

생쥐 1-세포기 배아의 체외성장에 미치는 Albumin의 영향

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실
손 영 수

= Abstract =

The Effect of Bovine Serum Albumin on in Vitro Growth and Development of Mouse One-Cell Stage Embryos

Young-Soo Son

Department of Ob/Gyn, College of Medicine, Ewha Womans University

This study was carried out to investigate the effect of bovine serum albumin on in vitro growth and development of mouse(C57BL×CBA) one-cell stage embryos in simple and complex media.

One-cell stage mouse embryos were differentiated to two-cell stage at an identical rate regardless of the nature of the media, simple(m-KRB) or complex(Ham's F-10). When bovine serum albumin was added to the media, one-cell stage embryos were also differentiated to two-cell stage at an identical rate in both simple and complex media.

So, therefore, exogenous factors such as the ingredients of media and protein supplementation did not seem to affect the early in vitro growth and development of one-cell stage mouse embryos to two-cell stage.

But, the late in vitro growth and development of one-cell stage mouse embryos from two-cell stage through blastulation in complex medium were superior to those in simple medium.

And the late in vitro growth and development in bovine serum albumin supplemented simple medium was better than in bovine serum albumin free simple medium, but the late in vitro growth and development in bovine serum albumin supplemented complex medium was identical to those in bovine serum albumin free complex medium.

However, there is no definite conclusion to be made for including or for omitting protein in the preparation of media for the culture of preimplantation embryos. Rather, there may be some specific needs that depend on the species of embryos and on their stage of development, and perhaps on the purity of other ingredients of the media.

서 론

생체내에서 일어나는 자연적인 수정과정을 체외에서 유발하는 것을 체외 수정이라 한다. 사람에서는 1965년 Edwards¹⁾에 의해 최초로 시도되었고 1978년에는 체외수정 및 배아의 자궁내 이식의 방법에 의해 최초의 시험관 아기가 탄생한 바 있다²⁾.

체외에서 수정과 성장을 하기 위해서는 생체내에서의 조건과 유사한 환경을 만들어 주어야 하는데, 이러한 환경은 수 많은 인자들의 복잡한 상호관계에 의해 유지될 수 있다³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾.

배양액의 종류, 즉 단순배양액이나 복합배양액이나에 따라서 체외수정과 성장이 상당한 영향을 받으며 물을 비롯하여 배양액에 첨가되는 각종 성분 때문에 따라서도 성장은 크게 달라질 수 있다⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾.

단백질 성분의 보충을 위해서 사람의 체외수정 프로그램에서는 분만시 채취된 사람의 태아제대혈청이나 환자에게서 채취된 배란전기혈청을 흔히 사용하고 있으나 때로 소혈청 알부민을 사용하기도 한다¹²⁾. 소혈청 알부민은 사람의 제대혈청이나 배란전기혈청에 비해 손 쉽게 구할 수 있고 또한 AIDS등의 사람 혈청사용으로 인해 감염될 수 있는 각종 전염성 질환을 방지할 수 있는 장점을 지니고 있다.

사람의 체외수정 및 배아의 자궁내 이식의 성공율을 높이기 위해서는 동물실험을 통해서 체외수정과 성장에 필요한 다양한 조건들을 비교 연구하는 것이 필수적이다¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾.

본 연구는 생쥐 1-세포기 배아를 이용하여 단순배양액과 복합배양액에서의 소혈청 알부민의 첨가에 따른 체외성장을 비교 분석함으로써, 배양액에 단백질 성분의 보충을 위해 사용되는 소혈청 알부민의 1-세포기 배아의 체외성장에 대한 영향을 알아보기 위하여 시행되었다.

연구대상 및 연구방법

1. 실험동물

생후 4주 내지 6주사이의 재 1대잡종(C57BL X

CBA) 생쥐를 이용하였다.

사료와 물은 자유롭게 취할 수 있도록 해주었다. 광량조절은 명암교대로 12시간씩 해 주었고 평균 온도 22°C의 환풍시설이 갖추어진 사육실에서 1~2주간 적응토록 한 후 실험에 사용하였다.

