

미성숙 돼지 난자의 유리화 동결에 관한 연구:  
Open Pulled Straw(OPS), Electron Microscopic Grid(EMG) 및  
Nylon Loop System(NLS)의 비교

김인덕 · 안미현 · 석호봉<sup>†</sup>  
단국대학교 생명자원과학대학 동물자원과학과

**Study of Vitrification of Immatured Pig Oocytes:  
Compared with Open Pulled Straw(OPS), Electron  
Microscopic Grid(EMG) and Nylon Loop System(NLS)**

I. D. Kim, M. H. Ahn and H. B. Seok<sup>†</sup>

*Department of Animal Science, College of Bio-Life Science, Dankook University*

**SUMMARY**

This study evaluated the efficiency and compared with different materials of loading vessels for vitrification-plastic/glass, copper grid and nylon. The loading method, vitrification, cryopreservation and warming method of the oocytes were examined.

The loading samples prepared in manual or company-made and sterilized, loaded the COCs selected on each samples and cultured for maturation during 40 hours, and then exposed sequentially to ethylene glycol solution. Thawing method was reversely treated and exposed for warmed oocytes. After oocytes were thawed, fertilized and cultured in vitro for 3-4 hours, rates of development and morphological appearance were examined. The results were as summarized:

- OPS from company-made or hand-made of the hematocrit micropipettes, NLS from fishing line and EMG from company-made for EM were used for loading oocytes, respectively.
- The efficiency of freezing method and loading convenience were orderly higher in OPS, NLS and EMG. The optimal capacity per vessel was orderly lowered in NLS, EMG and OPS, respectively.
- After oocytes were warmed, the recovery rate, morphology and rate of development were orderly higher in OPS, NLS and EMG, respectively.
- In conclusion, OPS has the advantages of achieving a little more survival and preserving results than other two loading methods.

(Key words : porcine oocytes, vitrification, open pulled straw, EM grid, nylon loop)

**서 론**

포유동물에 난자에 대한 동결은 Whittingham

(1972)이 마우스의 수정란을 동결 보존하는데 최초로 성공한 이후에 Quinn 등(1986)은 사람, Schellander 등(1994)은 소 그리고 Hotamisligil 등(1996)

본 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : hobong@dankook.ac.kr

은 마우스 난자를 동결 보존하는데 성공을 거두었다. 초기에는 완만 동결에 의해 배아가 동결되어졌는데 이는 많은 시간이 소요되며 독성이 강한 동해 방지제에서의 노출 시간이 길어져 동결 상해를 가져와 그 이용이 제한되었다. 그러나 상해의 원인인 빙결정(ice crystal) 형성을 피할 수 있는 유리화 동결(vitrification)이 Rall과 Fahy(1985)에 의해 보고된 이래로 더욱 많은 연구가 이루어져 왔다. 개발 초기에는 고농도의 동결 보호제가 갖는 세포 독성으로 인하여 그 이용이 일부 연구로 제한되었으나, 1990년대 초부터 가축의 수정란 동결에 이용된 이후 최근에는 오히려 완만 동결방법보다 유리화 동결 방법이 체외에서의 가축 배아 생존율에 더 효율적이라고 보고되었다(Mahmoudzadeh 등, 1994; Pollard와 Leibo, 1994).

이러한 동결 보존은 생쥐, 토끼, 소, 양 등 다른 실험 동물들에서는 많은 연구의 성과와 체계가 확립된 반면 돼지의 경우 그 연구 결과와 성과가 거의 없다. 특히 수정란에 대한 동결보존에 비해 미수정란에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 미수정란의 동결은 암컷의 유전자원을 오랜 기간 보존하는 수단으로 이용될 뿐만 아니라 체외수정, 발생공학 연구에 중요한 재료가 되어진다. 미수정란의 경우 도축돈(slaughter pig)에 의해 대량으로 난자가 공급되어질 수 있으며, 시간에 구애를 받지 않으면서 여러 가지 실험이 가능하므로 그 기술 개선이 요구되어진다(Pieterse 등, 1991). 그러나 돼지 난자의 경우 특히 지방구의 함량이 높아 빙결정의 형성이 용이할 뿐만 아니라 성숙난자 염색체에 부착되어 있는 방추사가 온도의 변화에 민감하여 동결-용해후 염색체 이상이나 이수현상(aneuploidy) 증가 등이 초래될 수 있어(Vander Elst 등, 1988; Pickering 등, 1987) 많은 어려움이 따른다.

