

한우 난포란의 체외성숙 시 여러 가지 첨가물이 배 발생과 품질에 미치는 영향

박흥대¹ · 장미진¹ · 박용수^{2,*}

¹대구대학교 식품생명공학부, ²경상북도축산기술연구소

Effect of Various Supplements on Embryo Development and Quality of Bovine Embryos during *In Vitro* Maturation

Hum Dae Park¹, Mi Jin Jang¹ and Yong Soo Park^{2,*}

¹Division of Food and Biotech, Daegu University, Daegu 712-714, Korea

²Kyongbuk Livestock Research Institute, Youngju, Kyongbuk, 750-871, Korea

ABSTRACT

This study was examined the effects of concentrations of polyvinylpyrrolidone(PVP) and supplementation of EGF, cysteine and PVP during *in vitro* maturation on the development of bovine embryos. In experiment 1, 0.1 to 3.0% PVP was supplemented to IVM medium before IVF. The development rates to the blastocyst stage was significantly higher in 0.5% PVP group than 3.0% PVP group ($P<0.05$). In experiment 2, EGF, cysteine and PVP were supplemented to IVM medium. The high cleavage rate was obtained from cysteine group, but blastocyst formation rates did not differ among groups. The highest total cell number and inner cell mass (ICM) cell number were observed in cysteine group. In PVP group, ICM cell number was significantly low than those of cysteine and control groups ($P<0.05$). After embryo transfer, pregnancy rate was significantly low in PVP group compared to other groups ($P<0.05$). These results indicate that the supplementation of PVP in IVM medium support the embryo development, but has a deteriorate effect on the blastocyst quality.

(Key words : Bovine, IVM, PVP, EGF, Cysteine)

요 약

본 연구는 체외성숙 배지에 첨가하는 PVP의 농도, EGF, cysteine 및 PVP의 단독 또는 혼합첨가가 한우 체외수정란의 체외발생에 미치는 영향을 검토하였다. 체외성숙 배지에 PVP의 첨가농도(0.1~3.0%)에 따른 분할율은 차이가 없었으나, 배반포 발달율은 0.5% PVP 첨가군이 가장 높았다($P<0.05$). PVP, EGF 및 cysteine의 단독 및 혼합 첨가에 따른 분할율은 cysteine 단독첨가군이 높았으나($P<0.05$), 배반포 발달율은 차이가 없었다. Inner cell mass 수는 대조군과 cysteine 첨가군이 PVP 첨가군에 비하여 유의하게 높았고($P<0.05$), 총 세포수도 cysteine 첨가군에서 가장 높았다. 수정란이식 결과는 대조군, EGF, cysteine 및 EGF+cysteine 군의 임신율은 46.1~63.6%로서 비슷하였으나, PVP 첨가군은 10%로서 다른 군에 비하여 유의하게 낮았다($P<0.05$). 본 연구 결과는 체외성숙 배지에 PVP의 첨가로 배 발생은 가능하지만, 세포의 품질에는 악영향을 미치는 것을 보여준다.

서 론

일반적으로 소의 미성숙 난포란은 혈청과 성선자극호르몬이 첨가된 TCM-199 배지에서 체외성숙이 유도되고 채공된 난자의 약 90%가 성숙이 되지만 70~75%만이 수정이 된다(Watson 등, 2000). 그 후 5~7일간의 체외 배양과정을 통해 20~30%가 배반포까지 발달하지만(Park 등, 2005), 체내에서 성숙된 난자는 50~80%가 배반포 단

계로 발달한다(Rizos 등, 2002). 따라서 체외성숙된 난포란의 배 발생이 체내에서 성숙된 것에 비하여 저조한 것은 배란전 발달 기간이 없고(Hendriksen 등, 2000) 체외성숙에 이용하는 각종 배지와 첨가물의 조합이 체내의 환경과 차이가 있기 때문일 것이다(Rose 등, 1998; Watson 등, 2000; Ward 등, 2002).

