

아미노산의 첨가가 돼지 체외수정란의 후기배의 발달에 미치는 영향

김연수 · 송상현¹ · 조성근¹ · 곽대오² · 김철욱 · 박충생¹ · 정기화^{*}

진주산업대학교 동물소재공학과

초 록

본 연구는 아미노산의 첨가가 돼지 수정란의 체외 발달에 미치는 영향을 구명하고자 PFF가 함유된 NCSU-23을 기본 배지로 체외성숙 및 체외배양액을 조성한 후 EA(Essential amino acid), NA(Non-essential amino acid) 및 EANA(EA + NA)를 첨가하여 체외성숙, 체외수정 및 체외발달에 미치는 영향을 조사하였다. 체외성숙 배지에 아미노산을 첨가한 결과 MII 단계까지의 체외성숙율은 NA 첨가군이 83.3%로 대조군 70.0%에 비하여 유의적으로($P < 0.05$) 높았다. 그러나 체외수정 이후의 배 발달율과 수정율에서는 아미노산 첨가군과 무첨가군 사이에 유의적인 차이는 없었다. 체외배양액에 아미노산을 첨가한 후 배반포의 내부세포피(ICM) 세포와 영양배엽(TE) 세포의 발달에 미치는 영향을 조사한 결과, ICM에서는 유의차를 발견할 수 없었으나 TE 세포는 EANA 처리군이 18.0 ± 0.5 개로 대조군 16.09 ± 0.56 개에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 많았다. 총세포수에서도 EANA 처리군이 50.0 ± 1.0 개로 대조군 44.2 ± 1.1 개보다 유의적($P < 0.05$)으로 많았다. 이상의 결과를 종합할 때, 돼지의 체외수정란 생상에 있어서 아미노산의 첨가는 배반포로의 발달에는 영향을 미치지 못하였으나 체외성숙율을 높이고 배반포의 세포수 향상에 도움을 주는 것으로 판단된다. 특히, 영양배엽(TE) 세포의 발달율이 높은 것으로 보아 아미노산의 첨가는 돼지수정란의 착상에 도움을 줄 것이라 기대된다.

(주제어 : Pig embryo, Amino acids, Blastocyst, Cell number)

서 론

형질전환 돼지의 생산효율을 증진하기 위하여 우선 수정란의 체외배양이 안정적으로 이루어져야 하지만 해결해야 할 연구 과제는 아직 많은 실정이다. 돼지수정란은 체외성숙시 충분한 성숙이 이루어지지 않고, 다정자 침입, 체외발달을 저조 및 체외배양 후 배반포의 질이 낮다는 단점이 있는데, 이러한 단점을 극복하기 위하여 배양액과 배양조건의 최적화를 위한 많은 연구가 이루어지고 있다. 체외수정란 생산성 향상을 위한 최적 조건의 배양액을 생산하기 위하여 다양한 첨가제가 개발, 이용되고 있는데, 포유류 수정란의 배양액에 아미노산을 첨가하면 발달이 향상되는 것으로 알려져 있다.

비필수 아미노산은 암컷의 생식기에 비교적 높은 농도로 존재하고 있으나 필수 아미노산은 그 농도가 낮다(Miller & Schultz, 1987). 체외수정란의 난할 단계에서 배양액에 필수 아미노산을 첨가하면 수정란 발달을 저해한다(Gardner & Lane, 1993). 그러나 배반포 단계의 내부세포피(ICM)의 발달과 수정란 이식 후의 태아 발달을 향상시키는 것으로 알려져 있다(Gardner & Lane, 1998).

인간의 수정란에서 비필수 아미노산은 초기 난할을 향상시키고, 8세포기부터 배반포 단계의 수정란에서는 필수 아미노산과 함께 수정란 발달에 필수 불가결한 영양소이다(Lane & Gardner, 1997). Brinster(1965)는 BSA와 아미

노산들은 킬레이트 작용을 통하여 산화 작용을 억제하고 세포 표면이나 효소로부터 보호할 것이라고 하였다.