동결 보존 후 난자의 생존율에 영향을 미치는 요인으로는 동결-용해 과정 중 사용되는 동해방지제 종류, 농도 및 처리시간과 동결방법 등이 있다. 기존에는 독성이 강한 침투성 동해방지제로서 DMSO, glycerol 그리고 1,2-PROH를 사용하였다. 그러나 최근에는 Marino 등(1996)이 소 성숙난자에 ethylene glycol을 사용한 이후 ethylene glycol

사용의 빈도가 높아졌다. 비침투성 동해방지제로는 egg yolk, serum albumin, dextran, raffinose가 있으나 glucose와 sucrose를 가장 많이 사용하고 있다(Kim 등, 1996; Rayos 등, 1994).

동결방법으로는 최근 경제적이고, 간편한 액화 질소 침지를 기본으로 하는 방법들이 많이 연구되어지고 있는데, Martino 등(1996)은 electron microscopic grid (EMG), Vajta 등 (1997a,b)은 open pulled straw (OPS), Lane 등(1999a,b)은 nylon loop system (NLS)법 등을 이용한 성공적인 유리화 동결이 보고되고 있다. OPS는 1/4cc straw를 열을 가하여 길게 뽑아 내벽을 얇게 함으로써 filling된 난자나 수정란이 액체 질소와 접촉했을 때 유리화가 신속하게 되도록 하는 방법으로 돼지에서는 별로 보고된 것이 없다. EMG는 열전도가 예민한 전자현미경용 copper grid를 이용한 방법으로 최근 국내 기술진의 연구성적을 포함한 몇몇 학자들에 의하여 보고되었고 NLS는 0.5mm직경의 nylon loop를 이용하여 급속 동결한 성적이 보고되었으나, 세가지 모두 돼지 난자에 응용된 것은 없다. 따라서 이와 같은 동결 재료는 사람과 반추류, 생쥐외에 돼지 난자에 대하여는 전혀 시도되지 않았지만 유리화 동결기술에서 가장 중요한 실험으로 생각된다. 성공적인 유리화 동결을 위해서는 수정란이 냉각의 전도성이 빠르고, 작은 용액을 수정란과 같이 loading 해야 하며 모든 동작이 신속 간편해야 하며 용해 방법도 초급속도의 용해가 요구되므로 이에 부합되어야 한다.

따라서 본 연구는 돼지의 난자를 OPS, EMG 그리고 NLS 방법으로 각각 동결-용해하여 난자의 생존성을 규명하고 나아가서 이, 세가지 방법들을 비교 조사함으로써 가장 우수한 방법을 검토하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 미성숙 난포난자의 회수

난소는 도살 직후 돼지에서 회수하여 35~37°C의 생리식염수가 담긴 보온병에 침지하여 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 생리 식염수로 난소 주위의 이물질과 혈액을 세척한 다음 난포액은

18gauge로 장착된 10 ml 주사기로 직경 2~6 mm의 포상 난포들로부터 흡입·회수한 후 15 ml 원심분리관에 분주하여 10분간 정치시켰다. 원심분리관 하단의 침전물을 채취하여 TCM-199(Sigma-Aldrich co., St. Louis, Mo, USA)배양액에서 난포구가 균일한 난포란만을 선택하여 다시 TCM-199으로 3회 세척한 후 체외성숙배양에 이용하였다.

