

체외수정배양액내에 첨가된 필수·비필수아미노산, Taurine 또는 Glycine이 소 난자의 분할 및 체외발육에 미치는 영향

이은송·이병천*·황우석*
일본 오비히로 축산대학

Effect of Essential and Non-essential Amino Acids, Taurine or Glycine Supplemented to Fertilization Medium on *In Vitro* Cleavage and Development of Bovine Oocytes Matured and Fertilized *In Vitro*

E. S. Lee, B. C. Lee* and W. S. Hwang*

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

SUMMARY

Essential and non-essential amino acids supplemented to culture medium stimulate mammalian embryo development *in vitro*. Amino acids such as glycine, taurine and alanine are concentrated in the lumen of oviduct and uterus and it can be thought that these amino acids may have physiological role on fertilization and embryo development. Our aim of this experiment was to investigate the effects of essential and non-essential amino acids, taurine or glycine supplemented to fertilization medium on the cleavage and subsequent *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*.

Immature oocytes were obtained from slaughtered Holstein cows and heifers and matured in TCM199 containing 10% fetal calf serum, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of FSH and LH and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of estradiol with granulosa cells *in vitro*. After maturation, oocytes were coincubated with sperm in fertilization medium supplemented with Minimum Essential Medium (MEM) essential and non-essential amino acids, taurine (3.75 mM) or glycine (10 mM) for 30 hours *in vitro*. Inseminated oocytes were cultured in synthetic oviduct fluid medium (SOFM) containing MEM essential, non-essential amino acids and 1 mM glutamine up to 8 days after fertilization.

Supplementation of fertilization medium with MEM essential and non-essential amino acids lowered significantly ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) the cleavage rate after 30 hours of IVF (53.3%) and at Day 3 (62.7%; Day 0: the day of IVF) compared to control (64.3% and 77.3%, respectively). Subsequent developmental rates to morulae (Mo) and expanding blastocysts (ExBL) also significantly decreased ($p < 0.001$ and $p < 0.05$ for Mo and ExBL) when oocytes were coincubated with sperm in the medium containing MEM amino acids. Taurine added to fertilization medium have not increased the cleavage rate over the control, whereas glycine showed significantly lower ($p < 0.01$) cleavage rate at Day 3 than that of taurine, but there was no significant difference in the developmental rates to Mo

* 서울대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

and ExBL of bovine embryos irrespective of the supplementation of taurine or glycine to fertilization medium.

In conclusion, supplementation of fertilization medium with essential and non-essential amino acids, taurine or glycine has no beneficial effect on *in vitro* cleavage and development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*.

(Key word : *in vitro* fertilization, bovine embryo, amino acids, taurine, glycine)

서 론

포유동물 난자의 체외수정 및 체외배양에 관한 연구는 정자와 난자의 수정과정을 규명하고 수정란의 발생생리를 이해하기 위한 방법으로 시작되어 현재에는 가축개량 및 수정란의 대량생산을 위한 방법의 일환으로 진행되고 있다. 소에서의 체외수정은 도축된 소의 난소로부터 1회에 다수의 미성숙 난자를 채취하여 체외에서 성숙, 수정 및 배양함으로써 수정란의 대량생산이 가능하게 되었으나 체외 성숙 및 수정 후 배반포단계까지 발육되는 수정란의 비율은 10~40%로 아직 낮은 실정이다(Greve 등, 1993; Takahashi와 First, 1993). 따라서 수정란의 생산효율을 증가시키기 위한 방법으로서 체외수정시간(Rehman 등, 1993), 체외배양시 각종 체세포와의 공배양(Eyestone 등, 1991; Eyestone과 First, 1989), 세포성장인자(Rappolee 등, 1988; Paria와 Dey, 1990) 및 에너지원(Kim 등, 1993; Rosenkrans 등, 1993)이 수정란의 발육에 미치는 영향에 대하여 활발히 연구되고 있다.

