

아미노산과 FBS의 첨가가 한우난자의 체외발달에 미치는 영향

박흠대[†] · 박 향 · 이상진¹ · 김재명²
대구대학교 공과대학 생명공학과

Effects of the Addition of Amino Acids and FBS on the *In Vitro* Development of Korean Native Cow IVP Embryos

H. D. Park[†], H. Park, S. J. Lee¹ and J. M. Kim²

Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungbuk, Republic of Korea

SUMMARY

These studies were carried out to investigate the effects of the addition of amino acids and FBS as source of exogenous nitrogen fixation added to medium on *in vitro* production of blastocyst derived from bovine follicular oocytes. The base medium was TCM-199 solution for *in vitro* maturation(IVM) of bovine follicular oocytes and Fer-TALP solution for *in vitro* fertilization(IVF) and YS solution for *in vitro* culture(IVC). IVC used the fertilized oocytes of 24-hr culture (day 1) after IVF. Embryos were cultured in drop-culture that contained 25 embryos per 10 μ l. The results obtained are as follows:

1. The developmental rates of fertilized oocytes to blastocyst that developed from YS solution with NEAA derived from MEM alone were higher than those of YS solution without NEAA.
2. The developmental rates of fertilized oocytes to blastocyst that developed from YS solution with EAA derived RPMI 1640 alone were significantly higher than those of YS solution without EAA ($p < 0.05$).
3. When added to EAA on day 5 after NEAA supplementation on day 1, the developmental rates of hatched blastocyst and blastocyst to hatched blastocyst were improved.
4. When removed to EAA on day 3, day 4 and day 5 from medium after NEAA and EAA supplementation on day 1, the developmental rates of blastocyst to hatched blastocyst were reduced.
5. When added to FBS as source of exogenous nitrogen fixation, the developmental rates of blastocyst and hatched blastocyst that developed from the later culture higher(day 5) than those of the early culture.

(Key words : essential amino acid, nonessential amino acid, FBS, embryo development)

서 론

체외에서 소 난포란의 체외성숙, 체외수정, 체외

배양법은 수정란의 미세조작 기술과 더불어 오늘날은 복제동물에 포함한 여러 종류의 형질전환동물생산과 같은 산업적 목적 이외에도 인간의 불임 극복, 수정란의 분화연구, 나아가 산업적으로 수정

¹ 삼육 의명대학교 동물자원학과(Department of Animal Science, Sahm Yook University)

² 포천중문의과대학교 생리학교실(Infertility Medical Center of CHA General Hospital, Pochon CHA University)

[†] Correspondence : E-mail: humdai@taegu.ac.kr

란이식에 의한 산자 생산에 널리 이용되고 있다(박 등, 2000). 특히, 수정란의 체외배양기술의 개발은 미세조작 기술에 의해 생산된 형질전환 수정란으로부터 이식 가능한 양질의 배반포를 대량으로 생산함으로써 형질전환 동물의 생산기술의 산업화를 촉진시킬 수 있다. 이러한 측면에서 소의 수정란을 체외에서 배양할 수 있는 배지는 대단히 중요하게 인식되어 왔으며 배지의 구성성분 중 인산기와 glucose는 소 수정란의 배 발달에 유해하다는 것(Barnett와 Bavister, 1996; Conaghan 등, 1993) 등이 밝혀짐에 따라 현재까지 소 수정란자의 체외발생용 전용 배지로 많이 이용해 왔던 일반 체세포 배양용 배지, 특히 TCM 199용액을 많이 개선하게 되었으며, 그 결과로서 CR1aa용액(Rosenkrans와 First, 1991)등과 같이 구성성분이 비교적 간단한 배양액들이 개발되었다. 그러나 이들 배지에는 체세포의 대사작용을 위하여 질소원의 공급원으로서 nonessential amino acid(NEAA) 및 essential amino acid(EAA)군들을 첨가하는 경우가 있고, 혈청은 거의 모든 배지에 첨가되어 이용되고 있다. 수정란에서 배반포로의 체외발달은 이들 아미노산들이 효과적이라는 많은 보고(Gardner와 Leese, 1990; Takahashi와 First, 1992; Boatman, 1997; Tay 등, 1997)를 근거로 하여 실제 이들 아미노산을 수정란 배양 1일째부터 적정농도로 첨가할 경우 배반포 단계까지 수정란의 발달을 촉진시킨다고 보고하였다(Rosenkrans와 First, 1994; Barnett와 Bavister, 1996; Hill 등, 1996; Gardner와 Lane, 1997; Devreker 등, 1998). 특히 Liu와 Foote(1995) 등에 의하면 MEM유래 EAA를 첨가하였을 때 4세포기 배의 배반포 및 부화배로의 배 발달을 증진시키고, mouse의 후기 배의 분할에는 MEM 유래 NEAA와 glutamine이 효과적이고, MEM 유래 EAA는 오히려 배반포의 ICM수를 감소시키며(Lane와 Gardner, 1997), 또한 배의 발달단계에 따라 필요로 하는 아미노산의 종류가 다르기 때문에 two step에 의해 배양하는 것이 효과적이라고 하였다(Steeves와 Gardner, 1999).

