pISSN 1225-4991, eISSN 2288-0178
J. Emb. Trans. (2016) Vol. 31, No. 3, pp. 221~226
http://dx.doi.org/10.12750/JET.2016.31.3.221

Cysteine 첨가로 배양된 소 수정란의 발달과 동결성 효과

조상래[1,*], 강성식[1,*], 김의형[1], 김시동[1], 이석동[1], 전기준[1], 박창석[2], 양병철[1,†]
[1]농촌진흥청국립축산과학원 [2]예천군농업기술센터

Developmental and survivability according to cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos cultured by addition of Antioxident cysteine

Sang-Rae Cho[1,*], Sung-Sik Kang[1,*], Ui-Hyung Kim[1], Si-dong Kim[1], Seok-Dong Lee[1], Gi-jun Jeon[1], Chang-Seok Park[2] and Byoung-Chul Yang[1,†]
[1]*Hanwoo Research Institute, Pyeongchang, Kangwondo, 232-950, Korea*
[2]*Yecheon Agriculture Technology Center, Yecheon, Gyeongsangbuk-do, 36819, Korea*

ABSTRACT

The aim of the present study was to assess the embryo development and survivability of post-thawed bovine embryos produced *in vitro* by addition of cysteine. The rates of metaphase II formation were not differed significantly among three groups(TCM199 73.8% , TCM199 with 0.3% cysteine 76.9%, TCM199 with 0.5% cysteine 83.8%, respectively). No difference of cleavage rate(70.6~74.6%) was seen among three culture medium(TCM199 70.6%, CR1aa 71.3%, SOF 74.6%) with 0.5M cysteine. however, Significantly(P<0.05) higher development rate into blastocyst stage by 0.5M cysteine addition was obtained in SOF medium(35.6%) than in TCM199(27.6%) or CR1aa(26.6%), however no significant differences in the cleavage rates were among three culture medium. After frozen the blastocysts cultured with 0.5M cysteine, The re-expansion rates were 61.3%~86.4% among groups, and hatching rates were 26.3%~46.9% among groups, the rates of re-expansion and hatching were significantly(P<0.05) higher in SOF medium(86.4% and 46.9%) than those in TCM199(61.3% and 26.3%) and CR1aa medium(87.1 and 44.4%). After thawing, the blastocyst re-expansion rate was significantly(P<0.05) higher in *in vivo* (87.1%) and *in vitro* (70.3%) embryos.

In conclusion, our results demonstrate that supplementation of IVM and IVC medium with 0.5M cysteine improved the quality of in vitro production embryo and post- thawed embryo. Future studies comparing these media systems in well-designed trials should be performed.

(Key word: oocytes, embryo, development, culture, freezing)

서 론

가축의 번식연구를 위해서 다양한 응용 번식 기술을 적용하고 있다. 번식 연구는 가축의 생명 현상에 대한 기초적인 지식뿐만 아니라 산업적 분야로 영역을 확대하여 축산업의 생산성 향상을 위해 관련 응용 기술을 적용하고 있다. 최근에는 생명공학 기술을 바탕으로 인간의 줄기세포 연구에도 포괄적으로 적용하고 있으며, 수정란에 대한 연구가 그 초석이 되고 있다. 수정란에 대한 연구는 인공수정을 기반으로 가축의 개량의 가속화를 위해서 현장에 적용되는 중요한 기술이다. 수정란의 초기배 생성은 그 이후의 발달에 중요한 영향을 미치므로 수정된 난자의 체외발달은 서로 다른 배양조건에 따라서 많은 차이를 보이고 있으며 수정란의 체외생산에 대한 낮은 효율은 여전히 많은 연구를 필요로 하며 아직도 생리학적으로도 완전하지 못한 실정이다(Hashimoto 등, 2012). 이러한 이유는 낮은 배발달율(30~40%)의 증거로 보이며 또한 낮은 동결성과 변형된 유전자 패턴과 낮은 내부세포괴의 비율 그리고 이식가능한 수정란에 대한 낮은 수태율 등을 고려해야 한다(de Loos F 등, 1989; Parrish 등, 1988; Bligh 등, 1959). 수정란의 체외배양 시스템은 현재도 체외배양조건을 개선하기 위해서 노력하고 있으며 여전히 중요한 사항이다. 소 태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS)은 수정란 배양을 위한

* Co-Authors: Sang-Rae Cho, Sung-Sik Kang
† Corresponding author: Byoung-Chul Yang
Tel: +82-33-330-0651
E-mail: bcyang @korea.kr

