

동결융해 소 난포란의 체외발생에 관한 연구

윤종택 · 이호준 · 한기영

국립안성산업대학교 동물생명자원학과

***In Vitro* Fertilization and Development of Frozen-thawed Bovine Follicular Oocytes**

J.T. Yoon, H.J. Lee and K.Y. Han

Department of Animal Life Resources, Ansung National University

SUMMARY

Immature oocytes and *in vitro* matured oocytes collected from the slaughtered Korean cattle were frozen slowly with 10% ethylene glycol+5% polyvinyl pyrrolidone+0.05M trehalose (10EPT), 10% ethylene glycol+5% ficoll+0.05M sucrose (10EFS), or 10% ethylene glycol+5% ficoll+0.05M trehalose (10EFT) by cell freezer (experiment 1). And also, They were ultra-rapidly frozen with 30% ethylene glycol+10% polyvinyl pyrrolidone+0.5M trehalose (30EPT) or 30% ethylene glycol+18% ficoll+0.5M sucrose (30EFS) using electron microscope grid (experiment 2). In experiment 1, the cleavage rate was 23.0% when immature oocytes were frozen slowly using various cryoprotectants described above, and 5.1% of cleaved oocytes developed to over morula stage after *in vitro* fertilization (IVF). There were no significant differences among these groups. When matured oocytes were frozen slowly, the total cleavage rate was 19.7%, and over morula stage was 3.2%. 10EPT (4.8%) and EFS (4.4%) were slightly more effective than 10EFT (0.0%) for development *in vitro*. Only in 10EFT treated group, immature oocytes have higher developmental capacity than matured ones, when they were frozen slowly and IVF after thawing. In experiment 2, oocytes were ultra-rapidly frozen using the electron microscope grid with two kind of cryoprotectants described above. In immature oocyte group, the cleavage rate was 13.9% and 5.8% of cleaved oocytes developed to over morula stage after IVF, and in matured group, 25.7 and 7.6%, respectively. There were no significant differences between two kind of cryoprotectants, but in ultra-rapid freezing using electron microscope grid, the efficiency is slightly higher in matured oocyte group.

(Key words: immature oocyte, freezing, cryoprotectant, *in vitro* fertilization, bovine)

서 론

가축에서의 난자동결은 소(Schellender 등, 1988; Otoi 등, 1992, 1993; Lim 등, 1991), 돼지

(Didion 등, 1990; Rubinsky 등, 1991), 토끼(Al-Hasani 등, 1989) 등의 동물에서 보고되어 있으며 Fuku 등(1992)은 소 미성숙난자의 동결융해 후 쌍태생산을 보고하였다. 난포란의 동결과정 또한 일관적인 수정란의 동결법과 같이 동결보호제의 처리

이 논문은 1996년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

및 동결융해 후 동결보호제를 제거하는 일련의 과정을 기본적으로 실시하고 있으나 수정란 동결의 경우보다 동결에 더 민감하여 세포질, 방추사, 난황막, 투명대 및 표층과립의 손상으로 융해 후 배발육률은 아직도 매우 낮은 수준이다(Glenister, 1987; Parks와 Ruffing, 1992).

난포란의 동결은 성숙난자(Lim 등, 1991) 또는 미성숙난자(Suzuky와 Nishikata, 1992; Van Blerkom, 1989)에서 수행되고 있으나 연구자마다 서로 다르게 보고하고 있다. Rall과 Fahy(1985) 및 Rebecca와 Parks(1994)는 성숙난자를 동결할 때 동결보호제에 노출되고 냉각되는 동안 metaphase 단계에서 방추사와 표층과립의 손상을 보고하였고 Van Blerkom(1989)은 미성숙난자를 동결할 때 비정상적으로 성장체가 형성되어 방추사의 수가 감소된다고 보고하였다. Mauzer (1970)는 동결과정 중에서 세포가 죽는 주된 요인으로 세포내 빙정 형성을 들었으며 빙정 형성을 줄일 수 있는 적절한 평형시간이 필요하다고 주장하였다. Willadsen 등(1976)은 삼투압의 영향과 독성을 줄이기 위하여 동결보호제의 단계적 첨가와 회석방법을 이용해야 한다고 하였으며 Taha와 Schellander(1992)는 소 난자동결시 미성숙난자가 체외성숙난자보다 평형시간이 짧아야 한다고 보고하였다. 한편 Martino 등(1996)은 전자현미경에 부착되는 grid를 이용한 초급속 동결법을 개발하여 효율적인 난자의 동결을 보고하였다.