## 2. 난자의 체외성숙

체란된 난자는 형태학적으로 균일하고 세포질이 정상인 것만을 선택하여 체외성숙에 이용하였다. 성숙 배양액은 TCM-199(Sigma-Aldrich Co.)에 pyruvic acid(Sigma chemical. Co., St Louis, Mo, USA), gentamycin (Sigma chemical. Co., St Louis, Mo, USA), L-cystein(SigmaAldrich Co., St. Louis, Mo, USA),  $\beta$ -estradiol(Sigma chemical. Co., St Louis, Mo, USA), FSH 그리고 pFF(pocine follicular fluid)을 첨가하였고, 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 40시간 동안 성숙배양을 실시하였다.

## 3. 동결 재료의 제작

OPS용으로는 OPS straw (Minitub Co., Germany) 또는 hematocrit micropipette을 이용하여 가늘고 길게 뽑아 제작하였고, EMG는 300~400 mesh EM cooper grid (Ted Fella Co., USA)를 사용하였으며 NLS는 시중의 nylon 낚시줄을 cryo-bottle에 특수제작하여 이용하였다.(Fig. 1)

## 4. 동결액과 용해액의 준비

각 동결액과 용해액은 Table 1에서 나타낸 바와 같이 Beebe's method에 준하여 처리하였다.

Table 1. Protocols of vitrification and warming steps

Group	Vitrification solution	Warming solution
Well 1 (VS 1)	DPBS + 10% FBS (1min)	DPBS +10% FBS + 1MEG (2min)
Well 2 (VS 1)	DPBS + 10% FBS (1min)	DPBS +10% FBS + 0.5M EG (2min)
Well 3 (VS 2)	DPBS + 10% FBS +2M EG (5min)	DPBS + 10% FBS (2.5min)
Well 4 (VS 3)	DPBS + 10% FBS +7% PVP (1min)	DPBS + 10% FBS (2.5min)

EG : ethylene glycol, PVP : polyvinyl-pyrrolidone, stage : 39°C.

## 5. 동결과 용해

동결과정은 성숙된 수정란을 100개씩 선발하여 30분 동안 Cytochalasin B(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA)처리를 한 후에 13,000 rpm에서 13분 동안 원심분리하였다. 그리고 각 처리를 한 난포란의 유리화 동결은 DPBS +10% FBS 용액(vitrification solution 1 : VS 1)에 1분간 2회 반복 처리하고 2 M EG 용액(VS 2)에 5분간 침지 후 다시 7% PVP 용액(VS 3)에 1분간 침지하여 각 OPS, EMG 그리고 NLS loading vessel에 난포란을 올려 놓고 LN<sub>2</sub>에 담겨진 비이커에 즉시 침지함으로써 유리화 동결을 완료하였다.

유리화 동결된 난포란들은 LN<sub>2</sub>에서 최소 2주 이상 보관하였으며, 용해는 LN<sub>2</sub>로부터 2 M EG 용해액에 각 난포란을 2분간 침지시키고 다시 0.5 M EG 용해액에 2분간 침지 후 DPBS +10% FBS 용

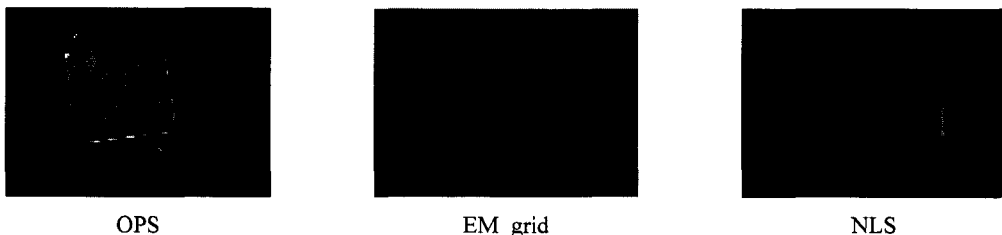


Fig. 1. Materials of loading vessels for vitrification of pig oocytes.

