

체내 수정된 2-세포기 생쥐배자의 체외성장 및 발육에 미치는 소혈청 알부민의 영향에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실

손 영 수

= Abstract =

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

Youn-Soo Son

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Womans University

In order to investigate the effect of bovine serum albumin on in vitro growth and development of F₁ hybrid mouse(C57BL×CBA) two cell stage embryos fertilized in vivo in simple(m-KRB) and complex(Ham's F-10) media, this study was performed and the results as follows are obtained.

1) When the early preimplantation in vitro growth and development to the stage of 4 cell or more was observed, in simple media the growth and development was suppressed significantly with an addition of bovine serum albumin and in complex media the growth and development was enhanced significantly with an addition of bovine serum albumin.

When the comparison was made between simple media with bovine serum albumin and complex media with bovine serum albumin, the growth and development in complex media with bovine serum albumin was significantly greater.

2) When the late preimplantation in vitro growth and development to the stage of blastocyst or hatched blastocyst was observed, in simple media the growth and development was suppressed significantly with an addition of bovine serum albumin and in complex media the growth and development was enhanced significantly with an addition of bovine serum albumin.

When the comparison was made between simple media with bovine serum albumin and complex media with bovine serum albumin, the growth and development in complex media with bovine serum albumin was significantly greater.

Judging from this, in preimplantation in vitro growth and development of two cell stage mouse(C57BL×CBA) embryos fertilized in vivo the media with additional nutrients and protein substances that might be much larger amount than usual would be necessary.

However, as the preimplantation in vitro growth and development might be variant according to the strains of mouse and different stages of the growth and development every effort should be made to clarify the characteristics of preimplantation in vitro growth and development

among various animal species and different development stages.

So, therefore, human in vitro fertilization and embryo transfer program would be much progressed with an aid of such experimental researches.

서 론

최초로 인간 난자에 대한 체외수정¹⁾이 시도된 후 30년이 흐른 현재, 체외수정 프로그램은 불임 치료의 방법으로 확고한 지위를 차지하고 있다.

그러나 아직껏 해결하지 못하고 있는 가장 큰 문제점은 많은 연구 성과에도 불구하고 임신 성공률이 크게 향상되고 있지 못하다는 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 실험실에서는 체외에서의 수정과 배양에 적합한 조건을 찾아내기 위해 많은 실험 연구를 시행하고 있으며²⁻⁷⁾, 실제 임상에서도 과배란유도 방법을 개선하여 보다 질 좋은 난자를 얻기 위하여 많은 시도를 하고 있다⁸⁾.

체외 수정과 성장발육을 위한 조건들 중에서 배양액의 종류 즉, 단순배양액, 복합배양액 여부에 따라서 체외 수정과 성장발육이 현저히 달라질 수 있으며 물을 비롯하여 배양액에 첨가되는 각종 성분 때문에 성장발육이 크게 영향을 받는다⁹⁻¹²⁾.

동물 실험을 통해서 볼 때 배자의 성장 단계에 따라서 필요로 하는 성장발육조건이 다양하게 나타난다¹³⁻¹⁶⁾. 특히 착상전 체외 성장발육 단계에서 배양액에 첨가되는 첨가물에 따라 체외성장 및 발육이 현저하게 영향을 받는다¹⁷⁻²⁰⁾.

본 연구는 착상전 체외 성장발육 단계 중 중요한 단계인 체내 수정된 2 세포기 생쥐배자의 포배기 및 부화 포배기까지의 성장 및 발육 과정에서의 소혈청알부민 첨가의 영향을 관찰하여 사람의 체외수정 프로그램의 임상에서 태아이식 시기의 결정 또는 각 세포기에 따른 단백질 성분 및 영양성분 첨가 정도의 결정 등에 응용하기 위한 기준으로 삼고자 하여 실험을 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

생후 4주 내지 6주 사이의 제 1 대 잡종(C57BL

×CBA) 생쥐를 이용하였다.

사료와 물은 자유롭게 취할 수 있도록 해주었다. 광량조절은 명암교대로 12시간씩 해주었고 평균 온도 22℃의 환풍시설이 갖추어진 사육실에서 1~2 주간 적응토록 한 후 실험에 이용하였다.

