

한우 난포란의 체외성숙 배지 내의 암모니아 농도가 배 발생과 세포수에 미치는 영향

박 용 수 · 박 흠 대[†]

경상북도 축산기술연구소

초 록

본 연구는 한우 수정란의 체외생산에 있어서 효율과 품질의 향상을 위해서, 체외성숙 시간에 따른 배지 내의 ammonia 농도를 측정하였고, 체외성숙용 배지의 교환 및 첨가가 배 발생과 배반포의 세포수에 미치는 효과를 검토하였다. 체외성숙용 배지내의 ammonia 농도는 체외성숙 시간이 길어짐에 따라 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 체외성숙용 배지의 첨가에 따른 수정율, 8세포기 및 배반포기 발달율은 각 군간에 유사한 경향이였다. 배반포의 inner cell mass(ICM) 및 총 세포수(TCN)는 비슷한 경향이였으나, trophoctoderm(TE) 세포수는 4.5 시간 첨가군이 유의하게 낮았다. 한편 ICM/TCN 비율은 4.5 시간 첨가군이 대조군과 9 시간 첨가군에 비하여 유의하게 높았다. 체외성숙용 배지의 교환에 따른 수정율은 4.5 시간 및 9 시간 교환이 대조군에 비하여 유의하게 높았으나, 8세포기 발달율은 비슷한 경향이였다. 한편 배반포기 발달율은 9 시간 교환군이 가장 높았다. 배반포의 ICM 세포수와 ICM/TCN 비율은 9 시간 교환군이 다른 두 처리군에 비하여 유의하게 높았으나, TE 및 TCN은 차이가 없었다.

(주제어 : *In vitro* maturation, Ammonia, Embryo development, Cell number)

서 론

포유동물의 난자는 난포 환경으로부터 분리되면 자발적으로 성숙이 진행되므로(Edwards, 1965), 수정란의 체외생산에 관한 연구는 지금까지 주로 체외배양 방법에 관한 것이었다(Lee와 Fukui, 1996). 그러나 체외생산방법의 개선에도 불구하고 실제 이식 가능한 배반포는 전체 난포란의 10~20%로 한정되어 있을 뿐만 아니라 재현성도 낮다(Dominko와 First, 1997). 이러한 낮은 배 발생률이 생명공학 기술의 발전과 수정란이식의 산업화에 가장 큰 문제이며, 배 발생의 효율성 제고와 더불어 이식 후 높은 임신율을 보장할 수 있는 체외수정란 생산체계의 확립이 필요하다.

일반적으로 소 난포란은 직경 2~8 mm 정도의 난포로부터 회수되어 각종 첨가물이 함유된 TCM 199 배지에서 체외성숙이 진행된다. 체외성숙용 배지에는 에너지원으로 pyruvate, glucose, amino acids 및 각종 당류가 첨가되고, 배양 시 배지 내에는 에너지원의 대사로 lactate, ammonia 및 각종 효소와 호르몬 등이 생성된다(Trounson과 Gardner, 2000). 특히 ammonia는 배 배양 과정에서 아미노산의 대사 또는 분해로 발생하고, 농도의 증가는 배 발달과 세포수를 감소시켰고(Gardner와 Lane, 1993), 이식 후에는 착상율의 감소와 더불어 태아 발육 장애 및 exencephaly를 유발하였다(Lane과 Gardner, 1994). 한편 생식기 내의 ammonia 농도는 개체의 영양과 생리적 상태에 따라 많은 변화가 있으며, 농도의 상승은 번식 장애의 한 원인이다(Staples 등, 1993; Larson 등, 1997).