액에 2.5분씩 2회 반복 처리하여 역순으로 평행한 다음 신선한 배양액으로 3~4회 세척을 실시하였다. 이를 maturation 배지에서 3~4시간 배양한 다음 그 각각의 생존율을 비교, 관찰하였다.

### 6. 성숙 난포란의 관찰

동결 용해 후 난자의 회수율과 COCs의 형태학적 생존성 그리고 배발달률은 Cumulus cell의 탈락 정도, 난자의 ICM 형태의 변화와 색깔 변화를 중심으로 판정하였다. 배발달률은 냉동정액으로 체외수정 후 NCSU 23 배지에서 3~4일 배양하여 분열세포 초기까지 관찰하였다.

## 결 과

돼지 미성숙 난포난자를 100개씩 OPS, EMG 그리고 NLS 방법으로 동결-용해함에 있어서의 편의성, 단순성을 검토하기 위하여 각 방법들의 최적 난자 수용 능력과 동결시의 loading 시간 그리고, 용해시의 shedding 시간을 비교하였다. Table 2에

서 나타난 바와 같이 최적 난자 수용능력은 NLS, EMG, OPS순으로 나타났으며, 동결시의 loading 시간은 OPS, NLS, EMG 순으로 빠르게 나타났고, 용해시 shedding 시간은 큰 차이는 없었으나 NLS, OPS, EMG 순으로, 특히 EMG는 동결-용해시 비교적 오랜 시간이 소요됨을 보여주었다. 그리고 이들의 방법으로 loading 되어진 난자의 형태와 공간은 Fig. 2와 같다.

또한 각 loading vessel에 동결 처리한 난자를 용해한 후의 난자 회수율과 회수 후 세포의 COCs의 형태, 형태학적 생존성 그리고 그 발달률을 비교 관찰하였다. Table 3에서 난자의 회수율은 NLS가 100%로 가장 높게 나타났으며 OPS(98%)와 EMG(95%)는 큰 차이가 없었다. COCs의 형태는 OPS(80%), NLS(71%), EMG(56%) 순으로 나타났으며 특히 OPS와 EMG에서 다소 큰 차이를 보였다. 형태학적 생존율은 OPS가 48%로 가장 높게 나타났으며 EMG와 NLS는 비교적 유사하게 나타났다. 난자의 동결-용해 후의 배발달률은 OPS가 8%, NLS가 6%로 나타났으며 EMG는 0%로 매우 낮게

Table 2. Some convenience and loading capacity by different container in porcine oocytes

Container	Treated	Time replicates	Optimal capacity per vessel	Loading time at freezing	Shedding time at warming
OPS	100	10~20	5~10	2~3sec	2~3sec
EMG	100	5~6	15~20	6~8sec	3~5sec
NLS	100	3~4	25~30	4~6sec	1~2sec

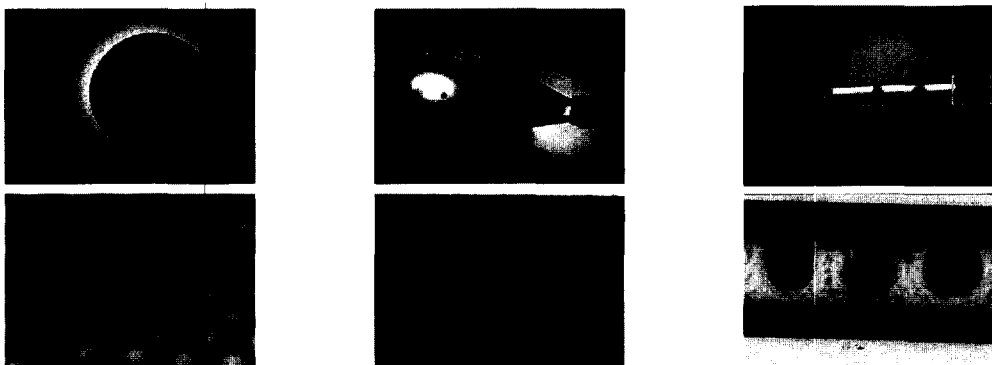


Fig. 2. Different container vessels and pig oocytes.