단백질 공급원으로서 정상적으로 사용되어 왔다그러나 혈청이 첨가된 배양액은 수정란이식 후 거대 송아지의 생산과 미확인된 바이러스와 프리온 같은 병원체를 운반하기도 하며 (Young 등, 1988; Sinclair 등, 2000), 비정상적으로 세포질내에 많은 지방이 축적되어 내동성을 저하시키는 원인으로 보고하였다(Ferguson와 Lee 1999; Abe 등, 2002; Rizos 등 2003; Sudano 등 2011). 활성산소는 세포의 정상적인 발달과정에서 생성되는 물질로서 특히 소 수정란의 체외 성숙 발달과정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 수정란의 체외발달율을 저하시키는 결과를 초래하게 된다 (Trounson 등, 2001). 따라서 본 연구에서는 배양액에 항산화제인cysteine을 첨가하여 수정란의 발달율과 동결 융해 후 생존성에 대한 자료를 수집하고자 연구를 수행하였다

재료 및 방법

체외성숙

체외수정란 생산 실험을 위해서 도축장 유래 난소를 회수하여 실험실로 운반하였다 난소의 수송은 보온병에 0.9% 생리식염수에 항생제를 첨가하였으며, 온도는 25℃로 맞추어 실험실로 2시간 이내로 운반하였다 난포란 회수는 난소에서 직경이 2～6mm의 가시난포에서 19 gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 난포란을 채취하였다 체외성숙을 위해서 TCM199(Sigma, U.S.A)를 기본배양액으로 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, U.S.A), 10μg/ml LH (Sigma, U.S.A) 및 35μg/ml FSH (Sigma, U.S.A)과 항산화제인 0.5mM cysteine(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 5% CO_2 인큐베이터 내에서 22시간 동안 배양을 실시하였다 도축 난포란의 체외성숙 배양 후 핵의 성숙율을 조사를 위해22시간 성숙된 난포란을 이용하였다 체외성숙된 난포란을 3% Na-citrate가 첨가된 Eppendorf 1.5ml 튜브에 넣고 약 2분간 vortexing을 실시하여 난구세포를 완전히 제거하고 Acetic acid 와 Methanol이 3:1의 비율로 희석된 고정액에 난구세포가 제거된 난포란을 넣어 24시간 동안 고정을 실시한 후 Aceto-orcein로 염색을 실시하여 난포란의 핵형을 400x 현미경하에서 GV-GVBD, MI-T1, MII의 3단계로 구분하여 핵성숙율을 조사하였다.

체외수정

체외수정에 사용된 정액은 한우동결정액을(KPN) 이용하였으며, 정자분리는 BO medium을 이용하여 1,800rpm에서 5분 동안 2회 원심분리 수정 배양액인 IVF 100 (IFP, Japan) 에서 1회 원심 분리하여 체외수정을 실시하였다사용된 정액의 최종농도는 2×10^6/ml 이었다. 체외성숙된 난포란의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 0.1% PVA (Polyvinyl Alcohol)가 첨가된 D-PBS 배양액에서 약 10초간 vortexing 후 50μl 미소적에 약 12~15개의 체외성숙된 난포란과 정자를 공동 배양하여 수정을 유도하였다

수정란 체외배양

체외배양에 사용된 수정란은 체외수정 후 체외배양은 synthetic oviductal fluid(SOF)에는 0.5μM sucrose를 첨가하였고 CR1aa 배양액에는 5% FBS를 첨가된 배양액을 사용하였다. 배양액 교환은 배양후 4일째 6일째 2회 신선한 배양액을 추가하여 배양을 실시하였다 수정란 배양조건은 38.5°C 온도에서 5% CO_2, 5% O_2 그리고 90% 질소가 포함된 배양조건에서 수정란을 배양하였다. 수정란 배양은 6-well plate dish(IFP, JAPAN)에서 well 당 50μl 배양액에 20개의 수정된 난자를 넣어서 배양을 실시하였다. 분할율은 체외수정 후 48시간에 확인하였으며, 배반포 수정란 평가는 수정 후 7일과 8일째 생산된 배반포 수정란으로 하였다.

