39:546-552.
- Takahashi Y, First NL. 1993. *in vitro* culture of bovine one cell embryos fertilized *in vitro* using synthetic oviduct fluid medium with and without glucose and supplemented with fetal calf serum. *Anim Reprod Sci* 31:33-47.
- Thompson JG, Bell ACS, Pugh PA and Tervit HR. 1993. Metabolism of pyruvate by pre-elongation sheep embryos and effect of pyruvate and lactate concentrations during culture *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 5:417-423.
- Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Wright RW and Tervit HR. 1991. Glucose utilization by sheep embryos derived *in vivo*. *Reprod Fertil Dev* 3:571-576.
- Van Soom A, Mijten P, Van Vlaenderen I, Van den Branden J, Mahmoudzadeh AR and de Kruif A. 1994. Birth of double muscled belgian blue calves after transfer of *in vitro* produced embryos into dairy cattle. *Theriogenology* 41: 855-867.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Shultz GA. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 30:330-338.
- Yang BK, Yang X and Foote RH. 1993. Effect of growth factors on morula and Blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 40: 521-530.
- Yang X, Chen Y, Chen J and Foote RH. 1990. Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: I Survival of rabbit embryos *in vitro* and *in vivo* following sucrose treatment. *Mol Reprod Dev* 27:110-117.
- 박흥대, 김종환, 정덕수, 이동철, 김주환, 윤산현. 1999. 체외에서 양질의 한우 수정란 생산을 위한 배양조건의 설정 및 이식. *한국수정란이식학회* 14(1):39-46.
- 윤산현, 김은영, 조현진, 윤혜균, 이원돈, 임진호. 1994. 배양액 조성과 첨가제가 인간 수정란의 체외 발생에 미치는 영향. *추계산부인과학회*.

(접수일: 2000. 5. 9 / 채택일: 2000. 7. 30)