이에 본 연구는 소 난포란을 미성숙난자와 성숙난자로 구분하고 세포동결기를 이용한 완만동결법과 전자현미경에 사용되는 grid를 이용한 초급속 동결법을 이용, 동해방지제 및 당류에 따른 동결융해능을 체외발생을 통하여 확인하여 효과적인 소 난포란의 장기보존 및 이를 통한 체외수정란의 생산가능성을 알아보고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 난포란 채취

도축장의 한우 암소에서 채취한 난소를 33~35°C 보온병에 담아 2시간 이내에 실험실로 운반한 후 20 gauge 주사침이 부착된 10cc 주사기를 이용하여 직

경 2~6mm의 난포로부터 난포액과 함께 난자를 흡입, 채취하였으며, 시험관에 10분간 정치한 후 상층액을 제거하고, 세정용 배양액 4~5ml를 분주, 회석한 후 난구세포가 3~5층 이상 치밀하게 부착된, 세포질이 양호한 난자만을 선별하여 실험에 공여하였다.

2. 배양액 제조

체외성숙 및 배 발생용 배양액은 TCM199을 기본배양액으로 5 μ g/ml의 FSH, 10 I.U/ml의 HCG, 1 μ g/ml의 Estradiol-17 β 를 첨가하였으며 10% 소태아혈청(fetal calf serum; FBS)을 첨가하였다. 체외수정용 배양액은 BO 배양액(Bracktt와 Oliphant, 1975)에 10mM 및 5mM caffeine을 각각 첨가한 후, 5mM의 caffeine이 첨가된 배양액에 10 μ g/ml의 heparin과 0.5% bovine serum albumin을 첨가시켰다. 배양액은 12시간 이상 5% CO₂, 95% 공기 및 포화습도인 39°C CO₂ 배양기에서 전배양한 후 사용하였다.

3. 체외성숙 및 체외수정

난포란의 체외성숙은 10mm이상의 대란포로부터 회수한 과립막세포를 1 \times 10⁶cells/ml가 되도록 조정하여 4-well dish에 0.5ml씩 분주한 후 각 well 당 15~20개의 난포란을 분주하여 22~24시간 동안 공배양을 실시하였다. 체외수정은 한우동결정액을 38°C 온수에 급속융해하여 10mM caffeine이 함유된 BO액으로 2회, 5mM caffeine과 10 μ g/ml의 heparin이 첨가된 BO배양액으로 1회 세정한 후 1 \times 10⁶cells/ml가 되도록 조정, 200 μ l의 소적을 만들었으며, 15~20개의 성숙난자를 소적에 넣어 18시간 동안 체외수정을 실시하였다.

4. 수정란의 체외배양

수정이 완료된 수정란을 TCM-199으로 3회 이상 세정하여 1 \times 10⁶cells/ml로 조정된 난관 상피세포와 공배양을 실시, 배양 8일째에 배발육률을 조사하였다. 난관 상피세포는 도축된 암소로부터 채취하였으며, 난관관류법으로 상피세포를 회수, 배양에 이용하였다.

5. 실험 I

미성숙난자와 성숙난자로 구분, 다음 3가지의 동결보존액으로 동결을 실시하였다. 선별된 난포란은 10% ethylene glycol+5% polyvinyl pyrrolidone+0.05M trehalose (10EPT), 10% ethylene glycol+5% ficoll+0.05M sucrose (10EFS) 또는 10% ethylene glycol+5% ficoll+0.05M trehalose (10EFT) 동결보존액에 5분 동안 20~25℃에 정치하여 pograming freezer (England, planer)에서 동결을 실시하였다. Fig. 1과 같이 난포란은 0℃에서 동결을 시작하여 -6℃까지 1℃/min속도로 냉각되었으며, -6℃에서 식빙하여 빙결정 형성을 최소화하였다. -6℃에서 10분간 평형을 유지한 후 -35℃까지는 0.3℃/min의 속도로 동결하였으며 이후 LN₂ 탱크에 침지, 보관하였다. 동결보존된 난자는 공기 중에서 5초간 정치한 다음 37℃ 항온수조에 10~20초 동안 용해하고 발생배양액에 10분간 침지하여 동결보존액을 제거하였다. 용해 후 미성숙난자는 과립막세포와 22~24시간 동안 공배양시켜 체외성숙을 유도한 후 체외수정을 하였으며, 성숙난자는 과립막세포와 2시간 동안 공배양한 후 체외수정하였다.