체내수정란 생산

체내수정란 생산을 위해서 한우 공란우의 처리는 발정발현과 무관하게 progesterone releasing intravaginal device인 CIDR (CIDR-plus, InterAg, New Zealand)를 질내에 삽입하고 CIDR 삽입 7일째부터 FSH (Antorin R-10®, Kawasaki, Japan) 28 AU를 감량법으로 12시간 간격으로 4일간 나누어서 근육주사를 실시하였으며, FSH투여량은 5회째에 $PGF_2\alpha$ 제제인 Lutalyse®(Belgium)를 25 mg, 6회째에 15 mg을 근육 주사하였고 CIDR를 제거하였다. 발정발현 징후가 확인된 공란우는 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시하였다, 인공수정 후 7일째 비외과적인 방법으로 체내수정란을 회수하였다

수정란 동결

수정란의 완만동결을 위한 동결 보호제로서는 1.8 M ethylene glycol(EG), 그리고 평형 배양액은 TL-HEPES 배양액에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, U.S.A)을 첨가하여 사용하였다. 수정란 장착은 1.8 M EG에 0.1 M과 0.1 M sucrose가 혼합된 동결보호제에 수정란을 침지시켜 실온에서 약 15 분간 평형을 시킨다. 그리고 0.25 ml 수정란이식용 플라스틱 스트로우내에 수정란을 장착하였다 수정란의 동결은 수정란 자동 동결기(CL 863, U.S.A)를 사용하여 실시하였다. 스트로우를 동결기의 chamber에 넣고 3분간 정치(-7°C, 10분)한 후 seeding을 실시하고, 최종 동결 온도인 -35°C까지 도달하기 위해서 0.3°C/분 속도로 온도를 하강시킨 후 액체질소에

직접 침지 보관 후 수정란 융해 시까지 보관하였다. 보관은 최소 2주간이상 보관을 실시하였다. 완만동결 수정란 융해 후 생존율 확인을 위한 수정란 융해는 스트로우를 보관고에서 꺼내어 공기 중에 약 10초간 노출 시킨 후 37°C로 가온된 온수에서 약 20초간 융해 하여 TL-HEPES 배양액에서 3회 세척한 후 체외배양액으로 옮겨 1회 세척한 다음 융해 직후, 48시간과 72시간 동안 배양을 실시하여 수정란의 재확장 및 부화 여부로 생존성을 판단하였다

통계처리

실험결과의 통계적 분석은 SAS package 방법을 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) 과정 적용으로 각 요인간의 Least squre means를 구하여 유의성 검정($P<0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

Table 1에서는 체외성숙율 조사를 위해서 체외성숙 기본 배양액으로 사용된 TCM 199 배양액에 LH, FSH, E_2, EGF를 첨가한 대조구와 동일한 배양액내에 항산화제인 0.3mM 0.5mM cysteine을 각각 첨가한 그룹으로 나누어 체외성숙율을 조사한 결과이다. 항산화제를 첨가하지 않은 체외성숙용 TCM 배양액에서 22시간 동안 체외성숙이 유도된 후 체외성숙율 조사에서 Germinal vesicle(GV)에서 Geminal Vesical Breakdown(GVBD) 단계는 비율은 9.5%, 제1감수분열 중기(Metaphase I) - 유사분열 말기(Telophase 1) 단계 비율은 16.7%, 그리고 체외성숙이 완료된 제2감수분열 중기(Metaphase II) 단계의 비율은 73.8%의 결과를 보였으며, TCM 199 기본 배양액에 항산화제 0.3mM cysteine 첨가된 배양액의 결과는 GV-GVBD 단계가 11.7%, MI-T1 단계는 11.4% 그리고 MII 단계의 비율은 76.9%의 결과를 보였며, 0.5mM cysteine 첨가된 배양액의 결과는 GV-GVBD 단계가 7.4%, MI-T1 단계는 8.7% 그리고 MII 단계의 비율은 83.3%의 결과를 보였다. Cysteine이 첨가된 두 그룹간의 유의적인 차이는 없었으나, 수정적기 단계인 제2감수분열중기(MII) 비율은 항산화제 cysteine이 0.3mM 첨가된 그룹보다 0.5mM cysteine을 첨가 하였을 때 다소 높은 높은 결과를 보였다. 일반적으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 세포내에서의 미토콘드리아의 호흡과정과 수정란 발달과정 그리고 난구세포의 성숙과정에서 일어나는 정상적인 현상이지만 소 수정란의 체외발생 동안에 ROS 수준이 증가하는 것은 수정란 발달의 저해와 같은 장애를 일으킨다(Martín-Romero 등, 2008).