체외 배양 단계에서 ammonia 농도의 상승이 태아에 가해지는 독성을 예방하고자 체외배양 배지의 교환이 연구되

었으며, mouse와 sheep에서는 효과가 있었으나(Gardner와 Lane, 1993; Gardner 등, 1994), 소에서는 수정란의 밀도에 따라 상반된 결과였다(Carolan 등, 1995; Fukui 등, 1996; Ikeda 등, 2000). 한편 소 난포 크기에 따른 ammonia 농도와 체외성숙에서 ammonia 첨가의 효과에 대한 보고가 있었으나(Hammon 등, 2000a,b), ammonia는 배지에 첨가되는 아미노산의 대사에 의해서도 발생하므로 이에 대한 검토가 필요하다.

따라서 본 연구는 한우 수정란의 체외생산에 있어서 효율과 품질의 향상을 위해서, 체외성숙 시간에 따라 배지 내에 발생하는 ammonia 농도를 측정하였으며, 체외성숙용 배지의 교환 및 첨가가 배 발생과 배반포의 세포수에 미치는 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

배 지

본 연구에 사용된 기초배양액은 난소로부터 미성숙 난포란의 회수용 배지는 10 mM HEPES와 3 mg/ml bovine serum albumin(BSA: Sigma, A-9647)이 첨가된 TALP(HEPES-TALP) 용액이다. 난포란의 체외성숙용 배지는 0.22 mg/ml pyruvate(Sigma, P-5280), 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco, 16000-044), 1 mg/ml follicle stimulating hormone(Sigma, F-8174), 10 µg/ml luteinizing hormone(Sigma, L-9773), 10 mg/ml heparin(Sigma, H-3149)이 각각 첨가된 TCM199(Gibco, 12340-030)이다. 체외수정용

[†] Corresponding author : Dr. Hum Dae Park, Division of Food and Biotech., Daegu University. TEL : +82-53-850-6554, E-mail : humdai@taegu.ac.kr

배지는 6 mg/ml BSA(Sigma, A-6003) 및 10 mg/ml heparin(Sigma, H-3149)이 첨가된 IVF-TALP 용액이며, 정자처리용 배지는 3 mg/ml fraction V BSA(Sigma, A-9647)가 첨가된 Sperm-TALP 용액이다. 한편 체외배양용 배지는 3 mg/ml BSA 또는 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액이다. 그리고 실험에 제공되는 모든 배지의 미세소적은 mineral oil(Sigma, M-8410)을 피복하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 최소한 4 시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

난포란의 회수 및 체외성숙

도축 한우에서 난소를 적출하여 25 µg/ml gentamycin(Sigma, G1264)이 첨가된 0.9% 생리식염수(25~28°C)가 들어있는 보온병에 담아 3 시간에 실험실로 운반하였다. 수집된 난소는 penicillin G(Sigma, P3032)가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하여, 18G 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2~8 mm의 가시난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 실험현미경하에서 난구세포의 부착상태가 치밀한 것만을 선별하여, 50 µl의 체외성숙용 배지에 15개 난포란을 옮겨 20 시간 동안 39°C, 5% CO₂ 배양기에 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

1) 암모니아 농도

체외성숙 0, 4.5, 9 및 20 시간째에 체외성숙용 배지(각각 500 µl)를 회수하여 암모니아 농도의 측정에 제공하였다. 암모니아 농도 측정은 AM505-K(아산제약, 한국)를 이용 spectrophotometer로 630nm에서 측정하였다.

2) 배지의 교환 및 첨가

배지의 교환은 체외성숙 4.5 시간 및 9 시간째에 새로운 체외성숙용 배지로 난포란을 이동하였다. 배지의 첨가는 체외성숙 4.5 시간 및 9 시간째에 50 µl의 체외성숙용 배지를 첨가하였다.