Table 3. Result of vitrification of pig oocytes loaded on different containers

Container	Treated	Morphological recovery	Normal COCs	Morphological survival	Developed <i>in vitro</i>
OPS	100	98%	80%	48%	8%
EMG	100	95%	56%	22%	0%
NLS	100	100%	71%	25%	6%
Control	100	100%	100%	84%	38%

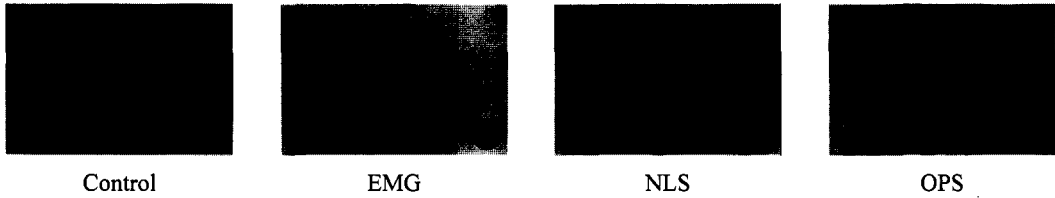


Fig. 3. *In vitro* maturation of immature porcine oocytes treated with three different vitrification method and control after warming.

나타났다. Fig. 3은 각 방법들에 의해 동결-융해된 난자의 체외 성숙한 사진으로 대부분의 Control의 COCs에 비하여 차이를 보였다.

### 고 찰

동결보존은 세포의 기능과 유전적 요인을 변화 없이 반영구적으로 보존하는데 그 목적을 두고 있다. 1990년대 이후 수정란의 동결 보존을 위한 여러 가지 새로운 방법들이 발표되어졌는데 그 사이 유리화 동결법이 개발되면서 동결 보존이 보편화 되어졌다.

본래 돼지의 경우 다른 동물들보다 난자내에 많은 지방 함량(Lipid content)을 포함하고 있어 그 동결에 대한 연구가 지금까지도 매우 어려운 실정이고 그 성과 또한 미흡하였다. Volodimir 등(1998)은 난자내의 지방은 난자 성숙에 있어 에너지원이 되며 후에는 이것이 배아의 세포질막 형성에 있어 매우 중요하지만 동결-융해시에는 이러한 지방이 세포 골격과 상호작용을 하게 되어 결국 배아의 모양을 변형시키고 세포 골격의 분열을 일으킨다고 보고하였다. 그러므로 Volodimir 등은 이

에 대한 보완점으로 Cytochalasin B를 이용하여 유리화를 수행한 결과 그 생존성에 대한 유용한 효과를 입증할 수 있었다고 보고하였다. Nagashima 등(1994)은 체내에서 얻은 배아의 1 세포기와 2~4 세포기를 이용하여 지방 제거 후 4°C로 냉각(chilling) 후 생존율을 살펴 본 결과 무처리한 대조구에서는 생존하는 배아가 없는 반면 지방구를 제거한 구에서는 1 세포기와 2~4 세포기에서 60% 이상의 높은 생존율을 얻었다고 하였다. 또, Nagashima 등(1996)은 원심분리만 한 돼지 배아나 난자도 지방구를 제거한 난자보다는 그 생존율이 낮았지만 유리화 동결을 이용한 동결보존이 가능하다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 위와 같은 연구들을 기초로 하여 난자내 지방구에 대한 보완으로서 난자에 Cytochalasin B를 동결전처리하였으며 이를 다시 원심분리하여 실험을 수행하였다. 이처럼 지방구가 돼지 난포란에 있어서 저온 민감성의 중요한 원인이므로 앞으로도 많은 연구들이 보고될 것으로 사료되어진다. 국내에서는 돼지에 난포란에 있어서 지방구의 제거가 동결에 있어 확실한 성공률이 보장된다고 보고되었지만 (Choi 등, 2003) 이

는 전문적인 기술과 고가의 장비를 필요로하므로 그 광범위한 이용이 어려운 실정이다. 그러므로 앞으로는 좀 더 단순하고 편리한 기술과 저가의 장비로도 수행이 가능한 연구가 요구되어진다.