2. 과배란 유도

과배란 유도는 5 IU의 임신한 말의 혈청 성선 자극호르몬(pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma # G-4877, 이하 PMSG로 약함)과 5 IU의 임부용 모성 성선자극 호르몬(human chorionic gonadotropin, Sigma # CG-2, 이하 HCG로 약함)을 50시간 간격으로 각각 복강내 주사하였다. 주사용 호르몬은 생리식염수에 희석하여 1ml(50 IU)씩 1회용 주사기에 분주한 후 냉동실(-20°C)에 보존하여 사용하였다. HCG 주사 후에는 즉시 암컷을 수컷 우리에 넣어 암컷과 수컷의 비율이 2:1이 되도록 교배 시켰다.

3. 배아의 회수

실험에 사용할 1세포기 배아는 HCG 주사 24시간 후에 30개이지 주사침이 부착된 일회용 튜버클린 주사기를 이용하여 난관 팽대부를 절단함으로써 난구 복합체가 배양액으로 흘러 나오도록 하였다. 현미경은 실체현미경을 이용하였으며, 회수용기는 일회용 petri dish(35×10mm, FALCON 3001)를 사용하였고, 배아의 회수액은 0.3% 소혈청 알부민(bovine serum albumin, Sigma G-4877)이 첨가된 인산완충액(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)을 사용하였다. 회수된 생쥐의 배아는 같은 숫자로 각각의 실험군에 배치하였다.

4. 배양액의 제조

1) m-KRB 배양액의 제조 과정

모든 용기는 배양액 제조 직전에 물로 2번 헹군다. Stock I 용액의 제조는 Beaker I에 40ml 정도의 물을 넣고 NaCl 663.8mg KCL 432.0mg, KH₂PO₄ 19.4mg, MgSO₄·7H₂O 34.8mg을 순서대로 용해시킨다. Beaker II에 40ml 정도의 물을 넣고 CaCl₂·2H₂O 30.0mg을 넣어 자석교반기로 30분 이상 녹인다. Beaker I과 II의 용액을 섞은 후 phenol red 0.1mg을 넣고 100ml의 부피를 맞춘후, 삼투압을 측정하여 230±5mOsm/kg·H₂O가 되도록 보정하

였다.

Stock II 용액의 제조는 40ml의 물을 넣고 $\text{NaHCO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1300.0mg을 용해시키고 Phenol red 0.2 mg을 넣은 후 50ml의 volumetric flask에 붓고 물을 첨가하여 50ml가 되게 한후 이 용액의 삼투압을 측정하여 $270 \pm 5 \text{mOsm/kg H}_2\text{O}$ 가 되도록 보정하였다.

Stock I 용액 83.35ml와 stock II 용액의 16.31ml를 혼합한 후 Glucose 100.0mg, Streptomycin 5.0mg, Penicillin 7.5mg, Sodium-pyruvate 5.5mg, Sodium-lactate 0.2ml를 첨가한 후 서서히 용해하여 m-KRB 100ml 용액의 삼투압을 측정하여 $270 \pm 10 \text{mOsm/kg H}_2\text{O}$ 가 되도록 보정하였다.

2) Ham's F-10 배양액의 제조과정

모든 용기는 배양액 제조 직전에 물로 2회 헹군후 volumetric flask에 물(600ml)을 붓고 Ham's F-10 분말을 넣어 자석교반기에서 서서히 용해시킨다. 100ml의 물에 2.1g의 sodium bicarbonate(sigma, # S5761)를 녹이고 다른 100ml의 물에 0.2452mg의 Ca-lactate(Calbiochem. # 901244)를 넣어 자석교 반기로 30분 이상 용해시키고, 또 다른 100ml의 물을 넣은 beaker에 각각 7.5mg의 penicillic(Sigma, # PEN-NA)과 streptomycin(Sigma, # S-6501)을 넣고 잘 녹인다.