수정란의 배양용 배지에는 혈청이 첨가되어 단백질원, 고정 질소원, 호르몬, 성장인자 및 비타민을 비롯한 unknown factor를 제공한다(Gardner와 Lane, 2000). 그러나

* 본 연구는 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-54-638-6012, E-mail: pys0112@chollian.net

혈청은 에너지 대사의 이상, 미토콘드리아의 구조적 손상 및 지질의 비정상 침착과 같은 유해작용이 있고(Dorland 등, 1994). 특히 체내 환경에서 포유동물의 수정란은 혈청에 노출될 기회가 없다(Gardner와 Lane, 2004). 따라서 혈청을 대체하기 위한 고분자물질들의 이용에 관한 연구가 체외배양 연구 초기부터 시도되었고(Bavister, 1981), 생쥐와 소 수정란의 배양에서 polyvinylalcohol (PVA)나 polyvinylpyrrolidone(PVP)의 효과가 보고되었으나, 그 효과는 의문시 되고 있다(Eckert 등, 1998; Biggers 등, 2000; Ali와 Sirard, 2002).

포유동물 난포란의 발생에서 cortical granule의 분포상과 glutathione(GSH)의 합성은 성숙과 수정 후 배 발생에 많은 영향을 미친다. 특히 cortical granule의 분포상에는 성장인자가, GSH의 합성에는 항산화제가 영향을 미친다. 따라서 체외성숙 및 체외배양 배지에 첨가한 성장인자들은 핵성숙, 난구세포 확장, 배 발생을 및 영양배엽(TB) 세포의 분화에 효과적이었다(Izadyar 등, 1996; Izadyar 등, 1998; Mtango 등, 2003). EGF는 포유류의 초기 배 발달을 촉진하고(Teruel 등, 2000) TB의 성장과 배반포의 부화율을 증가시킨다(Kim 등, 1999). 또한 체외성숙에서 항산화제인 cysteine, cysteamine, cystine 또는 β -mercaptoethanol은 소 난자의 GSH 합성을 증가시켜서(de Matos와 Furnus, 2000) 배 발생율을 향상시켰다(Ali 등, 2003). 이상의 연구에서 수정란의 체외생산에 이용하는 배지에는 각종 첨가물들이 단독 또는 혼합 첨가되어 다양한 효과를 유도하고 있으나, 생산된 배의 품질에 대한 연구는 없었다.

따라서 본 연구는 한우 수정란의 체외 발생에서 PVP의 이용성을 중심으로 1) 체외성숙 배지에 첨가하는 PVP의 농도, 2) EGF, cysteine 및 PVP의 단독 또는 혼합첨가가 체외수정 후 배 발생과 품질에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

배양액

난소로부터 미성숙 난포란의 회수용 배지는 10 mM HEPES와 3 mg/ml bovine serum albumin(BSA; Sigma, St Louis, MO, USA, A9647)이 첨가된 Hepes buffered TALP(HbT) 용액이다. 난포란의 체외성숙용 배지는 0.22 mg/ml pyruvate(Sigma, P5280), 1 mg/ml follicle stimulating hormone(Sigma, F8174), 10 μ g/ml luteinizing hormone(Sigma, L9773), 10 μ g/ml heparin(Sigma, H3149)이 각각 첨가된 TCM199(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)이다. 체외수정용 배지는 6 mg/ml BSA(Sigma, A-6003) 및 10 mg/ml heparin (Sigma, H3149)이 첨가된 IVF-TALP 용액이며, 정자처리용 배지는 3 mg/ml BSA (fraction V; Sigma, A9647)가 첨가된 Sperm-TALP 용액이다. 한편 체외배양용 배지는 3 mg/ml BSA 또는 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액이다. 그리고 실험에 제공되는 모든 배지는 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 최소한 4시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

난포란의 회수 및 체외성숙

도축 한우에서 난소를 적출하여 25 μ g/ml gentamycin (Sigma, G1264)이 첨가된 0.9% 생리식염수(25~28°C)가 들어 있는 보온병에 담아 3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 수집된 난소는 penicillin G(Sigma, P3032)가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하였고 직경 2~8 mm의 가시난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 실험미경하에서 난구세포의 부착상태가 치밀한 것만을 선별하여, 50 μ l의 체외성숙용 배지에 15개 난포란을 옮겨 20시간 동안 39°C, 5% CO₂ 배양기에 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

1) PVP 첨가 농도

체외성숙 배지에 첨가하는 PVP(M.W. 360,000; Sigma, P5288)의 농도를 검토하기 위하여, 대조군은 PVP 대신 10% FBS를 첨가하였고, 실험군은 혈청 미첨가 배지에 각각 0.1, 0.5, 1 및 3%의 PVP를 첨가하였다.

2) EGF, Cysteine 및 PVP 첨가

체외성숙 배지에 대조군은 무첨가, 실험군은 10 ng/ml EGF(Sigma, E9644) 단독 첨가, 0.95 mg/ml cysteine(Sigma, C2529) 단독 첨가, 0.5% PVP 단독 첨가, EGF+cysteine 공동 첨가 및 EGF+cysteine+0.5% PVP 공동 첨가군으로 구분하였다.