따라서 본 연구는 돼지수정란 배양액에 아미노산의 첨가 효과를 구명하기 위하여 체외성숙 및 체외배양액에 아미노산을 첨가하여 수정란의 체외 발달에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

난소 및 난포란의 채취

도축된 암태지로부터 난소를 수집하여 항생제가 첨가된 0.9% 생리식염수에 담아 2~4시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 2~3회 세척한 후 18gauge 주사침이 부착된 10mL 주사기를 이용하여 직경 2~8mm의 포상난포로부터 회수하였다. 회수된 난포란은 TL-Hepes-PVA에 washing하여 60×15 mm의 tissue culture dish에 옮긴 후 실체 현미경(20~40×) 하에서 난세포질이 균일하고 난구세포가 잘 발달된 것으로 선별하여 체외성숙에 이용하였다.

난포란의 체외성숙

선별된 난포란은 NCSU-23을 기본배양액으로 하여 10

¹ 경상대학교 동물자원과학대학(Department of Animal Science, Gyeongsang University).

² 경상대학교 과학교육과(Department of Science Education, Gyeongsang University).

^{*} Corresponding author : Dr. K. H. Chung, Department of Animal Resources Technology, Jinju National University, Jinju, 660-758, Korea.

TEL:055-751-3287, E-mail: kchung@jinju.ac.kr

% 돼지 난포액, cysteine(0.1mg/mL), EGF(10ng/mL), FSH (0.5 μ g/mL), estradiol-17 β (0.1 μ g)를 첨가하여 만든 체외 성숙용 배지에 세척한 후, 같은 medium에 필수 아미노산(essential amino acid, EA; 1%), 비필수 아미노산(non-essential amino acid, NA; 0.5%), 혼합 아미노산(EANA)을 각각 첨가하여 700 μ L씩의 배양액이 담긴 Nunc 4-well dish로 옮겼다. 39 $^{\circ}$ C 온도와 5% CO₂ 인큐베이터에서 20~22시간 배양하였고 다음 20~22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서 총 40~44시간 동안 배양하였다.

체외수정

체외수정용 배양액은 modified Tris-Buffered Medium (mTBM)을 기본 배양액으로 하여 1mM caffeine과 0.4% BSA가 함유된 mTBM 용액을 사용하였다. 활력이 높은 정자를 선별하기 위하여 Swim up 방법을 이용하여 정자를 회수하였다. 정자의 준비는 액상정액 보관고에서 꺼낸 정액을 부드럽게 섞어준 다음 15mL tube에 담아 1,900 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. Pellet 부분의 정자를 제외한 상층은 버리고 체외수정용 용액을 Pellet이 흐트러지지 않도록 조심스럽게 5mL까지 채운 후 Incubator에 45 $^{\circ}$ 각도로 기울여 약 40분간 Swim up을 유도하였다. 난자는 44시간 동안 성숙시킨 후 Vortexing 하여 난구세포를 완전히 제거하고 체외수정용 용액에 3회 세척한 후 50 μ L의 체외수정용 배양액 소적에 난자를 넣어 보관하였다. 체외수정은 정자의 최종 농도가 0.5 \times 10⁶/mL가 되도록 6시간 동안 체 -incubation 시켰다. 수정완료 후 수정을 실시한 난포란 중 일부는 수정율 조사를 위하여 염색을 실시하였고, 나머지는 모두 체외배양하였다.

체외배양

체외배양은 NCSU-23에 0.4% BSA를 첨가한 배양액을 사용하였다. 필수 아미노산(EA; 1%)과 비필수 아미노산(NA; 0.5%) 또는 복합 아미노산(EANA)이 첨가된 각각의 배양액 50 μ L에 20개씩의 체외수정란을 넣어 39 $^{\circ}$ C 온도와 0.5% CO₂에서 배양하였다.