최근 각종 아미노산이 포유동물 수정란의 체외발육에 미치는 영향을 조사한 결과에서 필수 및 비필수아미노산, glycine, alanine 등이 체외배양되는 수정란의 발육을 증가시키는 것으로 보고되었으며(Keskintepe 등, 1995; Gardner와 Lane, 1993; Moor와 Bondioli, 1993), 난관 및 자궁내에는 다양한 아미노산이 존재하는데(Rousseau와 Menezo, 1993; Miller와 Schultz, 1987) 특히 taurine은 난관상피세포 monolayer로부터 다량으로 생산되며(Rousseau와 Menezo, 1993) 정자의 hyperactivation을 유도한다(Aitken, 1990). 또한 glycine 및 alanine은 난관 및 자궁내에서 고농도로 검출되는데(Rousseau와 Menezo, 1993) 생식도관내에 이러한 고농도의 아미노산이 존재한다는 사실은 난자의

수정과정 및 수정란의 체외발육에 대해 아미노산이 중요한 역할을 담당할지도 모른다는 가능성을 시사한다. 현재 체외수정에는 modified TALP(Parrish 등, 1986), BO배양액(Brackette와 Oliphant, 1975) 등이 사용되고 있으며, 정자의 수정능획득 및 침체반응 유도를 위한 물질로서 heparin(Parrish 등, 1994; Parrish 등, 1985) 및 caffeine(Pomeroy 등, 1988; Ohgoda 등, 1987) 등이 사용되고 있으나 수정배양액내에 여러 가지 아미노산의 첨가가 체외수정후의 난분할 및 체외발육에 미치는 영향을 조사한 연구 결과는 많지 않다.

이에 본 실험에서는 체외수정 배양액에 20종류의 필수 및 비필수아미노산을 첨가하여 난분할 및 체외발육에 미치는 영향을 조사하고, 난관 및 자궁내에 고농도로 존재하는 것으로 알려진 taurine 및 glycine을 수정배양액에 단독으로 첨가함으로써 이들 아미노산이 소 난자의 분할 및 배발육에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

도축장에서 난소를 채취하여 35℃의 멸균 생리식염수가 들어 있는 보온병에 넣어 1시간 내에 실험실로 운반하였다. 주사침(18 gauge)이 연결된 5 ml의 주사기로 0.3%(w/v) BSA(fatty acid-free, fraction V, Sigma Chemical Co., USA), 10 mM HEPES(Sigma Chemical Co., USA) 및 2 mM sodium bicarbonate 첨가 TCM199(세정용 TCM199)을 소량 흡인한 후 직경 약 2~5 mm의 소난포로부터 미성숙난자를 채취하였다. 미성숙난자는 Kastrop 등(1990)의 기준에 준하여 4~5층 이상의 치밀한 난구세포가 부착되어 있고 균질한 세포질을 갖는 난자만을 선발하였다.

미성숙난자의 채취와 동시에 Moor와 Trounson

(1977)의 방법에 준하여 과립막세포를 채취하였다. 직경 약 10 mm의 난포를 선별하여 주위의 결합조직을 제거한 후 난포막을 파열시켜 난포의 내강을 밖으로 노출시켰다. 세정용 TCM199내에서 핀셋으로 난포내벽의 과립막세포를 박리, 채취한 후 2회 원심, 세정하였으며(500×g, 5분) 원심후 50×10⁶ 개/mL의 세포부유액을 만들어 과립막세포의 최종 농도가 2×10⁶ 개/mL가 되도록 성숙용 배양액내에 첨가하였다.

체외성숙에는 4-well dish(Nuclon, Denmark)를 이용하였으며, 10%(v/v) fetal calf serum(FCS), 2.5 µg/mL FSH, 2.5 µg/mL LH 및 1 µg/mL estradiol을 첨가한 TCM199(ICN biomedical Inc., UK)을 배양액으로 이용하였다. 배양개시전 4-well dish의 각 well에 500 µL의 배양액을 5% CO₂ 배양기내에 정치시켰다. 선별된 미성숙난자는 세정용 TCM199으로 3회 세정후 성숙용 TCM199으로 1회 세정하여 과립막세포가 첨가된 4-well dish의 한 well에 30~40개를 넣어 39℃, 5% CO₂, 95% 공기 및 95% 이상의 습도 조건을 갖춘 배양기(CO₂ 배양기)내에서 24시간 성숙배양하였다.