6. 실험 II

미성숙난자와 성숙난자로 구분, 다음 두가지 동결보존액으로 동결을 실시하였다. 동결보존액은 D-PBS용액에 30% ethylene glycol+18% Ficoll

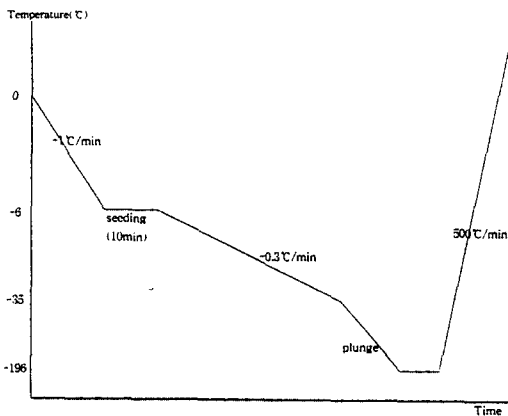


Fig. 1. Freezing procedure by slow freezing method.

+0.5M sucrose (30EFS), 또는 30% ethylene glycol+10% polyvinyl pyrrolidone+0.5M trehalose (30EPT)에 10% FBS가 첨가하여 실험에 공여하였다. 난자를 동결보존액에 수초간 침지한 후 electron microscope grid 위에 Fig. 2와 같이 1μl의 배양액에 흡인된 10~15개의 난자를 올려놓은 후 LN₂에 직접 침지하여 초급속동결을 실시하였다. 동결보존액에 침지 후 LN₂에 저장하기까지의 소요시간은 30초 이내로 제한하였다. 또한 동결보존액의 삼투압 및 독성으로 인한 난자의 손상 여부를 알아보기 위하여 난자를 동결보존액에 30초동안 침지시킨 후 0.5M, 0.25M, 0.125M의 sucrose용액에 1분씩, 발생배양액에 5분간 침지하여 난자내 동결보존액을 제거한 후 체외수정에 공여하였다. 30EFS 용액으로 동결된 난자는 0.5M, 0.25M, 0.125M의 sucrose에 1분씩 침지하고 발생배양액에 5분간 침지함으로 동결보존액을 제거하여 용해하였으며 30EPT 용액에 동결된 난자는 0.5M trehalose에 5초간 용해한 후 0.5M, 0.25M, 0.125M의 trehalose에 1분간 침지하고 발생배양액에 5분간 침지함으로써 동결보존액을 제거하여 용해하였다. 용해된 난자는 실험 1과 동일한 방법으로 체외수정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 완만동결법에 의한 소 미성숙난자의 체외발생을

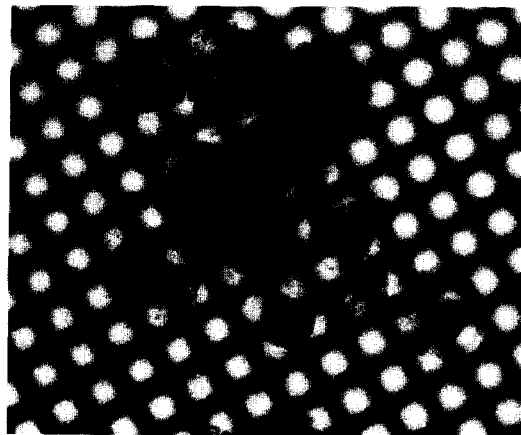


Fig. 2. Photograph of the oocytes on electron microscope grid used for freezing.