현재 수정란의 경우 동결과 용해 속도에 대한 연구 관심이 집중되고 있는데 이는 동해 방지제의 노출시간과 관계된 것으로 용해 후 난자의 생존율에 있어 매우 중요하다. 지금까지 잘 알려진 것으로 3가지 방법이 있는데 electron microscopy grid (Park 등, 1999; Martino 등, 1996), Open Pulled straw법(Lewis 등, 1999; Vajta 등, 1997ab)과 Nylon-loop(Lane과 Gardner, 2001; Lane, 1999)등이 개발되었다. Park 등(1999)은 EMG방법에서 *In-vitro* 난자의 동결-용해 후 생존율이 plastic straw 동결법보다 높게 나타난다고 하였는데 이는 열 전도성이 높은 copper grid가 동결-용해로부터 동해를 감소시킬 수 있기 때문이라고 보고되었고, Vajta 등(1998b)은 OPS 방법이 동결과 용해율을 증가시켰으며, 동결 보호제를 낮은 농도로 사용함으로써 독성을 감소시키고 삼투압 손실을 줄이는 것으로 보고했다. 그리고 Lane 등(1999)은 Nylon loop 법을 이용하여 생쥐와 인간의 blastocyst를 성공적으로 동결하였는데 이는 loop의 급속한 동결로 동결동결보호제에 대한 노출 시간을 줄일 수 있어 그들의 세포독성을 감소시켜줄 뿐 아니라 동결시 일정한 열 교환으로 동해를 방지한다고 보고하였다.

본 연구에서는 이와 같은 연구 결과들을 토대로 아직은 시도되지 않은 돼지의 미성숙 난자를 3가지 방법으로 동결-용해하여 그 방법들의 편리성과 단순성 그리고 우수성을 검토하였다. OPS는 그 단순성과 편리성에 있어 다른 두 방법에 비해 비교적 유용함을 보여준 반면 난자 수용 능력에 있어서는 다른 방법들과 비교해 낮게 나타났다. 특히 EMG는 동결-용해에 있어 많은 시간이 소요되었는데 이는 그 만큼의 시간동안 난자가 동해방지제 독성에 노출됨으로 인해 생존율과 발달률이 낮아진 것이 아닌가 생각된다. 각 방법에 따른 동결-용해시의 난자 회수율, COCs의 형태, 형태학적 생존성 그리고 발달률에 의해 평가되어졌는데 OPS, NLS, EMG 순으로 그 성적이 전반적으로 우수하였고, 발달률에 있어서는 OPS가 8%, NLS가 6%로

나타났으며 EMG는 0%로 그 발달이 전혀 관찰되지 않았다. 본 연구에 있어 동결-용해 후 난자의 발달률은 그 기대에 미치지 못하였으나, 연구 결과에 따라 단순성과 편리성이 우수한 OPS가 유리화 동결에 있어서의 몇가지 기술적인 문제들만 해결된다면 매우 효과적인 동결법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 적 요

본 연구는 돼지 난자의 유리화 동결/용해 시 동결 재료인 plastic/glass, copper grid, nylon 이들 각 3가지에 대한 제작 방법, 난자 loading법, 동결 처리법, 보관 방법 그리고 용해 방법 등을 비교 조사하여 가장 우수하고 편리한 방법을 선택하기 위해 수행되었다. 수행 내용은 3가지의 재료의 sample을 제작하고 소독한 다음 준비된 돼지 COCs를 40시간 동안 체외 성숙시킨 후 난자를 선별하여 준비된 동결 용액에 평형 처리하였다. 각 재료의 용기에 난자를 loading 한 후 동결/보관 하였고, 용해는 다시 역순으로 평형처리하여 체외 성숙 배양액에 3~4시간 배양한 다음 경검하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 각 재료는 OPS용으로 OPS straw(Minitub Co., Germany) 또는 hematocrit micropipette으로 제작하였고, cryo-loop용은 시중의 nylon 낚시줄을 cryo-bottle에 특수제작하였으며, EMG는 300~400 mesh EMG(Ted Fella Co., USA)를 사용하였다.
- 동결 방법과 loading의 편의성은 OPS, NLS, EMG 순으로 나타났으며 액체 질소 내 동결 보관의 수용성은 NLS, EMG, OPS 순으로 많은 난자를 loading할 수 있었다.
- 난자를 용해한 후 난자 회수율, 회수 후 세포 형태 그리고 발달률은 OPS, NLS, EMG 순으로 높았다.