혈청의 종류로서는 FBS(Wright 등, 1976) 또는 FCS(Northey 등, 1999)를 많이 이용하며, 그 효과의 근거와 경제적인 측면에서 FBS를 주로 이용하

고 있으며, 첨가하는 농도는 10%~20%이다(Rebecca 등, 1999). 그리고 첨가하는 시기에 대해서는 수정란의 8세포기까지의 분할에는 혈청의 억제효과(Tricoire 등, 1999)가 나타나기 때문에 배양 3일째에 첨가하는 것이 일반적인 추세이다(Langendonck 등, 1996).

따라서 본 연구는 체외에서 소 난포란 유래의 양질의 배반포를 생산하는데 있어서 외인성 고정질소원인 아미노산과 혈청의 첨가가 배반포의 생산에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 배 지

미성숙 난포란의 회수용 배지는 10mM HEPES와 3mg/ml bovine serum albumin(BSA: Sigma, A-9647)이 첨가된 TALP (HEPES-TALP) 용액을 이용하였고, 체외성숙용 배지는 25mM HEPES 함유 TCM 199(Gibco, 12340-030)용액에 0.22mg/ml pyruvate(Sigma, P-2256), 1 µg/ml follicle stimulating hormone(FSH: Vetrepharm, DIN 00867357), 56°C에서 35분간 처리한 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco, 26140-079)을 첨가한 용액을 이용하였다. 체외성숙된 난포란의 체외수정용 배지는 6mg/ml BSA(Sigma, A-6003)가 첨가된 TALP(Fer-TALP)용액이며, 정자처리용 배지는 3mg/ml BSA(Sigma, A-6003) 첨가 TALP용액을 사용하였다. 한편 체외수정된 배의 체외배양용 기초배지는 인간의 불임극복을 위하여 제조된 용액으로서 glucose와 phosphate가 함유되지 않은 MEM 수준의 10ml/l nonessential amino acids 그룹과 10ml/l vitamins 그룹 및 5ml/l RPMI 1640 수준의 essential amino acids 그룹이 첨가된 YS(허 등, 1996) 용액을 사용하였고, 배 발달단계에 따라 human follicle fluid(hFF)를 10% 또는 20%를 첨가하였다. 이렇게 제조된 각각의 배양액은 0.22 µm의 millipore filter(Millex-GV, Millipore, France)로 여과한 후 5ml test tube (Falcon, 2003)에 적당량을 분주하여 4°C에서 냉장보관 하여 약 2주간 사용하였다. 각각의 배양액은 실험을 실시하기 전 12시간동안 5%

CO₂ 배양기에서 전배양을 실시한 후 사용하였다.

2. 난포란의 회수

본 실험에 공시된 난포란은 울산시 울주군 소재의 화신산업과 경남 김해시 주촌면 소재의 태강산업이라는 각각의 도축장에서 도살된 한우의 난소를 수집하여, 25mg/ml gentamycin(Gibco, 15750-011)이 함유된 0.9% 생리식염수가 들어 있는 25~30°C의 보온병에 담아 4시간 이내 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 여러 번 세척하여 이물질들을 제거한 후 18gauge의 주사침이 부착된 1회용 10ml의 주사기를 이용하여 직경 2~5mm의 가시 난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 이렇게 회수한 난포란을 HEPES-TALP용액으로 세척한 후, 40×~80×의 실체현미경하에서 난구세포가 2~3겹으로 싸여져 있으며, 세포질이 균일하고 색상이 양호한 것(Wiemer 등, 1991)만을 선별하여 체외성숙에 이용하였다.