체외수정

한우 동결정액 1개를 실온에서 10초간, 37°C의 항온조에서 30초간 처리하여 용해한 후 90% percoll(Sigma, P4937) 2 ml 용액이 담겨져 있는 15 ml 원심관에 살며시 놓은 후 700 \times g에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자만을 회수하여, 2 ml Sperm-TALP 용액으로 350 \times g에서 다시 10 분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 정자농도는 25 \times 10⁶ spermatozoa/ml가 되도록 조절하여, 난포란이 함유되어져 있는 46 μ l의 체외수정용 배지에 heparin 2 μ l와 정자 2 μ l를 첨가(최종 정자농도 1 \times 10⁶ spermatozoa/ml)하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에 20시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

체외배양

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

배반포의 이중형광염색

배양 7일째에 배반포의 세포수를 측정하기 위하여 propidium iodide (PI; Sigma, P4170)와 bisBenzimide (Sigma, B2261)를 사용하여 이중형광염색을 실시하였다. 배반포의 투명대를 0.5% pronase(Sigma, P6911) 용액으로 처리하여 용해시킨 후, HbT로 3~5회 세척하였다. 그리고 rabbit anti-bovine whole serum(Sigma, B8270)이 1:5로 희석된 HbT 용액에서 1 시간 배양한 후, HbT 용액에 1:10으로 희석된 guinea pig complement(Sigma, S1639; PI와 bisbenzimidide가 각각 4 μ g/ml 첨가)에서 1 시간 처리하여 염색을 행하였다. 배반포를 HbT로 5 분간 세척한

후, slide glass에 whole mount하여 형광현미경하에서 배반포의 inner cell mass(ICM)와 TB 세포수를 각각 조사하였다.

수정란 이식

수란우는 경상북도 경산 및 영천 지역의 젖소 사육농가에서 사육중인 홀스타인 미경산우를 이용하였다. 수란우의 발정은 CIDR-plus(InterAg, NewZealand)와 PGF_{2α}(Pharmacia, Belgium)로 유도하였다. 수정란 이식은 발정 후 7일째 수란우에 준비된 한우 배반포(2개)를 비외과적 이식기(MVE, France)에 장착하여 황체가 존재하는 자궁 각의 심부에 이식하였다.

통계처리

실험결과 중에서 배 발생율과 임신율은 χ^2 -test, 세포수는 Duncan's multiple range test를 이용하였다. 유의차는 $P<0.05$ 수준에서 검정을 하였다.

결 과

체외성숙 배지에 첨가하는 PVP의 농도가 배 발달에

미치는 효과를 검토한 결과, 수정율은 65.9~75.2%, 8세포기 발달율은 31.6~37.8%로 유사한 경향이었다(Table 1). 배반포 발달율은 0.5% 첨가군이 27.3%로서 가장 높았고, 3% 첨가군의 15.0%와는 유의차가 인정되었다($P<0.05$).

체외성숙 배지에 PVP, EGF 및 cysteine의 첨가가 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과, 수정율은 cysteine 단독첨가군이 75.6%로서 가장 높았으며, 특히 0.5% PVP 단독첨가군의 65.1%와는 유의차가 인정되었다($P<0.05$, Table 2). 8세포기 발달율은 33.9~41.1%, 배반포 발달율은 21.8~29.4%로서 유사한 경향이었다.

체외성숙 배지에 PVP, EGF 및 cysteine 첨가가 배반포의 세포수에 미치는 효과를 검토한 결과, ICM 세포수는 대조군과 cysteine 단독첨가군이 각각 평균 35.5 및 36.1 개로서 PVP 단독 및 EGF+cysteine 혼합첨가군의 각각 평균 19.1 및 18.9개보다 유의하게 많았다($P<0.05$, Table 3). TE 세포수는 EGF 단독첨가군이 평균 99.3개로서 대조군 및 EGF+cysteine+PVP 혼합첨가군의 각각 평균 71.6 및 74.1개보다 유의하게 많았다($P<0.05$). 그러나 총 세포수는 평균 107.1~132.5개로서 유사한 경향이었다.