체외수정

한우 동결정액 1개(KPN388)를 실온에서 10초간, 37°C의 항온수조에서 30초간 처리하여 용해한 후 90% percoll(Sigma, P4937) 2 ml 용액이 담겨져 있는 15 ml 원심분리관(Corning, 430052)에 살며시 놓은 후 700g에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하여, 2 ml Sperm-TALP 용액으로 350g에서 다시 10분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 정자농도는 25×10⁶ spermatozoa/ml가 되도록 조절하여, 난포란이 함유되어 있는 46 µl의 체외수정용액에 heparin 2 µl와 정자 2 µl를 첨가(최종 정자농도 1×10⁶ spermatozoa/ml)하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에 20 시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

체외배양

체외수정된 수정란(배양 1일)은 3 mg/ml BSA가 첨가된 체외배양용 배지로 2회 세척한 후 미리 준비한 20 µl 배지에 20개씩 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 배양 3 및 5일째에 10% FBS가 첨가된 체외배양용 배지로 교환하여 배양하였다.

배반포의 이중형광염색

체외에서 생산된 각종 배반포의 세포수를 측정하기 위하여 propidium iodide(Sigma, P-4170; PI)와 bisBenzimide(Sigma, B-2261)를 사용하여 이중형광염색을 실시하였다. 배반포의 투명대를 0.5% protease(Sigma, P-6911) 용액으로 5분간 처리하여 용해시킨 후 HEPES-TALP 용액으로 3회 세척하였다. 그리고 rabbit antbovine whole serum(Sigma, B-8270)이 1:5로 희석된 HEPES-TALP 용액에서 1 시간 배양한 후 HEPES-TALP 용액에 1:10으로 희석된 guinea pig complement(Sigma, S-1639, PI)와 bisBenzimide가 각각 4 µg/ml 첨가에 1 시간 처리하여 염색하였다. 염색된 배반포를 5분간 HEPES-TALP 용액으로 세척한 후, slide glass에 whole mount 하여 형광현미경(Olympus, Japan)하에서 배반포의 inner cell mass(ICM)와 trophectoderm(TE) 세포수를 각각 조사하였다.

통계처리

실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test와 SPSS 10.0 프로그램 이용한 일원배치 분산분석을 통한 Duncan's test를 실시하였으며, 유의차는 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결 과

Ammonia 농도 변화

체외성숙 시간에 따른 배지 내의 ammonia 농도를 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다. Ammonia 농도가 0 시간째는 74.0±5.7 µg/dl, 4.5 시간째는 130.5±3.3 µg/dl, 9 시간째는 214.0±6.6 µg/dl, 20 시간째는 398.0±11.6 µg/dl로서 체외성숙 시간이 길어짐에 따라 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

배지의 첨가

한우 난포란의 체외성숙에서 배지의 첨가가 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 수정율(≥ 2 cell)은 대조군과 실험군에서 71.8~78.3%, 8세포기 발달율은 48.8~52.1%로서 유사한 경향이였다. 배반포기 발달율은 대조군이 29.1%, 4.5 시간 첨가군이 28.6%, 9 시간 첨가군이 26.2%로서 대조군이 가장 높았으나, 각 군 간에 유의차는 인정되지 않았다.

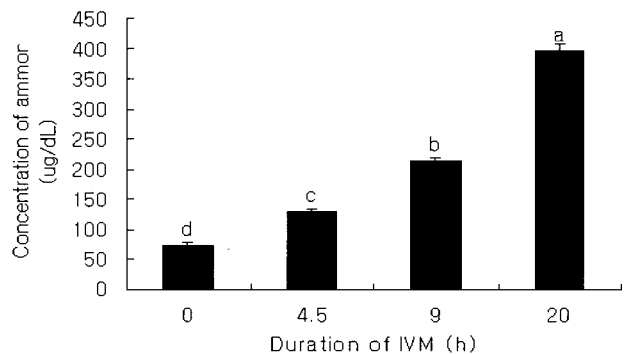


Fig. 1. Effect of the durations of *in-vitro* maturation on the concentration of ammonia in maturation medium.

a,b,c,d: Values within column with different superscript differ ($P < 0.05$).