수정란의 관찰

체외성숙 40~44h 후 핵의 성숙율을 조사하기 위하여

acetic-orcein 염색을 실시하였다. 난구세포를 깨끗이 제거한 후 72시간 정도 고정액(glacial acetic acid : ethanol =1:3)에 넣어 두었다. Cover glass의 네 모서리를 wax로 찍은 다음 난자를 네 모서리의 중간에 놓고 살며시 눌러 주었다. 1% acetic-orcein을 Cover glass 가장자리에 한 두 방울 떨어뜨리고 반대편에 여과지를 대어서 모세관 현상에 의해서 염색액이 이동하도록 하면서 약 5분 동안 염색하였다. 염색 후 D.W 및 45% acetic acid로 세척하였다. 체외수정 후 12시간 후에 성숙난포란의 정자 침입율, 다정자 침투율, 융성전핵 형성율을 관찰하기 위하여 똑같은 방법으로 염색을 실시하였다. 염색 후에는 위상차 현미경(200~400 \times)에서 관찰하였다.

배반포의 이중형광염색

164시간 동안 배양한 배반포는 내부 세포괴(inner cell mass, ICM) 세포와 영양 배엽(trophectoderm, TE) 세포를 구별하기 위하여 이중형광염색을 실시하였다. 먼저 0.5% pronase에서 수정란의 투명대를 제거한 후 TL-Hepes-PVA 용액에서 5분 정도 세척하였다. Rabbit anti-pig whole serum과 TL-Hepes-PVA 용액이 1:5의 비율이 되게 하여 40분 동안 처리한 후 5분간 3회 정도 세척하였다. TL-Hepes-PVA 용액에 Guinea pig complement를 1:10으로 첨가한 후 10 μ g/mL Hoechst 33342와 10 μ g/mL propidium iodide가 1:1의 비율이 되게 하여 앞의 용액에 첨가하여 40분 동안 처리하였다. Slide glass 위에 수정란을 올려놓고 mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만든 다음 cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 형광현미경(\times 200) 하에서 세포수를 관찰하였다.

통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) Procedure를 적용하여 각 요인의 Least square means를 구한 후 요인간의 유의성을 검정하였다.

결 과

아미노산의 첨가가 체외성숙에 미치는 영향

Table 1. Effect of amino acids on maturation rate of *in vitro* matured porcine oocytes

Treatment	No. of oocytes	Nuclear status of oocyte(%)			Rate of maturation (LSMean \pm S.E)
		GV	M I ~T I	M II	
Control	70	2	19	49	70.0 \pm 0.05 ^b
EA	86	2	23	61	70.9 \pm 0.05 ^b
NA	102	4	13	85	83.3 \pm 0.04 ^a
EANA	49	1	11	37	75.5 \pm 0.06 ^{ab}

GV : germinal vesicle stage, M-I : first prometaphase, T-I : first telophase M-II : second metaphase.

EA: Essential amino acid(1%), NA: Non-essential amino acid(0.5%), EANA: EA(1%)+NA(0.5%)

^{ab} Values within columns with different superscripts are significantly different(p <0.05).

Table 2. Effect of amino acids supplemented with maturation medium on development of porcine embryos produce

Treatment	No. of oocytes	No(%) of developed to		
		Cleaved	Morula	Brastocyst
PPF	180	70.6±0.03	53.3±0.04	23.3±0.03
EA	180	76.7±0.03	58.3±0.04	23.3±0.03
NA	180	75.0±0.03	55.6±0.04	25.0±0.03
EANA	180	72.8±0.03	53.9±0.04	21.1±0.03

EA: Essential amino acid(1%), NA: Non-essential amino acid(0.5%), EANA: EA(1%)+NA(0.5%).

체외성숙 배지에 아미노산을 첨가하여 40~44h 성숙시킨 후 acetic-orcein 염색을 실시하여 GV~MII 단계까지의 발달율을 조사하였다. Table 1에서와 같이 NA가 함유된 첨가군이 (75.5±0.06 및 83.3±0.04%) 대조군 (70.0±0.05%)보다 유의적($P<0.05$)으로 높은 성숙율을 보였으며, EA 첨가군과는 차이가 없었다.

체외성숙 배지에 아미노산을 첨가하여 발달율을 비교한 결과 Table 2에서 나타난 바와 같이 아미노산 첨가 효과가 없는 것으로 나타났다. 난할율은 첨가군이 72.8±0.033~76.7±0.03%로 대조군 70.6±0.034%에 비하여 다소 높은 발달율을 나타내었으나 유의차가 없었으며 배반포 기로의 발달율 또한 유의적인 차이가 없었다.