PVP, EGF 및 cysteine을 단독 또는 혼합 첨가한 체외성숙 배지에서 생산된 배반포를 이식한 결과, PVP 단독첨가군이 10.0%로서 EGF, cysteine 및 EGF+cysteine 군의 각각 50.0, 63.6 및 50%보다 유의하게 낮았다($P<0.05$, Table 4).

Table 1. Effect of PVP concentration in IVM medium on the development of bovine embryos

Concentrations	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to		
		≥ 2-Cell	8-Cell	Blastocyst
Control	135	92(68.2)	47(34.8)	30(22.2) ^{ab}
0.1%	150	102(68.0)	53(35.3)	36(24.0) ^{ab}
0.5%	165	124(75.2)	62(37.6)	45(27.3) ^b
1.0%	135	89(65.9)	51(37.8)	27(20.0) ^{ab}
3.0%	133	88(66.2)	42(31.6)	20(15.0) ^a

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Table 2. Effect of supplementation of EGF, cysteine and PVP in IVM medium on the development of bovine embryos

Treatment	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to		
		≥ 2-Cell	8-Cell	Blastocyst
Control	165	114(69.1) ^{ab}	56(33.9)	36(21.8)
EGF	160	113(70.6) ^{ab}	60(37.5)	44(27.5)
Cysteine	180	136(75.6) ^b	74(41.1)	53(29.4)
PVP	195	127(65.1) ^a	67(34.4)	52(26.7)
EGF +cysteine	195	144(73.8) ^{ab}	71(36.4)	53(27.2)
EGF +cysteine +PVP	180	122(67.8) ^{ab}	61(33.9)	44(24.4)

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Table 3. Effect of supplementation of EGF, cysteine and PVP in IVM medium on the numbers of inner cell mass, trophoblast and total cells of bovine blastocysts

Treatment	No. of blastocyst	No. (mean±SD) of cells		
		Inner cell mass	Trophoblast	Total
Control	17	35.5±3.0 ^b	71.6±7.6 ^a	107.1±8.8
EGF	17	24.7±2.7 ^{ab}	99.3±6.8 ^c	124.0±8.3
Cysteine	17	36.1±4.8 ^b	96.4±8.2 ^{bc}	132.0±7.1
PVP	17	19.1±4.2 ^a	93.2±7.4 ^{abc}	112.4±10.7
EGF+cysteine	17	28.9±1.7 ^{ab}	92.7±8.4 ^{abc}	111.6±9.4
EGF+cysteine+PVP	17	33.4±3.4 ^{ab}	74.1±6.1 ^{ba}	107.5±5.3

^{a-c} Values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Table 4. Effect of supplementation of EGF, cysteine and PVP in IVM medium on the pregnancy rates after embryo transfer

Treatment	No. of recipient	No. (%) of pregnancy
Control	13	6(46.1) ^{ab}
EGF	12	6(50.0) ^b
Cysteine	11	7(63.6) ^b
PVP	10	1(10.0) ^a
EGF+cysteine	12	6(50.0) ^b

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

고찰

본 연구는 한우 수정란의 체외 발생에서 PVP의 이용성을 중심으로 1) 체외성숙 배지에 첨가하는 PVP의 농도, 2) EGF, cysteine 및 PVP의 단독 또는 혼합첨가가 배 발생과 품질(세포수 및 임신율)에 미치는 영향을 검토하였다.

수정란의 체외배양에 있어서 혈청 단백질은 난포란의 유착과 경화 방지와 같은 물리적 작용 및 배독소의 감소, 영양제공 및 성장인자의 방출과 같은 화학적 작용을 가지고 있다(Gardner와 Lane, 2000). 하지만 혈청은 기형 유발인자와 발생 억제인자의 방출과 같은 유해 작용도 있다(Chatot 등, 1984; Ogawa 등, 1987). 이러한 원인으로 체외배양 연구 초기부터 혈청 대체물질에 대한 연구가 시도되었고, Bavister(1981)가 PVA의 효과를 보고한 이후 혈청을 대체할 수 있는 고분자물질의 이용에 관한 많은 연구가 보고되었으나 그 효과에 대해서는 의문이다(Ohboshi 등, 1996; Ali와 Sirard, 2002). 체외성숙용 SOF 배지에서는 PVP가 효과적이었으나, modified Tyrode 또

는 TCM199 배지에서는 혈청이 효과적으로서 배지의 종류에 따른 차이가 있었다(Ali와 Sirard, 2002). 특히 호르몬이 미첨가 배지에 PVP를 첨가한 경우는 배반포까지 발달하지 못했으나, 호르몬이 첨가된 경우에는 효과적이었었다(Saeki 등, 1991). 한편 체외성숙배지에는 단백질원이 첨가되지 않아도 핵성숙과 배발달이 가능하지만 배반포의 세포수가 적은 문제가 있다(Park 등, 2004b). 또한 PVP의 첨가 수준은 1~8 mg/ml로 각 연구자에 따라 다양하였으나 직접적으로 첨가농도를 비교한 보고는 없었다.