Table 1. Effect of the addition of maturation medium on the development of Korean Native Cow oocytes

Time of addition (h)	No.	No. (%) of oocytes developed to		
		≥2cell	8cell	Blastocyst
Control ¹⁾	213	153(71.8)	104(48.8)	62(29.1)
4.5	255	196(76.8)	133(52.1)	73(28.6)
9	236	185(78.3)	118(50.0)	62(26.2)

¹⁾ Control: *in-vitro* maturation for 20h without addition of medium.

Table 2. Effect of the addition of maturation medium on the number of inner cell mass, trophoctoderm and total cells of Korean Native Cow blastocysts

Time of addition (h)	No.	No. of cells			ICM/TCN (%)
		ICM ¹⁾	TE ²⁾	TCN ³⁾	
Control ³⁾	14	23.5±11.9	106.7±27.8 ^a	130.2±25.6	18.4±9.3 ^b
4.5	14	31.7±11.2	88.4±17.0 ^b	120.0±23.9	26.7±6.8 ^a
9	14	24.4± 9.1	100.0±20.7 ^{ab}	124.4±22.6	19.6±7.2 ^b

^{a,b}: Values within column with different superscript differ ($P < 0.05$). mean±SD.

¹⁾ ICM: inner cell mass. ²⁾ TE: Trophoctoderm. ³⁾ TCN: Total cell number. ⁴⁾ Control: *in-vitro* maturation for 20h without addition of medium.

한우 난포란의 체외성숙에서 배지의 첨가가 배반포의 세포수에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다. ICM 세포수는 대조군, 4.5 시간 및 9 시간 첨가군에서 각각 평균 23.5, 31.7 및 24.4개로서 유사한 경향이였다. TE 세포수는 대조군이 평균 106.7개로서 4.5 시간 첨가군의 88.4개

보다 유의하게 많았다($p < 0.05$). 총 세포수는 평균 120.0~130.2개로서 각 군 간에 비슷한 경향이였다. 한편 ICM/TCN 세포수의 비율은 4.5 시간 첨가군이 평균 26.7%로서 대조군의 평균 18.4%와 9 시간 첨가군의 평균 19.6%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

Table 3. Effect of the exchange of maturation medium on the development of Korean Native Cow oocytes

Time of exchange (h)	No.	No. (%) of oocytes developed to		
		≥2cell	8cell	Blastocyst
Control ¹⁾	213	153(71.8) ^b	104(48.8)	62(29.1) ^{ab}
4.5	210	170(80.9) ^a	109(51.9)	56(26.6) ^b
9	205	174(84.8) ^a	118(57.5)	77(37.5) ^a

^{a,b}: Values within column with different superscript differ ($P < 0.05$).

¹⁾ Control: *in-vitro* maturation for 20h without exchange of medium.

Table 4. Effect of the exchange of maturation medium on the number of inner cell mass(ICM), trophoctoderm(TE) and total cell of Korean Native Cow blastocysts

Time of exchange (h)	No.	No. of cells			ICM/TCN (%)
		ICM ¹⁾	TE ²⁾	TCN ³⁾	
Control ⁴⁾	14	23.5±11.9 ^b	106.7±27.8	130.2±25.6	18.4±9.3 ^b
4.5h	14	18.1±11.5 ^b	93.5±38.9	111.7±45.7	15.9±7.8 ^b
9h	14	37.2±22.2 ^a	86.5±33.6	123.7±34.7	30.1±19.3 ^a

^{a,b}: Values within column with different superscript differ ($P < 0.05$). mean±SD.

¹⁾ ICM: inner cell mass. ²⁾ TE: Trophoctoderm. ³⁾ TCN: Total cell number. ⁴⁾ Control: *in-vitro* maturation for 20h without exchange of medium.