2. 체외수정

정자처리 및 체외수정은 Parrish 등(1986)의 방법에 준하여 실시하였으며, modified Tyrode's medium(Parrish 등, 1985; Parrish 등, 1988; mTALP)을 기본배양액으로 이용하였다.

난자의 성숙배양 22시간후에 Holstein종 동결정액을 37℃의 온수에 용해하여 정자의 운동성을 확인한 후 Pasteur pipette으로 1 mL의 수정능획득용 mTALP가 들어 있는 9~10개의 플라스틱 시험관(Becton Dickinson Labware, USA) 저부에 0.2 mL의 정액을 분주하여 CO₂ 배양기내에서 1시간 swim-up처리하였다. Swim-up 종료후 시험관 상부 0.8 mL를 흡인하여 15 mL의 원심관에 모은 후 2회 원심, 세정하였으며(500×g, 5분), 혈구계산판으로 정자의 수를 산정하여 50×10⁶ 개/mL가 되도록 정자부유액을 작성하였다. 수정능획득을 위하여 정자부유액과 동량의 200 µg/mL heparin(Sigma Chemical Co., USA) 용액을 첨가, CO₂ 배양기내에서 15분간 정치하였다.

정자처리전 플라스틱 petri dish(Becton Dickinson Labware, USA)에 수정용 mTALP로 43 µL의 미소적을 만든 후 미네랄 오일(E. R. Squibb & Sons Inc., USA)을 도포하여 CO₂ 배양기내에 정치하였다. 성숙배양 23시간째에 체외성숙난자를 회수하여 세정용 mTALP로 3회 세정한 후 4~6개의 난자를 3 µL의 배양액과 함께 흡인, 미리 작성해 둔 수정용 미소적내에 주입하였으며 여기에 정자농도가 2×10⁶ 개/mL가 되도록 정자부유액(4 µL)을 첨가하여 5% CO₂ 배양기내에서 30시간 체외수정하였다.

3. 체외배양

체외배양에 사용한 배양액은 합성난관배양액(Tervit 등, 1972; SOFM)을 기초배지로 8 mg/mL BSA, 2%(v/v) Minimum Essential Medium(MEM) 필수아미노산(Life Technologies Inc., USA), 1%(v/v) MEM 비필수아미노산(Life Technologies Inc., USA) 및 1 mM glutamine(Waco Pure Chemical Industries, Japan)을 첨가하여 사용하였으며, 플라스틱 petri dish(Becton Dickinson Labware, USA)에 30 µL의 체외배양용 미소적을 작성, 미네랄 오일을 도포하여 배양기내에 정치하였다. 체외수정 종료후 난자를 10 mM HEPES 및 2 mM sodium bicarbonate가 포함된 세정용 SOFM으로 옮겨 가볍게 pipetting함으로써 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였으며, 1세포기 난자 및 분할된 수정란을 선별하여 각각 다른 미소적내에서 배양하였다. 체외배양은 39℃, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 및 습도가 포화상태인 배양기내에서 수정후 8일까지 배양하였으며 배양 2일, 5일 및 8일째에 수정란을 관찰하여 분할율, 상실배 및 배반포로의 발생률을 산정하였다. 단 실험2에서 30시간 체외수정후의 1세포기 난자는 수정후 3일까지의 분할율만을 산정하였다.