3. 체외성숙

선별된 난포란을 TCM-199용액으로 2회 정도 세척한 후, 35 mm의 plastic petri dish(Falcon, 3001)에 mineral oil(Sigma, M-8410)로 피복되어 있는 50 μl의 TCM-199용액으로 15~20개씩의 난포란을 넣어, 39°C 5% CO₂ 배양기에 22~24시간 배양함으로써 난포란의 체외성숙을 유도하였다.

4. 체외수정

1) 정자의 준비

체외수정에 사용된 축협에서 제공되는 인공수정용 한우의 동결정액을 사용하였다. 1~2개의 동결 straw를 공기 중에서 10초간 방치한 후, 37°C의 항온수조에서 30초간 침적함으로써 용해를 실시하였다. 용해된 정액은 3ml의 80% percoll(Sigma, P-1644)용액 상층에 조용히 첨가한 후 2000 rpm에서 20분간 원심분리하여 pellet을 회수하여 4ml의 정자처리용 용액으로 희석하고, 1000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 최종정자농도가 1.0×10⁶cells/ml이 되도록 Fer-TALP용액으로 희석하였다.

2) 체외수정

난구세포의 확장상태로 체외성숙이 확인된 난포란을 0.03%의 hyaluronidase(Sigma, H-3506) 함유 Fer-TALP용액으로 실온에서 3~4분간의 처리와 강력한 pipetting으로 난구세포를 제거·세척한 후 체외수정에 제공하였다. 체외수정은 35 mm plastic petri dish에 mineral oil로 피복되어 있는 46 μl의 Fer-TALP용액에 15개씩의 난포란을 넣고, 10 μg/ml heparin(Sigma, H-3149)용액 2 μl와 체외수정용 정액 2 μl을 첨가하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

5. 체외배양

체외수정 후 22~24시간째에 실체현미경하에서 제2극체 존재의 유무와 관계없이 형태적으로 정상적인 수정란을 회수하여 체외배양용 배지로 세척한 후 체외배양하였다(day 1). 기본적인 체외 배양법은 10 μl 배지를 이용한 단순·미 소적 배양법(20~25개 난자/10 μl 배지)으로 행하였으며(박 등, 2000), day 1은 20% hFF 첨가 YS용액으로, day 3과 day 5에 각각 다른 첨가물이 함유된 배지로 교환하여 배양하면서 배반포 또는 부화 배로의 발달을 조사하였다.

1) 비필수아미노산 첨가

수정난자를 day 1에 20% hFF와 비필수 아미노산 균만을 첨가한 YS용액으로 배양하였으며, 배양액 교환은 행하지 않았다.

2) 필수아미노산의 첨가

수정난자를 day 1에 20% hFF와 비필수 아미노산균만을 첨가한 YS용액으로 배양하였으며, 배양액 교환은 행하지 않았다. 한편 수정난자를 day 1에 20% hFF와 비필수 아미노산균 첨가 YS용액으로 배양하면서, day 1, day 3, day 5에 각각 필수아미노산 균을 첨가하였다.

3) 필수아미노산의 제거시기

수정난자를 day 1에 20% hFF와 필수·비 필수

아미노산군 첨가 YS용액으로 배양하면서 day 3, day 4, day 5에 10% hFF와 비 필수아미노산 군만을 첨가한 YS용액으로 교환하였다.

4) FBS의 첨가시기

수정난자를 day 1은 20% hFF와 비필수 아미노산군 첨가 YS용액으로, day 3은 10% hFF와 필수 아미노산 군을 첨가하여 배양하면서 day 3, day 4, day 5에 각각 10% FBS를 첨가하였다.

6. 통계처리

본 연구의 실험결과와 통계학적 분석은 χ^2 -test를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 비필수 아미노산의 첨가효과

한우 난포란 유래 수정란의 체외발달에 있어서 비필수 아미노산군(NEAA)을 첨가하였을 때의 결과는 Table 1과 같다. 체외에서 배양된 수정란의 배반포로의 발달율은 NEAA의 무첨가군과 첨가군에서 각각 6.7%와 16.7%로서 첨가군에서 높은 배 발달율을 나타냈으나 각 구간의 유의차는 없

었다.