배지의 교환

한우 난포란의 체외성숙에서 배지의 교환이 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다. 수정율은 4.5 시간 및 9 시간 교환군에서 각각 80.9 및 84.8%로서 대조군의 71.8%에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 그러나 8세포기 발달율은 48.8~57.7%로서 비슷한 경향이였다. 한편 배반포기 발달율은 대조군, 4.5 시간 및 9 시간 교환군에서 각각 29.1, 26.6 및 37.5%로서 9 시간 교환군이 가장 높았으며, 특히 4.5 시간 교환군과는 유의차가 인정되었다($p < 0.05$).

한우 난포란의 체외성숙에서 배지의 교환이 배반포의 세포수에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 4와 같다. ICM 세포수는 9 시간째 교환군의 평균 37.2개는 대조군과 4.5 시간째 교환군의 평균 23.5 및 18.1개에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). TE 세포수는 대조군, 4.5 시간 및 9 시간 교환군에서 각각 평균 106.7, 93.5 및 86.5개로서, 대조군이 가장 높았으나 유의차는 인정되지 않았다. 총 세포수는 평균 111.7~130.2개로서 비슷한 경향이였다. 한편 ICM/TCN 비율은 9 시간째 교환군이 30.1%로서 대조군 (18.4%)과 4.5 시간째 교환군(15.9%)에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$).

고 찰

본 연구는 한우 난포란의 체외성숙 시간에 따라 배지 내에 발생하는 ammonia 농도를 측정하였고, 체외성숙용 배지의 교환 및 첨가가 배 발생과 배반포의 세포수에 미치는 효과를 검토하였다.

체외수정란의 생산에 이용되는 각종 배지에는 에너지원으로 pyruvate, glucose, amino acids 및 각종 당류가 첨가되고, 배양 과정에서 이들 에너지원의 대사로 lactate, ammonia 및 각종 효소와 호르몬이 생성된다(Trounson과 Gardner, 2000). 특히 ammonia는 아미노산의 대사 및 분해로 발생하여, 배 발달 억제(Gardner와 Lane, 1993)와 태아의 발육 장애 및 exencephaly 등의 유해 작용을 가지고 있고(Lane과 Gardner, 1994), 생식기 내의 ammonia 농도 상승은 번식장애의 한 원인으로 작용한다(Staples 등, 1993; Larson 등, 1997). 한편 Hammon 등(2000a)은 난포의 크기가 증가할수록 난포액의 ammonia 농도는 감소하였고, 체외성숙 배지에 ammonia의 첨가는 배 발달에 유해성이 없었다. 그러나 본 연구에서는 체외성숙 시간이 길어짐에 따라 배지 내에 발생하는 ammonia 농도가 유의하게 상승하였다(Fig. 1). 따라서 체외성숙 배지 내에서 발생하는 ammonia가 배 발달에 미치는 효과를 단정할 수는 없으나, 체외성숙 시간이 길어짐에 따라 배 발달율이 저하된다는 Park 등(2003)의 보고와 비교하면, ammonia 농도의 상승은 배 발달 또는 품질에 유해한 영향을 미칠 것으로 생각된다.

Fukui 등(1996)은 체외배양 단계에서 발생하는 ammonia의 유해성을 예방하고자 배지의 교환을 제시하였으며, 이 방법이 mouse(Gardner와 Lane, 1993)와 sheep(Gardner 등, 1994)에서는 효과적이었으나, 소에서는 수정란의 밀도에 따라 상반된 결과가 보고되었다(Carolan 등, 1995; Fukui 등, 1996). 한편 Mouse 배는 ammonia 농도가 0.083 mM에서 발달이 억제되었으나, 소 배의 발달율은 차이가

없었다. 그러나 ammonia가 태아에 미치는 영향을 고려한다면 배지의 교환이 필요하다고 하였다(Ikeda 등, 2000). 본 연구에서 체외성숙 배지의 첨가는 배 발달에 효과가 없었으나, 배지의 교환(9 시간째)은 배반포 발달율이 유의하게 상승하였다(Table 2). 따라서 체외성숙 시 배지에 생산·축적되는 ammonia와 같은 물질들은 배 발생에 유해하게 작용할 것으로 판단되므로, 체외성숙의 적절한 단계(9 시간째)에 배지의 교환이 배 발생에 효과적일 것으로 생각된다.