2. 과배란 유도

과배란 유도 5IU의 임신한 말의 혈청 성선자극 홀몬(pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma #G-4877)과 5IU의 임부 용모 성선자극홀몬(human chorionic gonadotropin, Sigma #CG-2)을 50 시간 간격으로 각각 복강내 주사하였다. 주사용 홀몬은 생리식염수에 희석하여 1ml(50IU)씩 1회용 주사기에 분주한 후 냉동실(-20℃)에 보존하여 사용하였다. HCG 주사 후에는 즉시 암컷을 수컷 우리에 넣어 암컷과 수컷의 비율이 2:1이 되도록 교배시켰다.

3. 배자의 회수

실험에 사용할 1 세포기 배자는 HCG 주사 48 시간후에 30개이지 주사침이 부착된 일회용 튜버클린 주사기를 이용하여 난관 팽대부를 절단함으로써 난구복합체가 배양액으로 흘러 나오도록 하였다.

현미경은 실제현미경을 이용하였으며, 회수용기는 일회용 petri dish(35×10mm, FALCON 3001)을 사용하였고, 배자의 회수액은 0.3% 소혈청 알부민(bovine serum albumin, Sigma G-4877)이 첨가된 인산완충액(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)을 사용하였다. 회수된 생쥐의 배자는 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 43.2mg, KH₂PO₄ 19.4 mg, MgSO₂ · 7H₂O 34.8mg을 순서대로 용해시킨

다. Beaker II에 40ml 정도의 물을 넣고 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30.0mg을 넣어 자석교반기로 30분 이상 녹인다. Beaker I과 II의 용액을 섞은후 phenol red 0.1mg을 넣고 100ml의 부피를 맞춘 후, 삼투압을 측정하여 $230 \pm 5\text{mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 가 되도록 보정하였다.

Stock II 용액의 제조는 40ml의 물을 넣고 $\text{NaHCO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 650.0mg을 용해시키고 Phenol red 0.2mg을 넣은 후 50ml의 volumetric flask에 붓고 물을 첨가하여 50ml가 되게 한 후 이 용액의 삼투압을 측정하여 $270 \pm 5\text{mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 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 $270 \pm 10\text{mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 가 되도록 보정하였다.

2) Ham's F-10 배양액의 제조과정

모든 용기는 배양액 제조 직전에 물로 2회 헹군 후 volumetric flask에 물(600ml)을 붓고 Ham's F-10 분말을 넣어 자석교반기에서 서서히 용해시킨다. 100ml의 물에 2.1g의 sodium bicarbonate(sigma, #S 5761)를 녹이고 다른 100ml의 물에 0.2452mg의 Ca-lactate(Calbiochem, #901244)를 넣어 자석교반기로 30분 이상 용해시키고, 또 다른 100ml의 물을 넣은 beaker에 각각 7.5mg의 penicillin(Sigma, #PEN-NA)과 streptomycin(Sigma, #S-6501)을 넣고 잘 녹인다.

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

3) 모든 실험과정에 필요한 물은 고순도물(Boxter, #367-4)을 사용하였고 실험과정에 필요한 albumin은 소혈청 albumin(Sigma, G-4877)을 사용하여 0.4%(W/V)씩 첨가하였다.

5. 배자의 배양 및 발생관찰

배자의 실험목적에 따라 albumin 비첨가, albumin 0.4% 첨가의 m-KRB와 Ham's F-10의 두가지 배양액에서 배양되었다. 배자는 배양접시(FALCON 3037, Becton Dickinson)의 중앙부(inner well)에서 배양되었고, 배양기(Forma Scientific)는 5% CO_2 , 99% 습도, 37°C 온도로 조절하여 사용하였다. 배자의 발생관찰은 실체현미경($\times 80$)하에서 시행하였고 배양 24, 48, 72, 96시간 후에 관찰하였다.

6. 통계분석

통계학적 유의성 검정은 Percent test를 이용하여 시행하였다.