그리고 부화배반포로의 배 발달율은 각각 0%로서 비필수 아미노산을 첨가하였을 때 후기 배의 배 발달율에 영향을 미치지 않았다.

2. 필수아미노산의 첨가효과

난포란 유래 수정란의 배양에 필수아미노산(EAA)의 첨가 유무에 따른 배 발달의 결과가 Table 2에 나타나 있다. 체외 수정란의 배반포로의 발달율은 EAA의 무첨가군과 첨가군에서 각각 12.0%와 23.9%로서 첨가군이 유의하게 높은 배 발달율을 나타냈다($p < 0.05$). 그러나 부화배반포로의 발달율은 각각 2.4%와 8.7%로서 첨가군에서 유의하게 높은 부화 배반포율을 나타냈다($p < 0.05$). 그러나 배반포로부터 부화배반포로의 배 발달율은 각각 20.0%와 36.4%로 필수 아미노산을 첨가하였을 때 높은 부화율을 나타냈으나 유의차는 없었다.

수정란의 체외발달에 있어서 배양액에 첨가하는 아미노산의 종류는 거의 대부분이 체세포 배지용의 것으로서, MEM유래 NEAA group과 BME유래 EAA group으로 첨가(Rosenkrans와 First, 1994; Barnett와 Bavister, 1996; Hill 등, 1996; Gardner와 Lane, 1997; Devreker 등, 1998)하고 있으며 이

Table 1. Effects of nonessential amino acids group(NEAA) on *in vitro* development of Korean native cow IVP embryos

Addition of NEAA	No. of cultured embryos	No.(%) of embryos developed to		HBL/BL (%)
		Blastocyst (BL)	Hatched blastocyst(HBL)	
Not added	30	2(6.7)	0(0.0)	0/2(0.0)
Added	30	5(16.7)	0(0.0)	0/5(0.0)

Table 2. Effects of essential amino acids group(EAA) on *in vitro* development of Korean native cow IVP embryos

Addition of EAA	No. of cultured embryos	No.(%) of embryos developed to		HBL/BL (%)
		Blastocyst(BL)	Hatched blastocyst(HBL)	
Not added	125	15(12.0) ^a	3(2.4) ^a	3/15(20.0) ^a
Added	138	33(23.9) ^b	12(8.7) ^b	12/33(36.4) ^a

^{a,b} Values with different superscripts within in each column were significantly different($p < 0.05$).

러한 아미노산을 첨가하지 않았을 경우는 배반포로의 배 발달율이 감소하며, 이는 배양액 내로 세포내의 아미노산이 유출되어 세포내의 pH 및 삼투압의 변화로 인한 대사균형의 파괴라고 지적하였다. 이 이후는 많은 학자(Takahashi와 First, 1992; Kim 등, 1993; Gardner, 1994; Keskinetepe 등, 1995; Liu와 Foote., 1995; Lee와 Fukui., 1996; Michele 등, 1999)들에 의해 확인되었으며, 본 연구에서도 무 첨가시 낮은 배 발달율을 나타냈다. 따라서 소 난자의 체외발달에 배양액 내에 아미노산의 첨가는 필수적이라고 사료된다.

3. 필수아미노산의 첨가시기

한우 난포란 유래 수정란의 체외배양 시 필수아미노산을 각각 배양 day 1, day 3, day 5에 첨가하여 배양하였을 때의 결과가 Table 3에 나타나 있다. Day 1, day 3, day 5에 필수아미노산을 첨가하였을 때 배반포로의 발달율은 각각 22.6%, 32.4%, 34.4 %로서 5일째에 필수아미노산을 첨가한 군에서 가장 높은 배 발달율을 나타냈으나 각 구간간의 유의 차는 없었다. 또한 부화 배반포로의 배 발달율은 각각 8.6%, 10.6%, 13.3%로서 역시 5일째 첨

가한 군에서 가장 높았으나, 각 구간간의 유의차는 없었고 배반포로부터 부화배까지 발달율도 각각 38.1 %, 32.6%, 38.7%로서 각 구간간의 유의차는 없었다.