여러 조건하에서 체외 생산된 배반포의 품질평가는 배반포의 형태(Linder와 Wright, 1983), 배반포의 분화(Behboo 등, 1995), 세포수(Papaioannou와 Ebert, 1988), 효소(Johnson 등, 1991) 및 산소 대사(Manes와 Lai, 1995) 등이 이용되고 있다. 특히 배반포의 ICM 세포수는 임신율과, 총 세포수에 대한 ICM 세포수의 비율은 배반포의 품질 평가에 유효하다고 하였다(Lane과 Gardner, 1997; van Soom 등, 1997). 한편 소 배반포의 세포수는 체내와 체외 배반포가 차이가 있으며(Park 등, 2003), 체외성숙 과정에서는 시간(Park 등, 2003), amino acid(Park 등, 2004a), 혈청과 호르몬(Choi 등, 1999; Park 등, 2004b) 및 배지(Stojkovic 등, 1998) 등과 같은 요인들에 영향을 받으며, Gardner와 Lane(1993)은 ammonia 농도가 75 μ M 이상부터 세포수가 급격하게 감소함을 보고하였다. 본 연구에서 4.5 시간째에 체외성숙 배지의 첨가는 TE 세포수가 감소하였으나, 9 시간째에 배지의 교환은 ICM 세포수와 ICM/TCN 비율이 유의하게 증가하였고 또한 Park 등(2003)이 보고한 체내 유래 배반포의 것과 유사한 경향이였다. 따라서 ammonia 농도 변화와 세포수를 비교해 보면 체외성숙 시간이 길어짐에 따라 배지내의 ammonia 농도의 증가는 배반포의 ICM 및 TE 세포의 분화 또는 생존에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 소 배의 발달과 배반포의 세포수에 미치는 ammonia의 효과를 정확하게 알 수는 없으나, 체외성숙 9 시간째에 배지의 교환은 한우 배반포 생산 효율과 세포수 측면에서의 품질 향상에 효과적일 것으로 생각된다.

Effect of the Concentration of Ammonia in Maturation Medium on the Development and Cell Numbers of Korean Native Cow Embryos

Park, Y. S. and H. D. Park[†]

Kyoungbuk Livestock Research Institute

ABSTRACT

The purpose of this study was an improvement of efficiency and quality in the production of Korean Native Cow embryos. We investigated effects of concentration of ammonia in *in vitro* maturation (IVM) medium. In addition, we examined effects of addition or exchange of IVM medium on subsequent development and the cell numbers of blastocysts. The concentrations of ammonia in IVM medium was significantly increased by the increasement of IVM duration ($p < 0.05$). The development rates to the 2 cell-, 8 cell- and blastocyst-stage

embryos with the addition of IVM medium were similar among treatment groups. The number of inner cell mass (ICM) cells and the total cell number (TCN) of blastocysts were not differ among treatment groups, whereas the trophectoderm (TE) cell number was significantly lower in the group of 4.5 h addition. The ICM/TCN ratio was significantly higher in the group of 4.5 h addition than in the group of control and 9 h addition. The development rate to the 2-cell embryo with the exchange of IVM medium was significantly higher in the group of 4.5 h exchange and 9 h exchange than in control. The development rate to the blastocyst stage was the highest in the group of 9 h exchange. The number of ICM and ICM/TCN ratio were significantly higher in the group of 9 h exchange than the other groups. The numbers of TE and TCN was similar among treatment groups.