소 미성숙 난포란의 체외성숙율을 향상시키기 위하여 배지에 성선자극호르몬, 성장인자, 항산화제 및 아미노산 등을 첨가한다(Gardner와 Lane, 2000). 성장인자들은 세포 증식과 분화를 조절하고(Mtango 등, 2003), 난포란의 cortical granules 분포상을 증가시켜 핵성숙과 난구세포의 확장 및 이후 수정율과 배 발달에 효과적이었었다(Izadyar 등, 1996; Izadyar 등, 1998). 성장인자는 핵 성숙뿐만 아니라 세포질의 성숙에도 영향을 미치며(Izadyar 등, 1998) 세포 기능을 자극해서 배 발달(Teruel 등, 2000), TB 세포의 성장 및 배반포의 부화율을 증가시킨다(Harper와 Brackett, 1993; Kim 등, 1999). 한편 체외성숙용 배지에 cysteine, cysteamine, cystine 또는 β -mercaptoethanol의 첨가는 소 난자의 GSH 합성을 증가시킨다(de Matos와 Furnus, 2000). TCM199에 함유된 cysteine의 양은 아주 낮은 수준이므로 GSH의 합성을 증가시키기 위해서는 외부로부터 cysteine의 첨가가 필요하다(de Matos 등, 1996). 체외성숙 배지에 cysteine과 EGF는 EGF 단독 또는 혼합첨가는 핵 성숙율과 배반포 발달율이 증가하였다(Ali 등, 2003; Kishida 등, 2004). 그러나 본 연구에서는 이전의 연구와 반대로(Ali 등, 2003; Kishida 등, 2004) 체외성숙 배지에 EGF, cysteine 및 PVP의 단독 및 혼합첨가는 배 발생에 효과가 없었다(Table 2 참조).

여러 조건 하에서 체외 생산된 배반포의 품질 평가에는 배반포의 형태(Linder와 Wright, 1983)와 분화(Behboodi 등, 1995), 세포수(Papaioannou와 Ebert, 1988) 및 산소 대사(Manes와 Lai, 1995) 등을 이용하고 있다. 특히 배반포의 ICM 세포수는 임신율과, 총세포수에 대한 ICM

세포수의 비율은 배반포의 품질 평가에 유효하다고 하였다(van Soom 등, 1997). 소 배반포의 세포수는 체내와 체외 배반포, 체외성숙 시간, 아미노산, ammonia 농도, 혈청과 호르몬 및 배지 등과 같은 요인들에 영향을 받는다(Stojkovic 등, 1998; 박 등, 2004a,b; Park 등, 2005; Park 과 Park, 2005). 본 연구의 결과에서는 EGF, cysteine과 PVP 단독 및 EGF+cysteine 첨가로 TB 세포의 수는 증가하는 경향이었으나, EGF+cysteine+PVP 혼합첨가는 효과가 없었다. ICM 세포수는 PVP 단독 첨가로 ICM 세포가 유의하게 감소하였다(Table 3 참조).

체외성숙 시 PVP의 이용성을 중심으로 연구한 결과 PVP는 혈청의 물리적인 작용을 대체할 수는 있으나, 발생한 배의 품질(세포수와 임신율)에는 유해하였다. 따라서 체외에서 배 발생에는 물리적인 환경 조성뿐만 아니라 화학적인 자극을 통한 세포질 성숙의 유도가 반드시 수반되어야 하므로 성장인자와 같은 화학적 자극인자들이 반드시 첨가되어야 할 것으로 생각한다. 또한 PVP의 이용성을 보장하기 위해서는 세포질 성숙을 유도할 수 있는 효과적인 첨가물의 선별이 필요할 것이다.