## 참고문헌

- Beebe FS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Higgins A and Nottle MB. 2002. Piglets born from

- vitrified zona-intact blastocysts, *Theriogenology*, 57:2155-2165.
- Choi IK, Lee SJ and Song HB. 2003. Study on the vitrification of porcine GV and MII oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. *Korean J. Embryo Transfer*, 17:1-14.
- Hotamisligil S, Toner M and Power R. 1996. Change in membrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod.*, 55:161-168.
- Kim MK, Lee SJ, Uhm EY, Yoon SH, Park SP, Chung KS and Lim JH. 1996. Cryopreservation of mouse IVF zygotes by vitrification. *Korean J. Animal Reprod.*, 20:119-126.
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA and Forest KT. 1999a. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat. Biotechnol.*, 17:1234-1236.
- Lane M, Schoolcraft WB and Gardner DK. 1999b. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique, *Fertil Steril.* 72:1073-1078.
- Lane M and Gardner DK. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol. Reprod. Dev.*, 58:342-347.
- Lewis IM, Lane MW and Vajta G. 1999. Pregnancy rate following transfer of *in vitro* produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw(OPS) method. *Theriogenology*, 51:168(Abstr.).
- Mahmoudzadeh AR, van Soom A, Ysebaert MT and De Kruif A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 42:1389-1397.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54:1059-1069.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF and Nottle MB. 1994. Removal of cryoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.*, 51:618-622.
- Nagashima H, Kuwayama M, Grupen CG, Ashman RJ and Nottle MB. 1996. Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. *Theriogenology*, 45(1):180.
- Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS and Lim JH. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Human Reprod.*, 14:2838-2843.
- Pickering SJ and Johnson HM. 1987. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reprod.*, 2:207-216.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, van Benden ThA, Willemse AH and Taverne MAM. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocyte. *Theriogenology*, 53:19-24.
- Pollard JM and Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41:101-106.
- Quinn P, Kerin J, Stone B and Wilson L. 1986. Successful cryopreservation of human oocytes. In: 42nd Ann Mtg Am Fertil Soc and 18th Ann Mtg Canadian Fertil Androl Soc Abstr, 72 (Abst).
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Rayos AA, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J. Reprod. Fertil.*, 100:123-129.
- Schellander K, Peli J, Schmoll F and Brem G. 1994. Effects of cryopreservation and carbo-

- hydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. *Theriogenology*, 23:909-915.
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw(OPS) method. *Cryo-Letters*, 18:191-195.
- Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997b. Vitrification of porcine embryos using open pulled straw method. *Acta. Vet. Scand.*, 38: 349-352.
- Vajta G, Lewis IM, Kuwayama M, Greve T and Callesen H. 1998b. Sterile application of the open pulled straw(OPS) vitrification method. *Cryo-Letters*, 19:389-392.
- Van der Elst J, Vanden Abbeel ER, Jacobs E and Van Steirtghem A. 1988. Effect of 1,2-propaneol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reprod.*, 3:960-967.
- Volodmir I, Carles S, Eugenia I, Francisco PS and Valentin G. 1998. Vitrification of immature porcine oocyte: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology*, 36:250-253.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science*, 178:411-414.
- 

(접수일: 2003. 12. 1/ 채택일: 2004. 1. 12)