Table 1. Comparison of meiosis stage according to different antioxidant addition for *in vitro* bovine oocytes maturation

Culture condition	No. of used oocyte	No. of development to (Mean±S.D, %)		
		GV-GVBD	MI-T1	MII
TCM 199	389	37 (7.4±2.1, 9.5)	65 (13±3.0, 16.7)	287 (57±2.5, 73.8)
TCM with 0.3% Cysteine	342	40 (6.7±0.5, 11.7)	39 (6.5±1.0, 11.4)	263 (44±3.9, 76.9)
TCM with 0.5% Cysteine	390	29 (5.8±2.4, 7.4)	34 (6.8±1.3, 8.7)	327 (65±1.9, 83.9)

TCM 199 with LH, FSH, EGF and 5% Fetal Calf Serum

Table 2. Effect of various culture medium for development of IVF embryos with 0.5M cysteine

Culture medium	No. of IVM	No. of IVC	No. of development to (Mean±S.D, %)	
			Cleavage	Blastocyst
TCM 199	196	180	127 (15±1.5, 70.6)[a]	35 (4.4±0.52, 27.6)[a]
CR1aa	188	174	124 (27.6±1.6, 71.3)[a]	33 (4.1±0.8, 26.6)[a]
SOF	190	177	132 (16.5±2.7, 74.6)[a]	47 (5.8±1.1, 35.6)[b]

[a,b] Values with different superscripts in the same column were significantly different($P<0.05$),
Culture condition : TCM 199 with 0.5% Fetal calf serum (0.5M cysteine), CR1aa and SOF with 3mg BSA(0.5M cysteine),
Replicates 8

미토콘드리아의 높은 대사능력은 곧 난자의 질과 관련이 있으며 세포내 ATP 함량과도 관련이 있으며 또한 생리적인 조건 아래서 활성산소 발생의 주된 원인은 미토콘드리아내에서 산화인산화 뿐만 아니라 소 정자와 난자 사이에서 수정능력 그리고 난소의 활성과 접합체의 형성에도 많은 생리학적인 측면이 관여한다고 보고하였다(Berhman 등, 2001, Feugang 등, 2004). 또한, 체외성숙율 향상을 위해서cystein과 cystin(De Matos와 Furnus, 2000) 그리고 cysteamine을 첨가하여 소 난자내의 Glutathion 합성 향상에도 영향을 줌으로써 난자의 성숙율은 결국 배반포 수정란단계까지 영향을 미치기 때문이다(Deleuze와 Goudet, 2010).

Table 2에서는 체외성숙된 난포란을 체외배양 한 후48시간째 분할율과 168시간째 배반포 수정란의 발달율을 조사하였다. 우선 3가지 종류의 배양액에는0.5 mM Cysteine을 각각 첨가하였다. TCM 199 배양액에 5% Fetal bovine serum 을 첨가하고 난구세포와 공동배양을 실시하였으며, CR1aa 배양액에는 3% Bovine Serum Albumin(BSA) 첨가하여 배양하였으며 C-SOF 배양액은 단순배양액으로서3% BSA와 0.5μM sucrose를 수정 후 48시간째와 136시간째 신선배양액으로 교환하여 배양하였다. 대조구로서 TCM199 배양액에 체외수정 후 분할율은 70.6%, CR1aa 배양액에서는 71.3% 그리고 SOF 배양액에서는 74.6%의 결과를 보였으나 배양액간 분할율에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 체외수정 후 7일째 생산된 배반포 수정란의 발달율은 각 배양액별 27.6%와 26.6% 그리고 35.6% 로서 C-SOF 배양액에서 유의적으로 높은 배반포 수정란을 생산하였다. 체외배양에서 중요한 것은BSA 와 마찬가지고 단백질 물질과 아미노산들이 포함되어 있다.그러나 이들 물질이 수정란의 발달에는 긍정적인 효과만 가지는 것은 아니다.수정란의 초기발달에는 중요한 영향을 미치지는 않지만 연구자들은 (Flood와 Shirley, 1991) 체외배양액에서 단백질의 중요한 기능은 수정란에 유해한 물질을chelation을 시켜 수정란의 발달을 촉진한다고 보고하였다. 이러한 단백질로서 배양액에 첨가되는 소 혈청속에는 성장인자들이 존재하여 수정란 형성에 도움을 주기도 한다(Matsuoka 등, 1992). 또한 사용되는 사용되는 체외수정란 생산 시스템을 확립하기 위해서는 항산화제를 첨가하는 연구가 많이 응용되고 있다. 최근의 연구 결과에 따르면 (Rocha-Frigoni 등, 2014) 과산화물의 축적을 막아주기 위해서 catalase를 체외배양시스템에 적용하여 수정란의 대사활동 중에 활성산소 억제와 세포 자가사멸율을 감소시키는 결과를 보고하기도 하였다. 이러한 발견은 체외배양 체계를 개선하기 위해서 세포내에ROS 생산 조절에 초점을 두고 더 많은 연구가 필요하며, 또한 배양액 조성과 에너지 물질의 비율 또한 중요한 사항이다(Baltz, 2012). 본 연구에서 사용된SOF 배양액에는 3mg/ml 의 BSA가 첨가 하였으나 Trounson 등(1994)은 8mg/ml 의 BSA 첨가를 하여 배반포 수정란 생산율이39%로 보고하여 본 연구에서 결과인 35.6%와 유사한 결과를 보였다. 이러한 결과에는 아미노산의 대사산물로 축척되는 암모늄의 축척을 막기 위하여 매 48시간 마다 신선한 배양액으로 교환을 한 것에