4. 필수아미노산의 제거시기

한우 난포란 유래 수정란자의 체외발생에 필수아미노산군의 제거시기에 따른 수정란의 배 발달율을 조사한 결과가 Table 4에 나타나 있다.

수정란을 필수아미노산 및 비 필수아미노산을 함유한 배지에서 배양 후 각각 3, 4 및 5일째 필수아미노산을 제거하고 배양하였을 때 배반포로의 배 발달율은 각각 20.5%, 23.1%, 27.5%로서 유의 차가 없었다. 그러나 부화 배반포로의 발달율은 각각 0.0%, 0.0%, 2.5%로서 3일째와 4일째에 필수아미노산을 제거하였을 때 부화가 불가능하였다. 한편 배반포의 부화율은 각각 0.0%, 0.0%, 9.1%로서 유의 차가 없었다.

아미노산을 첨가하는 시기에 대해서는 많은 연구자가 배양 1일째(체외수정 후 24시간)에 첨가하지만, Liu와 Foote(1995) 등은 배양 2일째에 EAA (농도, 1/2), 또한 Lane과 Gardner(1997) 등은 배의

Table 3. Effects of the additional time of amino acids group on *in vitro* development of Korean native cow IVP embryos

Additional time after IVC*	No. of cultured embryos	No.(%) of embryos developed to		HBL/BL (%)
		Blastocyst(BL)	Hatched blastocyst(HBL)	
Day 1	93	21(22.6)	8(8.6)	8/21(38.1)
Day 3	142	46(32.4)	15(10.6)	15/46(32.6)
Day 5	90	31(34.4)	12(13.3)	12/31(38.7)

* See of material and methods.

Table 4. Effects of the removal time of essential amino acids group on *in vitro* development of Korean native cow IVP embryos

Removal time	No. of cultured embryos	No.(%) of embryos developed to		HBL/BL (%)
		Blastocyst (BL)	Hatched blastocyst (HBL)	
Day 3	39	8(20.5)	0(0.0)	0/ 8(0.0)
Day 4	39	9(23.1)	0(0.0)	0/ 9(0.0)
Day 5	40	11(27.5)	1(2.5)	1/11(9.1)

초기 분할에는 NEAA가 효과적이었고, EAA는 오히려 후기 배의 발생에 효과적이었다고 보고(Steeves와 Gardner; 1999)하였다. 본 실험에서는 NEAA는 초기배 부터 필요하며, EAA는 배양 3일째 부터, 특히 배반포의 부화에는 필수적인 것으로 Hill 등(1996)의 결과와 일치하였다. 그러나 소 수정란의 초기분할에 있어서 NEAA 또는 EAA 첨가의 효과가 동일하다는 보고도 있다(Pinyopummintr와 Bavister, 1996). 따라서 소 수정란자의 체외 배 발생에 있어서 발생단계에 따라 필요로 하는 아미노산의 종류는 다르다고 생각하며, 특히 8세포기에 해당되는 배양 3일째에 EAA의 공급으로 배의 생존성 여부가 1차적으로 결정될 것이라고 사료된다.

5. FBS 첨가시기

체의 수정란을 배양 시 day 1에 비 필수아미노산을 day 3째에 비 필수·필수아미노산군 첨가하여 배양하면서 각각의 날짜에 따라 10%의 FBS를 첨가하였을 때 배 발달율에 대한 결과가 Table 5 나타나 있다. Day 3, day 4, day 5에 FBS를 첨가하였을 때 배반포로의 발달율은 각각 19.8%, 29.7%, 43.8%로서 day 5일 째에 첨가하였을 때 가장 높았으며, day 3일째에 첨가군보다는 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 또한 부화배반포로의 배 발달율도 각각 3.1%, 4.1%, 15.6%로 day 5일째의 FBS 첨가군이 다른 군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편 배반포의 부화율은 각각 15.8%, 13.6%, 35.7%로서 day 5일째 군에서 가장 높았으나, 유의차는 없었다.