인용문헌

1. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA (2003): Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59:939-949.
2. Ali AA, Sirard MA (2002): Effect of the absece or presence of various protein spplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol Reprod* 66:901-905.
3. Bavister BD (1981): Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool* 217:45-51.
4. Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Kreuscher BR, Medrano JF, Murray JD (1995): Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology* 44:227-232.
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. Chatot CS, Klein NW, Clapper ML, Resor SR, Singer WD, Russman BS, Holmes GL, Mattson RH, Cramer JA (1984): Human serum teratogenicity studies by rat embryo culture: epilepst, anticonvulsant druge and nutrition. *Epilepsia*, 25:205.
7. De Matos DG, Furnus CC (2000): The importance of having high glutathion(GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development : Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53:761-771.
8. 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.
9. Dorland M, Gardner DK, Trounson A (1994): Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fertil* 13: 70 (Abstract).
10. Eckert J, Pugh PA, Thompson JG, Niemann H, Ter-vit HR (1998): Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine pre-implantation embryos *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 10:327-332.
11. Gardner DK, Lane M (2000): Embryo culture systems. In: *Handbook of In Vitro Fertilization*, A. Trounson and D.K. Gardner (eds.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp205-264.
12. Gardner DK, Lane M (2004): Culture of the mammalian preimplantation embryo. In: *A laboratory guide to the mammalian embryo*. D.K. Gardner, M. Lane and A.J. Watson (eds.), Oxford, New York: Oxford Uni Press, pp41-61.
13. Harper KM, Brackett BG (1998): Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod* 48: 409-416.
14. Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ (2000): Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology* 53:11-20.
15. Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM (1996): *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 47:175-80.
16. Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM (1998): The promontory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocyte is due imporved cytoplasmic maturation. *Mol Reprod Dev* 49:444-453.
17. Kim C, Chac HD, Cheon YP, Kang BM, Chang YS, Mok JE (1999): The effect of epidermal growth factor on the preimplantation development and its receptor expression in mouse embryos. *J Obstet Gynaecol Res* 25:87-93.
18. Kishida R, Lee ES, Fukui Y (2004): *In vitro* maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 62:1663-1676.
19. Linder GM, Wright WW Jr (1983): Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
20. Manes C, Lai NC (1995): Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J Reprod Fertil* 104:69-75.
21. Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Rajamahen-

- dran R, Suzuki T (2003): Growth factors and growth hormone enhance *in vitro* embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogenology* 59:1393-1402.
22. Ogawa T, Ono T, Marrss RP (1987): The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos *in vitro*. *J Vitro Fertil Embryo Transfer* 4:153-158.
 23. Ohboshi S, Hanada K, Zhao J, Hattori M, Fujihara N, Umetsu, Yoshida T, Tomogane H (1996): *In vitro* development of bovine one-cell embryos fertilized *in vitro* in serum and feeder cell-free culture systems. *Asian-Australasian J Anim Sci* 9:583-590.
 24. Papaioannou VE, Ebert KM (1988): The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophoctoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* 102:793-80.
 25. Park YS, Park HD (2005): Effect of the concentration of ammonia in maturation medium on the development and cell numbers of Korean Native Cow embryos. *Reprod Dev Biol* 29:31-36.
 26. Park YS, Kim SS, Kim JM, Park HD, Byun MD (2005): The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology* 64:123-134.
 27. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002): Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61:234-248.
 28. Rose TA, Libersky EA, Bavister BD (1998): Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 6:285-294.
 29. Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL (1991): *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum free medium. *Biol Reprod* 44:256-260.
 30. Stojkovic M, Buttner M, Zakhartchenko V, Brem G, Wolf E (1998): A 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* 27:1-9.
 31. Teruel M, Smith R, Catalano R (2000): Growth factors and embryo development. *Bio Cell* 24:107-122.
 32. Van Soom A, Vanroose G, Bols PEJ, Boerjan ML, Ysebaert MT, de Kruif A (1997): Morphology and/or hatching ability of *in vitro* produced bovine embryos is no reliable indicator of inner cell mass cell. *Theriogenology* 47:302 (Abstract).
 33. Watson AJ, Sousa PD, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME (2000): Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol Reprod* 62:355-364.
 34. 박용수, 김소섭, 최수호, 박노찬, 변명대, 박흥대 (2004a): 체외성숙 배지에 아미노산의 첨가가 한우 난포란의 핵성숙과 배발달에 미치는 영향. *Reprod Dev Biol* 28:29-36.
 35. 박용수, 박흥대, 김재명 (2004b): 체외성숙용 배지에 혈청과 호르몬의 첨가가 한우난포란의 핵성숙과 배발달 및 배반포의 세포수에 미치는 영향. *한국수정란 이식학회지* 19:229-237.
- (접수일자: 2006. 2. 10 / 채택일자: 2006. 3. 13)