Table 3. Re-expansion and hatching rates of frozen-thawed blastocysts by different culture medium

Culture condition	No. of used	No. of survived to (Mean±S.D, %)	
		Re-expansion	hatching
TCM 199	31	19 (1.6±0.5, 61.3)[a]	5 (0.4±1.4, 26.3)[a]
CR1aa	31	27 (2.3±0.6, 87.1)[b]	12 (1.0±0.6, 44.4)[b]
SOF	37	32 (2.7±0.5, 86.4) [b]	47 (1.3±0.6, 46.9)[b]

[a,b] Values with different superscripts in the same column were significantly different($P<0.05$), Replicates 5

Table 4. Survivability of frozen-thawed blastocysts by produced in *vivo* and in *vitro*

Embryo Source	No. of used embryo	No. of survived to (Mean±S.D, %)	
		Re-Expansion	Hatching
In vivo	31	27 (5.4±0.9, 87.1)[a]	12 (2.4±0.6, 44.4)
In vitro	37	26 (5.2±0.4, 70.3)[b]	9 (1.8±0.5, 34.6)

[a,b] Values with different superscripts in the same column were significantly different($P<0.05$), Replicates 5

주목하여야 한다. Table 3에서는 각기 다른 3종류의 배양액에 0.5mM cysteine을 첨가하여 수정후 7일째 생산된 배반포 수정란을 동결 후 융해하여 수정란을 평가한 결과이다. 대조구로서 5% 혈청이 첨가된 TCM 199에서 생산된 배반포 수정란의 동결융해 후 재확장 비율은 61.3%를 보였다. 그리고 CR1aa과 SOF 배양액에서는 87.1%와 86.4%의 결과를 각각 나타내었다. TCM199 배양액에서 생산된 수정란이 CR1aa와 SOF 배양액에서 생산된 수정란 보다 유의적으로($P<0.05$) 낮은 결과를 보였다. 그러나 CR1aa과 SOF 배양액에서 생산된 배반포 수정란의 재확장율은 CR1aa 배양액에서 다소 높은 경향을 보였다. 이러한 결과는 수정란의 부화율에서도 비슷한 결과를 보였다. 동결수정란의 융해후 부화율은 TCM199 배양조건에서 생산된 수정란의 부화율은 26.3%, CR1aa 과 SOF 배양조건에서는 44.4%와 46.9%의 결과를 각각 나타내었는데 부화율에서는 SOF 배양조건이 다소 높은 결과를 보였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 수정란의 생산 효율을 높이기 위해서 체외배양액에 혈청을 첨가하고 난구 세포와 공동배양을 실시하는 배양체계에서는 혈청의 첨가가 수정란에 이중적인 효과를 나타내기도 한다. 그것은 초기 분할 단계의 억제를 시킴과 동시에 상실배와 배반포기배의 발달을 촉진한다고 보고하였으며(Pinyopummintr and Bavister, 1991), 또한 본 연구에서 수정란 동결을 위해서 사용된 동결보제 종류는 1.5M Ethylene glycol 을 사용하였다. Takagi 등(1993)등은 1.8M ethylene glycol에서 융해된 수정란에서 높은 수태율을 보고 하였으나, Volelkel와 Hu(1992)등은 1.5M Ethylene glycol 에서 더 높은 생존율을 보고하였다. Table 4에서는 채내수정란과 체외수정란의 생존율 결과를 비교하였다. 체외수정란은 SOF 배양액에 0.5mM cysteine을 첨가하여 7일째 생산된 수정란과 체내수정란은 과배란처리 방법으로 인공수정 후 7일째 회수된 수정란을 1.5M ethylene glycol 배양액에서 동결 후 융해하였을 때 수정란의 생존성을 조사하였다. 체내수정란에 있어서 동결 융해 후 48시간까지 배양하였을 때 수정란이 재형성을 보인 비율은 87.1%인 반면 체외수정란에 있어서는 70.3%를 보여 체외수정란 보다 유의적으로($P<0.05$) 높게 나타났으나 재확장된 수정란에서 부화된 수정란의 비율은 체내수정란이 44.4% 그리고 체외수정란이 34.6%의 결과를 보였으나 두 그룹간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과와 유사하게 Semple 등(1995)은 동결 융해 후 약 81% 정도가 부화단계까지 발달하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 체외수정란 배양시스템의 안정적인 구축이 이루어지고 있음을 보여주고 있다. 따라서 배양체계의 확립은 수정란 동결 후의 생존성 향상과 더불어 수정란이식을 통한 가축의 개량과 증식에도 많은 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Mol. Reprod. Develop. 61: 57-66.