실험결과

1. 실험 배자수

제 1대 잡종 생쥐(C57BL \times CBA) 16마리를 이용하여 과배란유도하여 140개의 체내수정된 2 세포기 배자를 획득하였다. 이 중 35개의 배자를 소혈청알부민을 첨가하지 않은 m-KRB 배양액에, 34개의 배자를 소혈청알부민을 첨가하지 않은 Ham's F-10 배양액에, 그리고 36개 배자를 0.4% 소혈청알부민을 첨가한 m-KRB 배양액에, 35개의 배자를 0.4% 소혈청 알부민을 첨가한 Ham's F-10 배양액에 나누어 넣어 배양하였다(Table 1).

2. 체내 수정된 2 세포기 배자의 착상전 초기 체외 성장발육

배양 24시간 후 관찰에서 소혈청 알부민을 첨가하지 않은 m-KRB 배양액에서는 총 35개의 2 세포기 배자 중 94.3%인 33개의 배자가 정상적으로

Table 1. Recruitment of two stage mouse embryos fertilized in vivo

	m-KRB	Ham's F-10	m-KRB+BSA	Ham's F-10+BSA
No. of mice treated	4	4	4	4
No. of eggs used in experiment	35	34	36	35

BSA : Bovine Serum Albumin

4 세포기 이상의 배자로 성장발육하였고, 소혈청알부민을 첨가한 m-KRB 배양액에서는 총 36개의 배자중 77.8%인 28개의 배자가 정상적으로 4 세포기 이상의 배자로 성장발육하여 첨가군이 비첨가군에 비해 유의하게 낮은 비율을 보였다($p < 0.05$).

소혈청알부민을 첨가하지 않은 Ham's F-10 배양액에서는 총 34개의 2 세포기 배자중 85.3%인 29개의 배자가 정상적으로 4 세포기 이상의 배자로 성장발육하였고, 소혈청알부민을 첨가한 Ham's F-10 배양액에서는 총 35개의 배자중 100%인 35개 전체 배자가 정상적으로 4 세포기 이상의 배자로 성장발육하여 첨가군이 비첨가군에 비해 유의하게 높은 비율을 보였다($p < 0.05$).

한편 소혈청알부민을 첨가하지 않은 m-KRB 배양액에서와 Ham's F-10 배양액에서의 정상적인 4 세포기 이상으로의 착상전 초기 체외 성장발육 비율은 각각 94.3%와 85.3%로 유의한 차이를 보이지 않았으며, 소혈청알부민을 첨가한 경우에는 Ham's F-10에서의 경우 100%로 m-KRB에서의 77.8%에 비해 유의하게 높은 비율을 보였다($p < 0.05$) (Table 2).

3. 체내 수정된 2 세포기 배자의 착상전 후기 체외 성장발육

배양 96시간 후 관찰에서, 소혈청알부민을 첨가

하지 않은 m-KRB 배양액에서는 총 35개의 2 세포기 배자 중 94.3%인 33개의 배자가 포배기 배자로 성장발육하였고, 소혈청알부민을 첨가한 m-KRB 배양액에서 총 36개의 2 세포기 배자 중 75%인 27개의 배자가 포배기 배자로 성장발육하여 첨가군이 비첨가군에 비해 유의하게 낮은 비율을 보였다($p < 0.05$).

소혈청알부민을 첨가하지 않은 Ham's F-10 배양액에서는 총 34개의 2 세포기 배자중 85.3%인 29개의 배자가 포배기 배자로 성장 발육하였고, 소혈청알부민을 첨가한 Ham's F-10 배양액에서는 총 35개의 2 세포기 배자 중 100%인 전체 35개의 배자가 포배기 배자로 성장발육하여 첨가군이 비첨가군에 비해 유의하게 높은 비율을 보였다($p < 0.05$).

한편 소혈청알부민을 첨가하지 않은 m-KRB 배양액에서와 Ham's F-10 배양액에서의 포배기 배자로의 착상전 후기 체외성장발육 비율은 각각 94.3%와 85.3%로 유의한 차이를 보이지 않았으며, 소혈청 알부민을 첨가한 경우에는 Ham's F-10에서의 경우 100%로 m-KRB에서의 75%에 비해 유의하게 높은 비율을 보였다($p < 0.05$).