상기한 sodium bicarbonate를 녹인 용액을 Ca-lactate를 용해시킨 용액에 Ca-lactate를 용해시킨 용액에 혼합한 후 이 혼합액을 penicillin 및 streptomycin을 녹인 용액에 첨가한다. 이 용액을 Ham's F-10용액에 조금씩 흔들면서 서서히 첨가한 후 물을 volumetric flask 1L 눈금까지 넣은 후 잘 섞고 삼투압을 측정한다. 최종삼투압을 $280 \text{mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 로 조정한 후 0.2 μ millipore filter로 여과 후 4 $^\circ\text{C}$ 냉장고에 보존한다.

3) 모든 실험과정에 필요한 물은 고순도물(Boxter, #367-4)을 사용하였고 실험과정에 필요한 albumin은 소혈청 albumin(Sigma, G-4877)을 사용

하여 0.4% (W/V)씩 첨가하였다.

5. 배아의 배양 및 발생관찰

배아는 실험 목적에 따라 albumin비 첨가, albumin 0.4% 첨가의 m-KRB와 Ham's F-10의 두 가지 배양액에서 배양되었다. 배아는 배양접시(FALCON 3037, Becton Dickinson)의 중앙부(inner well)에서 배양되었고, 배양기(Forma Scientific)는 5% CO_2 , 99% 습도, 37 $^\circ\text{C}$ 온도로 조절하여 사용하였다. 배아의 발생관찰은 실험현미경(X80)하에서 시행하였고 관찰시각은 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후에 관찰하였다.

6. 통계분석

통계학적 유의성 검증은 Percent test를 이용하여 시행하였다.

실험결과

1. 실험배아수

8마리의 생쥐(C57BLXCBA)에서 과배란유도로 120개의 배아를 획득하여 albumin을 첨가하지 않은 m-KRB 배양액과 Ham's F-10 배양액에 30개씩, 그리고 0.4% albumin을 첨가한 m-KRB 배양액과 Ham's F-10 배양액에 마찬가지로 30개씩 배아를 균등 배치하였다(Table 1).

2. 배양 24시간 후의 배아의 초기 성장상태

(Table 2)

Albumin을 첨가하지 않은 m-KRB 배양액에서는 총 30개의 1-세포기 배아중 83.3%인 25개의 배아가 정상적으로 2-세포기 이상의 배아를 성장하였고, albumin을 첨가한 m-KRB 배양액에서는 총 30개의 1-세포기 배아중 96.7%인 29개의 배아가 정상적으로 2-세포기 이상의 배아로 성장하여 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

Ham's F-10 배양액에서도 albumin을 첨가하지 않은 경우 총 30개의 1-세포기 배아 중 93.3%인

Table 1. Recruitment of 1-cell stage mouse embryos

	m-KRB	Ham's F-10	m-KRB+Albumin	Ham's F-10+Albumin
No. of mice treated	2	2	2	2
No. of eggs used in experiment	30	30	30	30

Table 2. Early in-vitro development of 1-cell stage mouse embryo

	m-KRB	Ham's F-10	m-KRB+Albumin	Ham's F-10+Albumin
Total No. of eggs	30	30	30	30
% of eggs normally cleaved over 2-cell	83.3 ^{a0}	93.3 ^{b0}	96.7 ^{c0}	96.7 ^{d0}
% of abnormal eggs	16.7 ^{a1}	6.7 ^{b1}	3.3 ^{c1}	3.3 ^{d1}

(a0,c0), (b0,d0), (a0,b0), (c0,d0) : not significant

(a1,c1), (b1,d1), (a1,b1), (c1,d1) : not significant

Table 3. Late in-vitro development of 1-cell stage mouse embryo

	m-KRB	Ham's F-10	m-KRB+Albumin	Ham's F-10+Albumin
Total No. of eggs	30	30	30	30
% of blastocysts	26.7 ^{a0}	76.7 ^{b0}	90.0 ^{c0}	86.7 ^{d0}
% of hatching or hatched blastocysts	3.3 ^{a1}	70.0 ^{b1}	76.7 ^{c1}	63.3 ^{d1}