Berhman HR, Kodaman PH, Preston SL and Gao S. 2001. Oxidative stress on the ovary. J. SOC. Gyenecol. Investing. 8:40-42.

Baitz JM. 2012. Media composition salts and osmolality methods. Mol. Biol. 912:61-80.

Bligh EG and Dyer WJ.1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. J. Biochem. Physiol. 37:911-917.

Deleuze S and Goudet G. 2010. Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. Reprod, Domest. Anim. 45:476-482.

De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P and Kruip TA. 1989. Morphology of Immature bovine oocytes. Gamete Res. 24: 197-204.

De Matos DG and Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione(GSH) levels after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of b-mercaptoethanol, cysteine and cystine. Theriogenology 53:761-842.

Fair T, Hyttel P and Greve T. 1995. Bovine oocytes diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. Mol. Reprod. Develop. 42:437-442.

Feugang JM, De Roover R, Moens A, Léonard S, Dessy F and Donnay I. 2004. Addition of b-Mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidants agents. Theriogenology 63:71-90.

Ferguson EM, and Lee HJ. 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. J. Reprod & Fert. 116:373-378.

Flood LP and Shirley B. 1991. Reproduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. Mol. Reprod. Develop. 30:226-231.

Hashimoto S, Kato N, Saeki K and Morimoto Y. 2012. Selection of highpotential embryo by culture in poly (dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. Fertil. Steril. 97:332-337.

Martín-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera E and Álvarez IS. 2008. Contribution

of culture media to oxidative stress and its effects on human oocytes. Reprod. Biomed. Online 17:652-661.

Matsuoka K, Sakata S, Ichino K, ShiMaya Y and Suzuki T. 1992. Effect of suprovulated cow serum for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. Theriogenology 37:254.

Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Prod. 38:1171-1180.

Pinyopummintr T and Bavister BD. 1991. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/ blastocysts in chemically defined,protein-free culture media. Biol. Reprod. 45:763-742.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP and Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. Biol. Reprod. 68:236-243.

Rocha-Frigoni NAS, Leão BC, Nogueira É, Accorsi MF and Mingoti GZ. 2014. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. Reprod. Fertil. Dev. 26:797-805.

Semple M, Betteridge KJ and Leibo SP.1995. Cryopreservation of in vitro-derived bovine embryos produced in serum-free culture system. Theriogenology 43:320.

Sinclair KD, Young LE, Wilmut I and McEvoy TG. 2000. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. Hum. Reprod. Suppl. 5:68-86.

Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TS, Magalhaes LCO, Crocomo LF and Lima-Neto JF 2011. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. Theriogenology 75:1211-1220.

Takagi M, Boediono A, Saha S and Suzuki T. 1993. Survival rate of Frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. Cryobiology 30:306-312.

Trounson A, Anderiesz C and Jones G. 2001. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 121:51-75.

Voelki SA and Hu YX. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embrys to recipient females. Theriogenelogy 37:23-37.

Young LE, Sinclair KD and Wilmut I. 1988. Large offspring syndrome in cattle and sheep. Reviews of Reproduction 3: 155-163.

Received September 20, 2016, Revised September 26, 2016, Accepted September 30, 2016