한편 FBS의 첨가시기에 있어서 Pinyopummintr와 Bavister(1991)은 수정란자의 초기분할시기인 2

세포에서 8세포기에 FBS의 첨가는 배반포로의 발생율이 저하하다고 보고하였고, 그 후 많은 학자들이 이 방법에 준하여 체외에서 소 배반포를 생산하고 있다. 그러나 Dobrinsky 등(1996)과 본 실험에 의하면 후기 배(배양 5일째)에 첨가한 것이 배반포의 형성을뿐만 아니라 배반포의 부화율도 높았다. 따라서 FBS는 compaction 시기의 발생단계에 필요하며, 이 시기에 배의 생존성 여부가 2차적으로 결정되는 것 같다. 이와 같은 현상은 배의 체외발생용 배지에 첨가되는 외인성 고정 질소원들의 농도가 진할수록 많은 양의 물질들이 난자 내로 유입되어 난자의 세포 내에 단백질 합성을 오히려 저해시키는 결과를 초래한다고 생각한다.

한편 동물의 종류에 따라 약간의 차이는 있지만, 수정란자는 배지에 외인성 고정 질소원이 첨가되어 있지 않다고 하더라도 배 자신이 가지고 있는 아미노산을 이용하여 배반포로의 발생은 가능하며, 그리고 가장 왕성한 단백질 합성시기는 배반포 형성시기이며(Rebecca 등, 1999) 이 시기에는 배지에 첨가되어 있는 외인성 고정 질소원들이 uptake하여 이용할 것이다. 이와 같이 배의 체외배양용 배지에 첨가하는 외인성 고정 질소원들은 배 발생에 효과적으로 작용하는 것은 틀림없으나, 일반적으로 그 종류, 시기, 농도 등에 관한 것은 거의 경험에 의존되고 있는 실정이다.

이상의 것을 종합한다면 소 난포란 유래 배반포의 체외생산에 있어서 배지에 첨가하는 외인성 고정 질소원으로서의 아미노산의 종류, 첨가시기, 첨가농도와 더불어 혈청의 첨가시기와 농도를 재검토함으로써 배반포의 생산율을 향상시킬 수 있으며, 또한 양질의 품질을 지닌 배반포를 생산할 수

Table 5. Effects of the additional time of FBS on *in vitro* development of Korean native cow IVP embryos

Additional time	No. of cultured embryos	No.(%) of embryos developed to		HBL/BL (%)
		Blastocyst (BL)	Hatched blastocyst(HBL)	
Day 3	96	19(19.8) ^a	3(3.1) ^a	3/19(15.8) ^a
Day 4	74	22(29.7) ^{a,b}	3(4.1) ^a	3/22(13.6) ^a
Day 5	96	42(43.8) ^b	15(15.6) ^b	15/42(35.7) ^a

^{a,b} Values with different superscripts within in each column were significantly different ($p < 0.05$).

있다고 사료된다.

적 요

본 연구는 체외에서 소 난포란유래의 배반포 생산에 있어서 배지 내에 첨가하는 외인성 고정질소 원으로써 아미노산과 FBS의 첨가효과를 검토하였다. 소 난포란의 체외성숙은 TCM-199용액, 체외 수정은 Fer-TALP용액으로 행하였으며, 체외수정 후 24시간째(day 1)의 수정난자를 체외배양에 제공하였다. 체외배양용 기초배지는 YS용액, 기초 배양법은 25개 난자/10 μ l 배지의 단순·미소적배 양법을 이용하였다. 본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 체외 수정란의 배양에 있어서 비필수 아미노산(MEM 유래) 첨가가 무첨가군보다 높은 배반포 발달율을 나타냈다.
2. 체외 수정란의 배양에 있어서 필수 아미노산(RPMI 1640 유래) 첨가가 무첨가군보다 유의하게 높은 배반포 발달율을 나타냈다.($P < 0.05$)
3. Day 1에 비 필수 아미노산, day 5에 필수 아미노산을 첨가하였을 경우 부화 배반포로의 발생을 및 배반포로의 부화율을 향상시켰다.
4. Day 1에 비필수·필수 아미노산을 첨가한 후 day 3, day 4, day 5에 각각 필수 아미노산만을 배지로부터 제거 시 배반포의 부화율은 현저하게 낮았다.
5. FBS의 첨가시기는 배양 후기(day 5)에 첨가할수록 배반포율 또는 부화 배반포율이 유의하게 상승하였다($p < 0.05$).