아미노산의 첨가가 체외배양에 미치는 영향

체외배양액에 아미노산의 첨가 효과는 Table 3에서 나타난 바와 같다. 난할율에 있어서 EANA 처리구가 EA 처리구에 비하여 유의적으로($p<0.05$) 낮게 나타났으나 배반포로의 발달율에는 유의적인 차이가 없었다.

아미노산의 첨가가 수정율에 미치는 영향

수정한 후 12시간 뒤에 orcein staining을 실시하여 전핵수를 관찰한 결과 Table 4에서 나타난 바와 같이 미수정율과 수정율은 유의차가 나타나지 않았다. 다정자 침입율은 EANA 첨가구가 23.8±0.07%로 대조군 13.1±0.05%보다 높았지만 유의차는 인정되지 않았다.

아미노산 첨가가 배반포의 세포수 발달에 미치는 영향

배반포로 발달한 수정란의 세포수를 비교한 결과 내부

Table 4. Effect of amino acids on polyspermy of porcine embryo fertilized in vitro

Treatment	No. of oocytes	N (%) of oocytes		Rate of polyspermy (LSMean±S.E)
		1PN	2PN	
Control	99	11.1±0.03	75.8±0.04	13.1±0.05
EA	121	5.8±0.03	80.2±0.04	14.1±0.05
NA	94	8.5±0.03	73.4±0.04	18.1±0.05
EANA	63	6.3±0.03	69.8±0.05	23.8±0.07

EA: Essential amino acid(1%), NA: Non-essential amino acid(0.5%), EANA: EA(1%)+NA(0.5%).

Table 3. Effect of amino acids supplemented with culture medium on development of porcine embryos produced in vitro

Treatment	No. of oocytes	N(%) of developed to		
		Cleaved	Morula	Blastocyst
Control	180	73.3±0.03 ^{ab}	50.0±0.04	20.6±0.03
EA	180	79.4±0.03 ^a	50.6±0.04	20.0±0.03
NA	180	75.6±0.03 ^{ab}	55.0±0.04	18.3±0.03
EANA	180	68.9±0.04 ^b	49.4±0.04	18.9±0.03

EA: Essential amino acid(1%), NA: Non-essential amino acid(0.5%), EANA: EA(1%)+NA(0.5%).

^{ab} Values within columns with different superscripts are significantly different($p<0.05$).

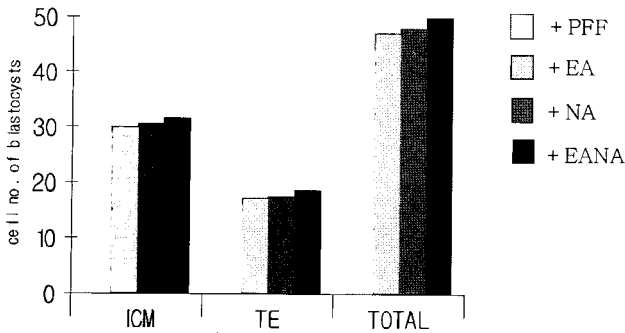


Fig. 1. Number of inner cell mass and trophoblast cell of porcine blastocysts produced *in vitro*. EA: Essential amino acid(1%), NA: Non-essential amino acid(0.5%), EANA: EA(1%)+NA(0.5%)^{ab} Bars with different superscripts are significantly different($p<0.05$).

세포괴(ICM)는 EA, NA 및 EANA 처리구 각각 30.0 ± 0.9 , 30.6 ± 1.2 및 31.5 ± 1.2 개로 대조구 29.0 ± 0.9 개와 유의적인 차이가 없었으나 영양배엽(TE) 세포는 EANA 처리구가 18.0 ± 0.5 개로 대조구 16.09 ± 0.56 개에 비해 유의적($P<0.05$)으로 많았다. 총세포수에서도 EANA 처리구가 50.0 ± 1.0 개로 대조구 44.2 ± 1.1 개보다 유의적($P<0.05$)으로 많았다.

고 찰

본 연구는 돼지 수정란의 생산효율을 위하여 체외성숙용 배지와 체외배양용 배지에 아미노산을 첨가하여 아미노산 첨가군과 무첨가군의 효과를 비교 검토하였다.