부화 포배기 배자의 비율에 있어서는 포배기 배자로의 체외 성장발육 비율과 같은 양상으로 유의한 차이를 보였다(Table 3).

Table 2. Early preimplantation in vitro growth and development of two cell stage mouse embryos fertilized in vivo

	m-KRB	Ham's F-10	m-KRB+BSA	Ham's F-10+BSA
Total No. of eggs	35	34	36	35
% of eggs normally cleaved over 4-cell	94.3 ^{a0}	85.3 ^{b0}	77.8 ^{c0}	100 ^{d0}
% of abnormal eggs	5.7 ^{a1}	14.7 ^{b1}	22.2 ^{c1}	0 ^{d1}

(a_0, c_0), (b_0, d_0), (c_0, d_0) : $p < 0.05$

(a_1, c_1), (b_1, d_1), (c_1, d_1) : $p < 0.05$

Table 3. Late preimplantation in vitro growth and development of two cell stage mouse embryos fertilized in vivo

	m-KRB	Ham's F-10	m-KRB+BSA	Ham's F-10+BSA
Total No. of eggs	35	34	36	35
% of blastocysts	94.3 ^{a0}	85.3 ^{b0}	75.0 ^{c0}	100 ^{d0}
% of hatching or hatched blastocysts	45.7 ^{a1}	61.8 ^{b1}	69.4 ^{c1}	94.3 ^{d1}

(a_0, c_0), (b_0, d_0), (c_0, d_0) : $p < 0.05$

(a_1, c_1), (b_1, d_1), (c_1, d_1) : $p < 0.05$

고 찰

체의수정 및 체외성장을 위한 최적의 조건을 인위적으로 만들어 준다는 것은 매우 섬세하고도 어려운 일이다. 또한 각 세포기마다의 특성이 상이한 때문에¹³⁻¹⁶⁾ 각 세포기에 따른 최적의 수정 및 배양 조건을 찾는다는 것은 더욱 어려운 일이다.

배양액의 종류에 따라서 즉, 단순배양액 또는 복합배양액이나에 따라서 착상전 초기 배자의 체외 성장발육이 영향을 받을 뿐 아니라 배양액에 첨가되는 각종 첨가물 특히 알부민 등의 단백질 성분에 따라서도 착상전 초기 배자의 체외 성장발육이 많은 영향을 받는다¹³⁻²⁰⁾.

동물의 종류에 따라서 rhesus 원숭이의 경우 체외 수정 배자의 8 세포기 배자까지의 착상전 초기 체외성장발육은 외부로부터의 영양분 공급 없이도 정상적으로 이루어진다고 하였고¹⁰⁾, 1 세포기 생쥐배자의 2 세포기까지의 체외 성장발육은 배양액의 종류가 단순배양액이나 복합배양액이나에 무관하게 정상적으로 이루어졌으며, 또한 단순배양액과 복합배양액에 소혈청알부민을 첨가하였을 때에도 첨가와는 무관하게 같은 양상의 정상적인 체외 성장발육을 보였다고 하였다²⁰⁾.

본 연구에서는 체내 수정된 2 세포기 생쥐배자의 착상전 체외 성장발육을 관찰한 바 rhesus 원숭이나 1 세포기 생쥐배자의 경우와는 달리 4 세포기까지의 착상전 초기 체외 성장발육이 배양액에 대한 소혈청알부민의 첨가 여부에 따라서 유의하게 다르게 나타났다. 즉, 단순배양액의 경우에는 소혈청알부민의 첨가로 오히려 착상전 초기 체외 성장발육이 저해되었으며 복합배양액의 경우에는 소혈청알부민의 첨가로 유의하게 착상전 초기 체외 성장발육이 촉진되었다. 또한 소혈청 알부민을 첨가한 단순배양액과 복합배양액의 비교에서는 복합배양액에서 유의하게 착상전 초기 체외성장 발육이 촉진되는 양상을 보였다.

이는 1 세포기 생쥐배자의 경우 초기 착상전 체외 성장발육이 배양액의 종류 및 소혈청 알부민 첨가 여부 등의 외부적인 요인의 영향을 거의 받지 않는다고 보고²⁰⁾와는 다른 결과이다.