(a0,c0), (a0,b0) : $p < 0.05$ (bo,do), (co,do) : not significant

(a1,c1), (a1,b1) : $p < 0.05$ (b1,d1), (c1,d1) : not significant

28개의 배아가 정상적으로 2-세포기 이상의 배아로 성장하였고, albumin을 첨가한 경우에는 총 30개의 1-세포기 배아중 96.7%인 29개의 배아가 정상적으로 2-세포기 이상의 배아로 성장하여 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

또한 m-KRB 배양액과 Ham's F-10 배양액을 대비시켜 볼 때에도 albumin을 첨가하지 않은 경우 m-KRB 배양액에서의 83.3%, Ham's F-10 배양액에서 93.3%로 두 군 사이에 유의한 차이가 없었고, albumin을 첨가한 경우 m-KRB 배양액과 Ham's F-10 배양액에서 동일하게 96.7%를 나타내어 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

3. 배양 120시간 후의 배아의 성장상태

(Table 3)

Albumin을 첨가하지 않은 m-KRB 배양액에서는 총 30개의 1-세포기 배아중 26.7%인 8개의 배아가 포배기 배아를 성장하였고, albumin을 첨가한 m-KRB 배양액에서는 총 30개의 1-세포기 배아중 90.0%인 27개의 배아가 포배기 배아로 성장하여 두 군 사이에 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). Ham's F-10 배양액에서는 albumin을 첨가하지 않는 경우 76.6%, albumin을 첨가한 경우 86.7%로 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다. 한편 포배기 배아로 성장한 배아의 비율을 m-KRB 배양액과 Ham's F-10 배양액에서 대비시켜 볼 때 albumin을 첨가하지

않은 경우 각각 26.7%와 76.6%로 두 군 사이에 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). 그러나 albumin을 첨가한 경우에도 m-KRB 배양액에서는 90.0%, Ham's F-10 배양액에서는 86.7%로 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

부화를 일으킨 포배기 배아의 비율은 albumin을 첨가하지 않은 m-KRB 배양액에서는 3.3%이었고 albumin을 첨가한 m-KRB 배양액에서는 76.7%로 두 군 사이에 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). Ham's F-10 배양액에서는 albumin을 첨가하지 않은 경우 70.7%, albumin을 첨가한 경우 63.3%로 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다. 한편 부화 포배기 배아의 비율을 m-KRB 배양액과 Ham's F-10 배양액에서 대비시켜 볼 때 albumin을 첨가하지 않은 경우 각각 3.3%와 70.0%로 두 군 사이에 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). 그러나 albumin을 첨가한 경우에는 각각 76.7%와 63.3%로 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

고 찰

사람의 혈청에는 cyclic adenosine monophosphate, catecholamines, 각종 vitamins, 성장인자, 지질, 알부민 등의 다양한 물질이 포함되어 있으므로 시험관아기 프로그램에서는 사람의 태아제대혈청이나 환자의 배란전기혈청이 배양액에 흔히 첨가

되어 사용된다. 그러나 이와 같은 혈청첨가의 효과에 대한 평가는 연구자마다 일률적이지 못하다¹⁵⁾ (16)17).

동물실험에 있어서도 소혈청 알부민이나 다른 단백질 성분이 배양에 도움이 될 것으로 생각하여 배양액에 보통 첨가되나 배아의 성장, 적어도 초기의 상실배 시기까지의 성장에 있어 필수요건이 된다는 결정적 증거는 없는 실정이다.

Kane¹⁸⁾은 소혈청 알부민 속에 포함되어 있는 소혈청 알부민 이외의 성분들이 토끼 포배기 배아의 부화를 촉진하여, 토끼 배아의 성장에 소혈청 알부민이 필요한 이유는 소혈청 알부민 속에 포함되어 있는 저분자량의 미확정 단백질 결합 성장인자 때문이라고 하였다¹⁹⁾. 또한 소혈청 알부민 속에는 지방산이 포함되어 있어 이 지방산의 토끼 배아의 성장에 필요한 에너지의 공급원으로서 작용한다고 하였다²⁰⁾.