포유류 수정란의 배양액에 아미노산을 첨가하면 발달이 향상되는 것으로 알려져 있다. 아미노산은 삼투압을 유지시키고 에너지 근원이 되며, pH 조절과 단백질 합성의 전구물질로 작용을 한다(Gardner 등, 1994). De Matos 등(1996)은 소에서 아미노산의 첨가가 배 발달을 향상시켜준다고 보고하였고, Zheng 등(2002)은 원숭이에서 난포란의 핵 성숙율에 영향을 준다고 보고하였으며, Gardner 등(1998)은 생쥐 배반포 단계의 내부세포괴(ICM) 발달과 수정란 이식 후의 태아 발달을 향상시킨다고 보고했다. 또한, 소의 수정란으로 시험한 결과 Hill 등(1997)은 이식 후 착상에 효과적으로 작용한다고 보고한 바 있다. 반면에 Avery 등(1998)은 아미노산의 첨가가 배 발달에는 영향을 끼치지 않는 것으로 보고하였다.

체외성숙 배지에 아미노산을 첨가한 결과 난포란의 GV에서 MII까지의 발달율은 첨가군이 무첨가군 보다 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 그 외 난할률, 상질배, 배반포의 발달율은 첨가군과 무첨가군이 유의차가 나타나지 않았다. 또한, 체외 배양액에 아미노산을 첨가했을 때도 유의차는 발견되지 않았다. 이와 같은 결과는 Avery 등(1998)의 아미노산의 첨가가 소의 배 발달에 영향을 끼치지 않는다는 보고와 일치하는 경향을 보였으나, 아미노산의 첨가가 배 발달을 향상시켜준다는 De Matos 등(1996)의 보고와는 일치하지 않았다. 수정율에 있어서도 첨가군과 무첨가군의 유의차는 발견되지 않았다.

그러나, 아미노산의 첨가는 배반포의 세포수에 있어서

는 첨가군이 무첨가군에 비해 유의적으로 많은 세포수를 나타내었다($P<0.05$). 내부세포괴(ICM)는 첨가군이 다소 높긴 했으나 유의적 차이는 발견할 수 없었고, 영양배엽(TE) 세포에서는 첨가군이 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$).

ROS(reactive oxygen species)의 과다는 산화적 스트레스(Oxidative stress)를 야기함으로써 세포에 유해한 악영향을 미쳐 포유동물 수정란의 초기배 발달을 저해하는 것으로 알려져 있다(Bavister 등, 1988). Glutathione(GSH)은 대부분의 세포를 통과하지 못하므로 세포막에서 분해되어 세포 내부로 들어간 다음 다시 GSH로 재합성되어 이용되어지는데 세포 내부로 들어가는 데 아미노산 성분이 관여하거나 다른 pathway에 이용이 된다(Reed, 1994). GSH는 활성산소의 악영향을 방어하고 세포의 산화적 스트레스의 해로운 요소에 대항하는 중요한 역할을 한다(Meister 등, 1983). 뿐만 아니라 세포막의 기능을 유지하고, DNA 합성에도 도움을 주며(Takahashi 등, 1996), 특히, 돼지 난포란에서의 GSH 농도는 수정란의 생존력과 관련된 생화학적 marker로서 중요한 역할을 한다고 하였다(Abeydeer 등, 1998). 따라서 수정란의 발달은 GSH 대사와 관련된 세포 내부의 산화환원작용에 의하여 영향을 받는다(Takahashi 등, 2002).

아미노산의 이러한 작용을 고려할 때 아미노산 첨가군의 배반포 세포수 향상과 밀접한 관계가 있을 것으로 판단된다. Biggers 등(2000)은 아미노산의 첨가는 무첨가군보다 탈출 배반포로의 발달을 향상, 배반포의 세포수 향상, 특히 내부세포괴(ICM) 세포수 향상을 가져온다고 보고하였으나 본 실험에서는 내부세포괴(ICM)의 세포수는 차이가 없었으며, 영양배엽(TE) 세포에서 유의적으로 많게 나타났다. 이러한 결과로 보아 수정란의 체외배양시 아미노산의 첨가는 배반포 세포수 향상을 가져오며 특히, 영양배엽(TE) 세포수의 향상을 가져온다고 사료된다.