(Key words : *In vitro* maturation, Ammonia, Embryo development, Cell number)

인용문헌

- Behbooi E, Anderson GB, Bondurant RH, Cargill SL, Kreusher BR, Medrano JF, Murlay JD (1995): Birth of large calves that developed from *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 44:227-232.
- Carolan C, Lonergan P, van Langendonck A, Mermillod P (1995): Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 43:1115-1128.
- Choi SH, Ryu IS, Kim IH, Park SB, Yeon SH, Jin HJ, Suh CS, Son DS (1999): Effects of *in vitro* maturation condition on bovine IVF embryo development. *Korean J Emb Trans* 14:113-119.
- Dominko T, First NI (1997): Timing of Meiotic progression in bovine oocyte and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 47:456-467.
- Edwards RG (1965): Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208:591-600.
- Fukui Y, Lee ES, Araki N (1996): Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from *in vitro* produced early bovine embryos. *J Anim Sci* 74: 2752-2758.
- Gardner DK, Lane M (1993): Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 48:377-385.
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA (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.
- Hammon DS, Wang S, Holyoak GR (2000a): Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on subsequent embryo development. *Anim Reprod Sci* 58:1-8.
- Hammon DS, Wang S, Holyoak GR (2000b): Effects of ammonia during different stages of culture on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 59:23-30.
- Ikeda K, Takahashi Y, Katagiri S (2000): Effect of medium change on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in medium containing amino acids. *J Vet Med Sci* 62:121-123.
- Johnson SK, Jordan JE, Dean RG, Page RD (1991): The quantification of bovine embryo viability using a bioluminescence assay for lactate dehydrogenase. *Theriogenology* 35:425-433.
- Lane M, Gardner DK (1994): Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil* 102: 305-312.
- Lane M, Gardner DK (1997): Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 109:153-164.
- Larson SF, Butler WR, Currie WB (1997): Reduced fertility associated with low progesterone post-breeding and increased milk urea nitrogen in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 80:1288-1295.
- Lee ES, Fukui Y (1996): Synergic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro* produced bovine morulae and blastocyst. *Biol Reprod* 55:1383-1389.
- Linder GE, Wright RW (1983): bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
- Manes C, Lai NC (1995): Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J Reprod Fertil* 104: 69-75.
- Papaioannou VE, 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*. *Development* 102:793-803.
- Park YS, Choi SH, Han JC, Park HD, Byun MD (2003): Effects of maturation time on *in-vitro* production of Korean Native Cow embryos. *Korean J Animal Reprod* 27:35-44.
- Park YS, Kim SS, Choi SH, Park NC, Byun MD, Park HD (2004a): Effects of amino acid in *in-vitro* maturation medium on nuclear maturation and embryo development of Korean Native Cow. *Reprod Dev Biol* 28:29-36.
- Park YS, Kim JM, Park HD (2004b): Effects of serum and gonadotropins in *in-vitro* maturation medium on

- nuclear maturation, development and cell numbers of Korean Native Cow embryos. Korean J Emb Trans 19:229-237.
23. Staples CR, Garcia-Bojalil C, Oldick BS, Thatcher WW (1993): Protein intake and reproductive performance of dairy cows: a review, a suggested mechanism, and blood and milk urea measurements. Proc. IV Florida Ruminant Nutri Symp, Gainesville, FL, pp 37-52.
 24. Stojkovic M, Buttner M, Zakhartchenko V, Brem G, Wolf EA (1998): Reliable procedure for differential staining of *in vitro* produced bovine blastocysts: comparison of tissue culture medium 199 and Menezes's B2 medium. Anim Reprod Sci 50(1-2):1-9.
 25. Trounson AO, Gardner DK (2000): Assessment of embryo metabolism. In; Handbook of *in vitro* fertilization, CRC press, New York, USA, pp 347-372.
 26. Van Soom A, Ysebaert MT, Kruif AD (1997): Relationship between timing of development, morulae morphology and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm *in vitro*-produced bovine embryos. Mol Reprod Dev 47:47-56.
- (집수일자: 2005. 2. 25. / 채택일자: 2005. 3. 15.)