4. 실험설계

실험 1에서는 수정용 mTALP내에 MEM 필수 및 비필수아미노산, 1 mM glutamine의 첨가가 수정후 분할 및 체외발육에 미치는 영향을, 실험 2에서는 수정용 mTALP내에 첨가한 taurine 또는

glycine이 소 난자의 분할 및 체외발육에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

결 과

1. 실험 1

체외수정시 수정용 배양액에 첨가한 필수 및 비필수아미노산이 소 난자의 분할 및 체외발육에 미치는 영향을 검토한 결과는 다음과 같다. 아미노산 첨가군은 30시간 수정후 및 수정후 3일째의 분할율이 각각 53.3%($p < 0.05$) 및 62.7%($p < 0.001$)로 D 대조군에 비해 유의적으로 낮은 분할율을 나타내었다(Table 1). 또한 체외발육률에서도 아미노산 첨가 배양액으로 수정한 군은 24.2% 및 14.8%의 상실배 ($p < 0.001$) 및 확장배반포($p < 0.05$)로의 발육

률로 대조군의 40.3 %, 22.7%보다 유의적으로 낮은 발육률을 나타내었다(Table 2).

2. 실험 2

수정용 배양액에 taurine 또는 glycine을 첨가하여 체외수정한 결과 30시간 수정후의 분할율은 각 군간에 유의적인 차이가 없었으며, 수정후 3일째의 분할율은 glycine 첨가군이 74.0%로 대조군의 80.1%와는 유의적인 차이가 없었으나 taurine 첨가군의 82.7%에 비해 유의적으로 낮은 분할율을 나타내었다($p < 0.01$; Table 3). 체외배양결과 상실배 및 확장배반포로의 발육률에는 대조군, taurine 및 glycine 첨가군 각 군간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(Table 4).

Table 1. Effect of essential and non-essential amino acids supplemented to fertilization medium on cleavage of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*

IVF medium	No. of embryos inseminated ^b	No. (%) of embryos cleaved at	
		30 hours after IVF	Day 2
mTALP	238	153 (64.3) ^c	184 (77.3) ^e
mTALP-AA ^a	244	130 (53.3) ^d	153 (62.7) ^f

^a AA: MEM essential, non-essential amino acids and 1 mM glutamine.

^b Three replicates.

^{c, d, e, f} Different superscripts differ significantly (^c $p < 0.05$, ^{e, f} $p < 0.001$).

Table 2. Effect of essential and non-essential amino acids supplemented to fertilization medium on subsequent *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*

IVF medium	Stage at the time of culture	No. of embryos cultured ^b	No. (%) of embryos developed to ^c	
			Mo	ExBL
mTALP	1-cell	85	12 (14.1)	4 (4.7)
	2-cell ≤	153	84 (54.9)	50 (32.7)
	Total	238	96 (40.3) ^d	54 (22.7) ^f
mTALP-AA ^a	1-cell	114	3 (2.6)	1 (0.9)
	2-cell ≤	130	56 (43.1)	35 (26.9)
	Total	244	59 (24.2) ^e	36 (14.8) ^g

^a AA: MEM essential, non-essential amino acids and 1 mM glutamine.

^b Three replicates.

^c Mo: morula, ExBL; expanding blastocyst.

^{d, e, f, g} Different superscripts differ significantly (^{d, e} $p < 0.001$, ^{f, g} $p < 0.05$).

Table 3. Effect of taurine or glycine supplemented to fertilization medium on cleavage of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*

IVF medium ^a	No. of embryos inseminated ^b	No. (%) of embryos cleaved at	
		30 hours after IVF	Day 2
Control	578	388 (67.1)	463 (80.1) ^{cd}
Taurine	572	401 (70.1)	473 (82.7) ^c
Glycine	558	362 (64.9)	413 (74.0) ^d

^a Taurine: 3.75 mM, glycine: 10 mM.

^b Five replicates.

^{cd} Different superscripts differ significantly ($p < 0.01$).