이상의 결과에서 소 난포란 유래 배반포의 체외생산에 있어서 배지에 첨가하는 외인성 고정질소원들의 첨가에 있어서 첨가시기 및 농도를 조절함으로써 양질의 배반포 생산을 향상시킬 수 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

Barnett DK and Bavister BD. 1996. What is the relationship between the metabolism of preim-

- plantation embryos and their developmental competence. Mol. Reprod. Dev., 43:105-133.
- Boatman DE. 1997. Responses of the oviductal environment. Hum. Reprod., 12:133-149.
- Conaghan J, Handyside AH, Winston RML and Leese HJ. 1993. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 99:87-95.
- Devreker F, Winston RML and Hardy K. 1998. Glutamine improves human preimplantation development *in vitro*. Fertil. Steril., 69:293-299.
- Dobrincky JR, Johnson LA and Rath D. 1996. Development of a culture medium(BECM-3) for porcine embryos: Effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. Biol. Reprod., 55:1069-1074.
- Gardner DK and Lane M. 1997. Culture and selection of viable blastocysts, a feasible proposition for human IVF. Hum. Reprod., 3:367-382.
- Gardner DK. 1994. Mammalian embryos culture in the absence of serum or somatic cell support. Cell Biol. Int., 18:1163-1179.
- Gardner DK and Leese HJ. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 88:361-368.
- Hill JL, Wade MG, Nancarrow CD and Boland MP. 1996. The effects of an ovine oviductal concentration of amino acids on development of *in vitro* produced bovine embryos. Theriogenology, 45:209. Abstr.
- Keskintepe L, Burnley CA and Brackett BG 1995. Production of viable blastocysts in defined *in vitro* conditions. Biol. Reprod., 52:1410-1417.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda 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.
- Lane M and Gardner DK. 1997. Differential re-

- gulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J. Reprod. Fertil.*, 109:153-164.
- Langendonck A, Auquier P, Donnay L, Massip A and Dessy F. 1996. Acceleration of *in vitro* bovine embryo development in the presence of fetal calf serum. *Theriogenology*, 45:215. Abstr.
- Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro*-produced bovine morula and blastocysts. *Biol. Reprod.*, 55:1383-1389.
- Liu Z and Foote RH. 1995. Effects of amino acids on the development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos in a simple protein-free medium. *Hum. Reprod.*, 11:2985-2991.
- Michele C, David N, Anita C, Lisa B, Mark W and Andrew W. 1999. Bovine oocyte maturation *in vitro* employing serum-free defined media. *Theriogenology*, 60:129. Abstr.
- Northey DL, Monson RL, Rutledge JJ and Rutledge ML. 1999. Cattle blastocyst formation altered by presence of fetal calf serum. *Theriogenology*, 51:250. Abstr.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1991. *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.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1996. Effects of amino acids on development *in vitro* of cleavage stage bovine embryos into blastocysts. *J. Reprod. Fertil.*, 8:835-841.
- Rebecca LK, Michelle L and Barry DB. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi defined and defined culture media. *Biol. Reprod.*, 60:1345-1352.
- Rosenkrans CF and First NL. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acid and vitamins. *Theriogenology*, 35:266. Abstr.
- Rosenkrans CF and First NL. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 72:434-437.
- Steeves TE and Gardner DK. 1999. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol. Reprod.*, 61:731-740.
- Takahashi Y and First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37:963-978.
- Tay JI, Rutherford AJ, Killick SR, Maguiness SD, Partridge RJ and Leese HJ. 1997. Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents. *Hum. Reprod.*, 12:2451-2456.
- Tricoire H, Touze JL and Mermillod P. 1999. Effect of old fetal calf serum on the quality of *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 51:257. Abstr.
- 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.
- 박흥대, 김재영, 주재홍, 공건오, 윤산현, 공일근, 이상민, 이상진, 송혜범. 2000. 한우 난포란유래 배반포의 체외생산을 위한 생물학적 요인들의 영향. *한국수정란이식학회지*, 15(2):129-136.
- 허용수, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 윤현진, 이석원, 김은영, 박세필, 이성구, 이원돈, 임진호. 1996. IVF-ET Program에서 Blastocyst 수정란의 발생에 관한 연구. I. Glucose와 Phosphate를 함유하지 않은 배양액에서 Blastocyst 수정란의 발생. *대한불임학회지*, 23(2):155-161.

(접수일: 2002. 11. 20/ 채택일: 2002. 12. 20)