Effects of Amino Acids Supplemented to Culture Medium on Development of Porcine Embryos Cultured *in Vitro*

Y. S. Kim, S. H. Song, S. K. Cho, D. O. Kwack, C. W. Kim, C. S. Park and K. H. Chung

Department of Animal Resources Technology,
Jinju National University

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of amino acids supplementation on maturation, fertilization and embryo development of pig oocytes. Essential amino acids (EA), non-essential amino acids (NA) or both amino acids (EA + NA) were supplemented to North Carolina State University (NCNU) 23 medium containing porcine follicular fluid (pFF). When the amino acids were supplemented to the maturation medium, the maturation rates were higher ($p<0.05$) in the NA group than control ($83.3\pm 0.04\%$ versus $70.0\pm 0.05\%$), but the subsequent cleavage rates and deve-

lopment to morula and blastocyst stage between amino acid supplement groups and control were not different. The developmental rates to morula and blastocysts stage were not significantly different regardless of amino acid supplementation to culture medium. In addition, supplementation of amino acids did not significantly affect the rate of fertilization and polyspermy. When the amino acids were supplement to culture medium, the number of trophectodermal (TE) cells was significantly ($p < 0.05$) higher in amino acid supplement group than that of control (18.6 ± 0.5 versus 16.1 ± 0.6), whereas the numbers of inner cell mass (ICM) cells were not different among the treatment groups and control ($29.0 \pm 0.9 \sim 31.5 \pm 1.2$). Total cell number was also significantly ($p < 0.05$) higher in EANA group (50.0 ± 1.0) than that of control group (44.2 ± 1.1). These results indicate that the amino acid supplementation to maturation and culture medium may not significantly stimulate early embryo development, but may improve the TE cell number of blastocyst stage in the pig.

(Key word : Pig embryo, Amino acids, Blastocyst, Cell number)

인용문헌

1. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN (1998): Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 50: 747-756.
2. Avery B, Bavister BD, Greve T (1998): Development of bovine oocytes, *in vitro* matured in a chemically defined protein-free medium, supplemented with different amino acid formulations. *Theriogenology* 49: 306.
3. Brinster RL (1965): Studies on the development of mouse embryos *in vitro* III. The effect of fixed nitrogen source. *J Exp Zool* 158:69-78.
4. Bavister BD (1988): Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 29:143-154.
5. Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M (2000): Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod* 63:281-293.
6. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M (1996): Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 45:451-457.
7. Gardner GA, Lane M (1993): Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 48:377-385.
8. Gardiner CS, Reed DJ (1994): Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the pre-implantation mouse embryo. *Biol Reprod* 51:1307-1314.
9. Gardner GA, Lane M (1998): Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod* 13(Suppl. 3):148-159.
10. Hill JL, Wade MG, Nancarrow CD, Kelleher DL, Boland MP (1997): Influence of ovine oviductal amino acid concentrations and an ovine oestrus associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 47:164-169.
11. Lane M, Gardner DK (1997): Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 109:153-164.
12. Meister A (1983): Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220:472-477.
13. Miller JG, Schultz GA (1987): Amino acid content of preimplantation rabbit embryo and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod* 36:125-12.
14. Reed DJ (1994): Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection mechanisms. In: Hodgson E, Levi PE, editors. *Introduction to biochemical toxicology*. Norwalk: Appleton & Lange. pp. 265-295.
15. Takahashi M, Nagai T, Okano A (1996): Effect of β -mercaptoethanol on DNA synthesis in bovine embryos. *Anim Sci Technol(Japan)* 67:749-751.
16. Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A (2002): Promoting effect of β -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cysteine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod* 6:562-567.
17. Zheng P, Bavister BD, Ji WZ (2002): Amino acid requirements for maturation of rhesus monkey (*macaca mulatta*) oocytes in culture. *Reproduction* 124: 515-22.

(접수일자: 2005. 9. 15. / 채택일자: 2005. 9. 25.)