Table 4. Effect of taurine or glycine supplemented to fertilization medium on subsequent *in vitro* development of 2- to 4-cell bovine embryos matured and fertilized *in vitro*

IVF medium ^a	No. of embryos cultured ^b	No. (%) of embryos cleaved at ^c	
		Mo	ExBL
Control	388	190 (49.0)	119 (30.7)
Taurine	401	201 (50.1)	130 (32.4)
Glycine	362	173 (47.8)	105 (29.0)

^a Taurine: 3.75 mM, glycine: 10 mM.

^b Five replicates.

^c Mo: morula, ExBL: expanding blastocyst.

고찰

체의수정 배양액에 필수 및 비필수아미노산, taurine 또는 glycine의 첨가가 소 난자의 분할 및 체외 발육에 미치는 영향에 대해 검토하였다. 난관 및 자궁내에서는 다양한 아미노산이 분비되는데 특히 glycine과 alanine은 고농도로 존재하며, 난관상피 세포 monolayer는 taurine을 다량으로 생산한다고 보고되었다(Rousseau와 Menezo, 1993). 이들중 몇가지 아미노산은 정자에 의해 직접 대사되어 에너지원으로 사용된다고 알려져 있으나(Rousseau와 Menezo, 1993) 아미노산이 정자와 난자의 수정과정 및 체외발육에 미치는 영향에 대해서는 구체적으로 밝혀져 있지 않다.

실험 1에서 수정시 배양액에 20종류의 MEM 필수 및 비필수아미노산을 첨가시 분할율이 유의적으로 저하되었으며 배반포의 발육률도 대조군에 비해 저하되었다(Table 1, 2). 실험 2에서는 taurine 또는 glycine을 수정배양액에 첨가하여 분할 및 체

외발육에 대한 영향을 검토하였는데 taurine 또는 glycine의 첨가는 소 난자의 분할율을 증가시키지 못했으며, glycine 첨가군은 taurine 첨가군에 비해 유의적으로 낮은 분할율을 나타냈으나(Table 3) 30 시간 수정후 분할한 수정란을 배양한 실험 2의 결과에서는 수정시 taurine 또는 glycine의 첨가 유무에 관계없이 상실배 및 확장배반포에의 발육률에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(Table 4). 수정배양액내의 아미노산의 작용에 대해서는 다른 연구자들의 보고를 접한 바 없어 직접적인 비교는 불가능하나 생식도관내에 다양한 아미노산의 존재에도 불구하고 오히려 수정후의 난분할을 억제한 것은 아미노산이 난관 및 자궁세포와 상호 관련되어 정자의 이동 및 수정과정에 작용하는 것으로 추측된다. 또한 glutamine과 같은 아미노산은 불안정하므로 배양액내에 첨가시 급속히 분해되어 암모니아 이온을 형성하는데 이렇게 생성된 암모니아 이온은 수정란의 발육을 저해하는 것으로 보고되어 있다(Gardner 등, 1994; Trounson 등, 1994). 정자에 대한 암모니아 이온의 영향에 대해서는 확실하지 않으나

수정배양액내의 아미노산으로부터 생성된 암모니아 이온도 정자 및 수정란에 영향을 미쳤을 가능성을 생각할 수 있으며 이에 대해서는 더욱 연구할 필요가 있다고 판단된다. 실험 1에서 체외배양시 상실배 및 배반포로의 발육률이 저하된 것은 분할율의 저하에 기인된 것으로 판단되며, 체외수정 30시간 후에도 분할하지 않은 1세포기 난자를 체외배양시 2.5%(5/199; Table 2)의 확장배반포로의 발육률을 나타냈는데 이 결과로부터 체외수정에 의한 소 수정란의 효율적인 생산측면에서 수정 30시간후의 1세포기 난자를 배양할 것인가에는 의문이 제기된다.

이상의 결과로 보아 수정배양액내에 첨가된 필수 및 비필수아미노산은 소 난자의 수정후의 분할을 억제함으로써 체외발육률을 저하시키는 것으로 판단되며, taurine 또는 glycine은 체외성숙된 소 난자의 수정후의 분할율 및 발육률을 개선하는 효과가 없는 것으로 사료된다.