그러나 8세포기까지의 성장에는 외부로부터의 영양물질의 공급이 거의 불필요하므로 이 시기에 배양액에 혈청을 첨가하는 일은 무의미한 것이 될 수 있다. 실제로 Rhesus 원숭이 배아의 초기 분열에는 일부 중요한 아미노산만 공급해 주면 혈청의 첨가는 불필요하다²¹⁾.

본 연구에서도 착상전 배아의 성장 발육 세포기의 차이는 다소 있으나 유사한 결과를 나타냈다. 즉 1-세포기 생쥐배아는 배양액의 종류에 상관없이 2-세포기 배아로 정상분열을 하였으며 단순배양액인 m-KRB 배양액과 복합배양액인 Ham's F-10 배양액에 소혈청 알부민을 첨가했을 때에도 배양액의 종류에 상관없이 같은 수준의 성장 발육을 보였다. 따라서 1-세포기 생쥐 배아는 초기의 2-세포기까지의 성장 발육 단계에서 배양액의 구성성분 및 소혈청 알부민 첨가 여부등의 외부적인 요인의 영향을 거의 받지 않은 것으로 사료된다. 그러나 2-세포기에서 포배기 또는 부화 포배기까지의 성장발육은 본 연구에서 단순배양액에서보다 복합배양액에서 유의하게 높은 비율로 나타났으며, 단순배양액에 소혈청 알부민을 첨가한 경우에는 첨가하지 않은 경우에 비하여 유의하게 높은 성장 발육을 보였으나, 복합배양액에서는 소혈청 알부민의 첨가가 성장 발육에 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다.

Wiley등²²⁾은 소혈청 알부민을 단독으로 첨가했을 때보다 소혈청면역글로블린을 함께 첨가했을 때 2-세포기 생쥐 배아의 성장을 더욱 촉진하며 배아내 세포수는 단백질 성분의 첨가에 의존적임을 보고하였다.

소혈청 알부민의 chelating agent로서의 잠재적 효과가 배아의 성장에 영향을 미칠 수 있으나 이러한 효과는 아미노산의 첨가만으로 대신 할 수 있을 것으로 생각된다²⁰⁾²³⁾.

생쥐 중에는 2-세포기에서 포배기까지 성장하는데²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾, 또는 포배기 배아가 부화하는데²⁷⁾ 단백질 성분의 첨가를 필요로 하지 않는 종자도 있다. 또한 Caro와 Trounson²⁸⁾은 단백질 성분을 첨가하지 않은 배양액에서 성장한 포배기 배아를 이식한 후 생쥐 태아의 성장발육이 정상적으로 이루어짐을 보고하였으나 이들 중 일부 배양액에서는 단백질 성분의 첨가가 배아의 체외성장을 억제하여 저해요인으로 작용할 수 있는 것으로 나타났다.

사람의 체외수정 프로그램의 경우에는 모체혈청을 포함하는 배양액과 단백질 성분을 전혀 첨가하지 않은 배양액에서 수정율, 배아의 초기 성장 발육, 임신성공율에 있어 유의한 차이가 없었다는 보고도 있다²⁹⁾.

사람 태아 체대혈청을 배아의 초기 성장 발육 단계에 사용하는 것 역시 과학적인 근거가 불분명하다. 왜냐하면 태아체대혈청은 그 질적인 면에 있어 일률적이지 못할 뿐 아니라 배아에 독성을 나타내는 경우도 흔히 있기 때문이다³⁰⁾. 사람 태아체대혈청을 배양액에 첨가 할 경우에 기대되는 효과는 초기 성장 단계에서가 아니라 부화기 이후 생쥐 배아의 영양성분에 대한 요구의 증가 및 성장의 특성상의 필요를 충족시켜 줄 수 있다는 점이다³¹⁾.