이를 근거로 판단해 볼 때 체내 수정된 2 세포기

제 1 대 잡종 생쥐배자의 착상전 초기 체외성장발육에 외부에서의 각종 단백질 공급과 영양물질 공급은 불필요한 것이 아니라 오히려 어떤 기준량 이상으로 더욱 많은 단백질과 영양물질 공급이 필요하다고 볼 수 있다고 하겠다.

생쥐배자의 착상전 후기 체외 성장발육에 대해서도 보고가 다양하다. 이들 보고 중에는 2 세포기 생쥐배자가 포배기까지 또는 부화 포배기까지 체외 성장발육하는 데에 단백질 성분의 첨가가 불필요하다는 보고도 있고¹⁷⁻¹⁹⁾, 오히려 단백질 성분의 첨가로 인하여 배자의 체외 성장발육이 저해되었다는 보고도 있으며²¹⁾, 단백질 성분의 첨가를 필요로 하는 시기는 오히려 부화 포배기 이후라는 보고도 있다²²⁾.

1 세포기 생쥐배아의 경우 착상전 후기 체외 성장발육은 단순배양액보다는 복합배양액에서 촉진되고 단순배양액에 소혈청알부민의 첨가로 또한 마찬가지로의 촉진 효과를 나타냈다²⁰⁾.

본 연구에서의 체내수정된 2 세포기 생쥐배자의 착상전 후기 체외 성장발육은 초기 체외 성장발육 양상과 마찬가지로 단순배양액에서는 소혈청알부민의 첨가로 유의하게 저해되었고 복합배양액에서는 소혈청알부민의 첨가로 유의하게 촉진된 양상을 보였다. 그리고 1 세포기 생쥐배자의 착상전 후기 체외 성장발육의 양상과는 달리 단순배양액과 복합배양액에서 차이를 보이지 않았고, 단순배양액뿐 아니라 복합배양액에서도 소혈청 알부민의 첨가로 유의한 성장발육 촉진 효과를 보였다. 소혈청알부민을 첨가한 단순배양액과 복합배양액에서는 복합배양액에서 유의하게 착상전 후기 체외 성장발육이 촉진되었다.

이는 체내 수정된 2 세포기 제 1 대 잡종(C57 BLXCBA) 생쥐배자의 착상전 후기 체외 성장발육에 있어서도 어떤 기준량 이상의 많은 단백질과 영양물질 공급을 필요로 한다는 것을 시사한다고 볼 수 있다.

이와 같이 배양액의 종류 및 단백질 공급 또는 기타 영양물질 공급의 영향은 생쥐의 종자 및 생쥐배자의 세포기에 따라 매우 다양한 양상을 보이고 있으며¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²¹⁾, 본 연구에서도 제 1 대 잡종(C57 BLXCBA)의 경우 1 세포기 배자²⁰⁾와 비교해 볼 때 2 세포기 배자의 착상전 초기 및 후기 체외

성장발육은 현저한 차이를 보여 주었다. 따라서 체외수정 프로그램의 발전과 함께 정보관리체계의 확립뿐 아니라 난자의 획득, 수정, 체외 성장발육 및 배아이식에 적절한 기간과 시점을 결정하기 위해서는 사람을 포함하여 보다 많은 동물의 종류에 대해서 보다 세분된 세포기에 대한 개별적인 실험연구가 행해져야 할 것으로 생각된다.

결 론

체내 수정된 2 세포기 제1대 잡종(C57BL×CBA) 생쥐배자의 착상전 체외 성장 및 발육에 미치는 소혈청알부민의 영향을 알아보기 위하여 단순배양액과 복합배양액을 이용하여 소혈청알부민의 첨가에 따른 배양액에서의 체외 성장발육을 관찰, 비교 및 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 착상전 초기 체외 성장발육을 관찰한 바, 단순배양액의 경우 소혈청알부민의 첨가로 성장발육이 유의하게 저해되었으며, 복합배양액의 경우에는 소혈청알부민의 첨가로 성장발육이 유의하게 촉진되었다. 또한 소혈청알부민을 첨가한 단순배양액과 복합배양액의 비교에서는 복합배양액에서 성장발육이 유의하게 촉진되었다.