적 요

소의 체외수정에 있어서 수정배양액내에 첨가된 필수 및 비필수아미노산, taurine 또는 glycine이 소 난자의 분할 및 체외발육에 미치는 영향을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수정시 배양액내에 20종류의 필수 및 비필수아미노산을 첨가시 대조군에 비해 분할율 (77.3% vs 62.7%, $p < 0.001$) 및 확장배반포로의 발육률(22.7% vs 14.8%, $p < 0.05$)이 유의적으로 저하되었다.
2. 수정배양액에 taurine 또는 glycine을 첨가하여 수정시 분할율은 각각 82.7% 및 74.0%로서 대조군(80.1%)에 비해 유의적인 차이가 없었으며, 30시간 수정후 분할한 수정란을 체외배양한 결과 taurine 또는 glycine의 첨가 여부에 관계없이 발육률에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다.

참고문헌

Aitken RJ. 1990. Motility parameters and fer-

tility. In: Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects(Gagnon C ed.) CRC press, p. 291.

Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.

Eyestone WH and First NL. 1989. Co-cultures of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.

Eyestone WH, Jones JM and First NL. 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. J. Reprod. Fert., 92:59-64.

Gardner DK, Lane M, Spitzer A and 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.

Gardner DK and Lane M. 1993. Amino acids and ammonium regulate the development of preimplantation mouse embryos in culture. Biol. Reprod., 48:377-385.

Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H and Hyttel P. 1993. *In vitro* production of bovine embryos: a progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. Anim. Reprod. Sci., 33:51-69.

Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ and Kruip ThAM. 1990. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 26:222-226.

Keskintepe L, Burnley CA and Brackett BG. 1995. Production of viable bovine blastoc-

- ysts in defined *in vitro* conditions. 52:1410-1417.
- Kim J-H, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. Biol. Reprod., 48:1320-1325.
- Miller JGO and Schultz GA. 1987. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. Biol. Reprod., 36:125-129.
- Moor K and Bondioli, KR. 1993. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryo. Biol. Reprod., 48:833-840.
- Moor RM and Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert., 49:101-109.
- Ohgoda O, Niwa K, Yuhara M, Takahashi S and Kanoya K. 1987. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. Theriogenology, 29:1375-1381.
- Paria BC and Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci., 87:4756-4760.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C and First NL. 1994. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. Biol. Reprod., 51:1099-1108.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 5:591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL and First NL. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. Theriogenology, 24:537-549.
- Pomeroy KO, Dodds JF and Seidel, GE Jr. 1988. Caffeine promotes *in vitro* fertilization of mouse ova within 15 minutes. J. Exp. Zool., 284:207-212.
- Rappolee DA, Brenner CA, Schultz R, Mark D and Werb Z. 1988. Developmental expression of PDGF, TGF- α , and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos. Science, 241:1823-1825.
- Rehman N, Collins AR and Wright, Jr RW. 1993. Effect of sperm exposure time on *in vitro* fertilization and embryo development of bovine oocytes. Theriogenology, 39:294.
- Rosenkrans, Jr CF, Zeng GQ, Mcnamara GT, Schoff PK and First NL. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. Biol. Reprod., 49:459-462.
- Rousseau J-P and Menezo Y. 1993. Role of the female genital tract in the transport and survival of gametes and the fertilized egg. In: Reproduction in Mammals and Man (Thibault C, Levasseru M-C and Hunter RHF ed.) Ellipses, pp. 369-386.
- Takahashi Y and First NL. 1993. *In vitro* culture of bovine one-cell embryos fertilized *in vitro* using synthetic oviduct fluid medium with and without glucose and supplemented with fetal calf serum. Anim. Reprod. Sci., 31:33-47.
- Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fert., 30:493-497.
- Trounson AO, Pushett D, Maclellan LJ, Lewis I

and Gardner DK. 1994. Current status of IVM /IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology*, 41:57-66.