이러한 현상은 본 연구에서도 유사하게 나타나 1-세포기 생쥐 배아의 착상전 발육이 후기 단계로 갈수록 복합배양액 또는 소혈청 알부민의 첨가를 필요로 하는 현상으로 관찰된다.

그러나 착상전 배아의 체외성장에 사용되는 배양액에 단백질 성분을 첨가하느냐, 첨가하지 않느냐의 문제는 단정적으로 결론 지을 수는 없을 것으로 생각되며, 오히려 동물의 종, 배아의 성장 발육 단계에 따라서 특수한 필요가 있을 수 있으며 배

양액에 포함되는 다양한 구성성분의 순도에 따라 서로 그 특수한 필요가 달라 질 수 있을 것이다.

결 론

배양액에 단백질 성분의 보충을 위해 사용되는 소혈청 알부민의 1-세포기 배아의 체외성장에 대한 영향을 알아 보기 위하여 생쥐 1-세포기 배아를 이용하여 단순배양액과 복합배양액에서의 소혈청 알부민의 첨가에 따른 체외성장을 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

즉 1-세포기 생쥐 배아는 배양액의 종류에 상관없이 2-세포기 배아로 정상분열을 하였으며 단순배양액인 m-KRB 배양액과 복합배양액인 Ham's F-10 배양액에 소혈청 알부민을 첨가 했을 때에도 배양액의 종류에 상관없이 같은 수준의 성장 발육을 보였다. 따라서 1-세포기 생쥐 배아는 초기의 2-세포기 까지의 성장 발육 단계에서 배양액의 구성성분 및 소혈청 알부민 첨가여부 등의 외부적인 요인의 영향을 거의 받지 않는 것으로 사료된다. 그러나 2-세포기에서 포배기 또는 부화 포배기까지의 성장 발육은 본 연구에서 단순배양액에서보다 복합배양액에서 유의하게 높은 비율로 나타났으며, 단순배양액에 소혈청 알부민을 첨가한 경우에는 첨가하지 않은 경우에 비하여 유의하게 높은 성장 발육을 보였으나, 복합배양액에서는 소혈청 알부민의 첨가가 성장 발육에 영향을 주지 못하는 것으로 사료된다.

그러나 착상전 배아의 체외성장에 사용되는 배양액에 단백질 성분을 첨가하느냐, 첨가하지 않느냐의 문제는 단정적으로 결론 지을 수는 없을 것으로 생각되며, 오히려 동물의 종, 배아의 성장 발육 단계에 따라서 특수한 필요가 있을 수 있으며 배양액에 포함되는 다양한 구성성분의 순도에 따라 서로 그 특수한 필요가 달라 질 수 있을 것이다.

References

- 1) Edwards RG : *Maturation in vitro of human ovarian oocytes. Lancet 1965 : 2 : 296*
- 2) Steptoe PC, Edwards RG : *Birth after the implantation of a human embryo. Lancet 1978 : 2 : 366*