2) 착상전 후기 체외 성장발육을 관찰한 바, 착상전 초기 체외 성장발육 양상과 마찬가지로 단순배양액의 경우 소혈청알부민의 첨가로 성장발육이 유의하게 저해되었고, 복합배양액의 경우에는 소혈청알부민의 첨가로 성장 발육이 유의하게 촉진되었다. 또한 소혈청알부민을 첨가한 단순배양액과 복합배양액의 비교에서는 복합배양액에서 성장발육이 유의하게 촉진되었다.

위의 결과로 미루어 보아 체내 수정된 2 세포기의 제1대 잡종(C57BL×CBA) 생쥐배자의 착상전 초기 및 후기 체외 성장발육에는 어떤 기준량 이상의 단백질 및 영양물질의 공급이 필요하다고 생각된다.

그러나 위와 같은 착상전 체외 성장발육 양상은 모두 생쥐의 종류, 또는 모든 세포기에 대해 공통되는 것은 아니므로 체외수정 프로그램에서 난자의 획득, 수정, 체외 성장발육 및 배아이식에 적절한 기간과 시점을 결정하기 위해서는 사람을 포함하여 보다 많은 동물의 종류에 대해서 보다 세분된 세

포기에 대한 개별적인 실험연구가 행해져야 할 것으로 생각된다.

References

- 1) Edwards RG : *Maturation in vitro of human ovarian oocytes. Lancet* 1965 : 2 : 296
- 2) Saito H, Berger T, Mishell DR, Jr, Marrs RP : *The effect of serum fraction on embryo growth. Fertil Steril* 1984 : 41 : 761
- 3) Dandeker PV, Quigley MM : *Laboratory setup for human in vitro fertilization. Fertil Steril* 1984 : 42 : 1
- 4) Army M, Nachtigall L, Quagliarello J : *The effect of preimplantation culture condition of murine embryo implantation and fetal development. Fertil Steril* 1987 : 48 : 861
- 5) 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
- 6) 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 Sterol* 1988 : 49 : 516
- 7) 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
- 8) Martin MC : *Gonadotropin Releasing Hormone Agonists and the induction or augmentation of ovulation. j Reprod Med* 1989 : 34(12) : 1034
- 9) 김충현 · 정경순 · 박소현 · 황도영 · 김기철 · 민웅기 : *ICR계 생쥐 1세포배를 이용한 수질의 평가. 대한불임학회 잡지* 1994 : 21(1) : 63
- 10) Tervit HR, Whittigham DG, Rowson LEA : *Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J Reprod Fertil* 1972 : 30 : 493
- 11) Yam RG, McKeehan WL : *Media and growth requirements. 1989 in The Mammalian Preimplantation Embryo (Regulation of Growth and Differentiation in vitro), (Bavister BD eds), Plenum Press, New York and London, 1987, pp342*
- 12) 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
- 13) 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
 - 14) 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
 - 15) Kane MT : *Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae.* *Biol Reprod* 1979 : 20 : 323
 - 16) Bavister BD, Boatman DE, Leibfried ML, Loose M, Vernon MW : *Fertilization and cleavage of rhesus monkey oocytes in vitro.* *Biol Reprod* 1983 : 28 : 983
 - 17) Brinster RL : *Effect of glutathione on the development of two-cell mouse embryo in vitro.* *J Reprod Fertil* 1968 : 17 : 521
 - 18) Cholewa J, Whitten WK : *Development of 2-cell mouse embryos in the absence of a fixed nitrogen source.* *J Reprod Fertil* 1970 : 22 : 553
 - 19) 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
 - 20) 손영수 : 생쥐 1-세포기 배아의 체외성장에 미치는 Albumin의 영향. *이화의학대지* 1992 : 15(4) : 375
 - 21) Spindle AI, Pederson RA : *Hatchment and outgrowth of mouse blastocysts in vitro : fixed nitrogen requirements.* *J Exp Zool* 1973 : 186 : 305
 - 22) Hsu YC : *In vitro development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage.* *Dev Biol* 1979 : 68 : 453