- 3) Saito H, Berger T, Mishell DR Jr, Marrs RP : *The effect of serum fraction on embryo growth. Fertil Steril 1984 : 41 : 761*
- 4) Dandeker PV, Quigley MM : *Laboratory setup for human in vitro fertilization. Fertil Steril 1984 : 42 : 1*
- 5) Army M, Nachtigal L, Quagliarello J : *The effect of preimplantation culture condition of murine embryo implantation and fetal development. Fertil Steril 1987 : 48 : 861*
- 6) Parinaud J, Reme J, Monrozies X, Farvin S, Sarra-mon M, Ponronnier G : *Mouse system quality control is necessary before transfer. J Vitro Fert Embryo Transfer 1987 : 4 : 56*
- 7) Davidson A, Vermesh M, Lobo RA, Paulson RJ : *Mouse embryo culture as quality control for human in vitro fertilization : the one-cell versus the two-cell model. Fertil Steril 1988 : 49 : 516*
- 8) Fukuda A, Noda Y, Tsukui S, Matsumo H, Yano J, Mori T : *Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. J Vitro Fert Embryo Transfer 1987 : 4 : 40*
- 9) Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA : *Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J Reprod Fertil 1972 : 30 : 493*
- 10) Ham RG, McKeehan WL : *Media and growth requirements. 1979 in THE MAMMALIAN PREIMPLANTATION EMBRYO(Regulation of Growth and Differentiation in vitro), (Bavister BD eds.), Plenum Press, New York and London, 1987 pp342*
- 11) Quinn P, Warnes GM, Kerin JF, Kirby C : *Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 1984 : 41 : 202*
- 12) Mohr L, Trounson A : *In vitro fertilization and embryo growth. 1984 in Clinical In Vitro Fertilization (Wood C, Trounson A eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp104*
- 13) Condone-Mahony M, Worthan JWE Jr, Bundren JC, Witmyer J, Sherlay B : *Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F-10 medical, and in vitro culture material with a mouse in vivo fertilization system Fertil Steril 1985 : 44 : 521*
- 14) Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, Acosta AA, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wilkes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright G : *The program for in vitro fertilization at Norfolk. Fertil Steril 1982 :*

38 : 14

- 15) Ogawa T, Marrs RP : *The effect of protein supplementation on single cell mouse embryos in vitro*. *Fertil Steril* 1986 : 47 : 156
- 16) Leung PCS, Gronow MJ, Kellow GN, Lopata A, Speris AL, McBain JC, du Plessis YP, Johnston I : *Serum supplementation in human in vitro fertilization and embryo development*. *Fertil Steril* 1984 : 41 : 36
- 17) Menezo Y, Testart J, Perrone D : *Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer*. *Fertil Steril* 1984 : 42 : 750
- 18) Kane MT, Heaton DR : *The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts*. *J Reprod Fertil* 1980 : 60 : 469
- 19) Kane MT : *A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion in vitro*. *J Reprod Fertil* 1985 : 73 : 147
- 20) Kane MT : *Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae*. *Biol Reprod* 1979 : 20 : 323
- 21) Bavister BD, Boatman DE, Leibfried ML, Loose M, Vernon MW : *Fertilization and cleavage of rhesus monkey oocytes in vitro*. *Biol Reprod* 1983 : 28 : 983
- 22) Wiley LM, Yamami S, Van Muyden D : *Effect of potassium concentration, type of protein supplementation, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro*. *Fertil Steril* 1986 : 45 : 111
- 23) Daniel JC Jr, Olson JD : *Amino acid requirements for cleavage of the rabbit ovum*. *J Reprod Fertil* 1968 : 15 : 453
- 24) Brinster RL : *Effect of glutathione on the development of two-cell mouse embryo in vitro*. *J Reprod Fertil* 1968 : 17 : 521
- 25) Cholewa J, Whitten WK : *Development of 2-cell mouse embryos in the absence of a fixed nitrogen source*. *J Reprod Fertil* 1970 : 22 : 553
- 26) Kuzan FB, Pomeroy KO, Seidel GE : *Polyvinyl alcohol as a macro-molecular substitute for bovine serum albumin in mouse embryo culture medium*. *Biol Reprod* 1982 : 26 : 65
- 27) Spindle AI, Pederson RA : *Hatching, attachment, and outgrowth of mouse blastocysts in vitro : fixed nitrogen requirements*. *J Exp Zool* 1973 : 186 : 305
- 28) Caro CM, Trounson A : *The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro*. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1984 : 1 : 183
- 29) Caro CM, Trounson A : *Successful fertilization, embryo development and pregnancy in human in vitro fertilization(IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein*. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1986 : 3 : 215
- 30) Shirley B, Wortham JWE Jr, Witmyer J, Condon-Mahony M, Fort G : *Effect of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture media*. *Fertil Steril* 1985 : 43 : 129
- 31) Hsu YC : *In vitro development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage*. *Dev Biol* 1979 : 68 : 453