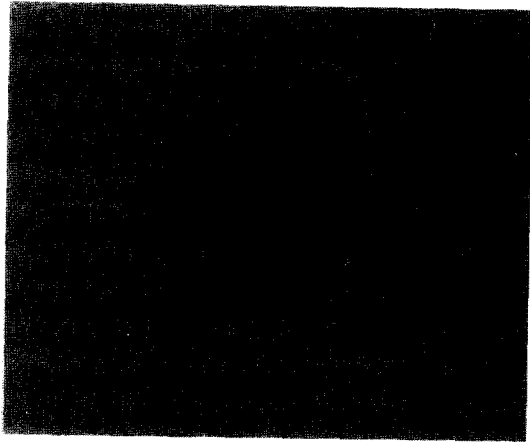


Fig. 3. A morula stage embryo after freezing, thawing and *in vitro* fertilization.

미성숙난자를 동결보존액의 종류별로 cell freezer를 이용, 완만동결, 융해 및 체외수정을 실시한 후의 발생률은 Table 1과 같다. 10EPT 동결보존액에서 동결하였을 때 18.8%의 분할율을 나타내었으며 상실배 이상, 후기배로의 배발육률은 4.5%였다. 10EFT 처리군에서는 30.4%의 분할률 및 5.6%의

후기배로의 발육률을 보였다. 10EFS 처리군에서는 각각 22.7% 및 5.2%를 나타내었다. 완만동결에 의한 총 분할율은 23.0%였고 후기배로의 발육률은 5.1%였다.

동결보존액에 따른 동결융해능은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 전체적으로 Schellander 등 (1988)의 미성숙 난자의 동결융해 후 생존율이 88.9%라고 보고한 결과보다 낮은 수준이었다.

2. 완만동결에 의한 체외성숙난자의 체외발생률

체외성숙난자를 동결보존액 별로 cell freezer를 이용하여 완만동결하였을 때의 체외발생률은 Table 2와 같다. 10EPT 동결보존액에서 완만동결한 성숙난자의 체외발육률은 19.0%였고 상실배 이상, 후기배로의 발육률은 4.8%였다. 10EFS 처리군의 분할률은 27.2%였고 후기배로의 발육률은 4.4%였다. 10EFT 처리군의 분할률은 11.1%였으나 후기배로 발육한 수정란은 없었다. 성숙난자의 완만동결 및 융해 후 총 분할률은 19.7%였으며 후기배로의 발육률은 3.2%였다.

동결보존액에 따른 체외성숙난자의 분할률 및 후

Table 1. Developmental capacity of frozen-thawed bovine immature oocytes by slow freezing

Treatment*	No. of oocytes	No. of oocytes cleaved (%)	No. of oocytes developed to morulae & blastocysts
10EPT	176	33(18.8)	8(4.5)
10EFT	125	38(30.4)	7(5.6)
10EFS	194	43(22.7)	10(5.2)
Total	495	114(23.0)	25(5.1)

*10EPT: 10% ethylene glycol+5% polyvinyl pyrrolidone+0.05M trehalose, 10EFT: 10% ethylene glycol+5% ficoll+0.05M trehalose, 10EFS: 10% ethylene glycol+5% ficoll+0.05M sucrose.

Table 2. Developmental capacity of frozen-thawed bovine matured oocytes by slow freezing

Treatment*	No. of oocytes	No. of oocytes cleaved (%)	No. of oocytes developed to morulae & blastocysts
10EPT	105	20(19.0)	5(4.8)
10EFT	90	10(11.1)	0(0.0)
10EFS	114	31(27.2)	5(4.4)
Total	309	61(19.7)	10(3.2)

*10EPT: 10% ethylene glycol+5% polyvinyl pyrrolidone+0.05M trehalose, 10EFT: 10% ethylene glycol+5% ficoll+0.05M trehalose, 10EFS: 10% ethylene glycol+5% ficoll+0.05M sucrose.

기배로의 발육률은 10EPT 및 10EFS 처리군이 10 EFT 처리군에서보다 다소 높게 나타났으나 10 EPT 처리군과 10EFS 처리군은 유사한 결과를 나타내었다.

Cell freezer를 이용하여 완만동결하였을 때 난포란의 발생률은 동결보존액의 종류에 관계없이 미성숙난자가 성숙난자에 비하여 다소 높게 나타났으며 이는 완만동결시 metaphase I 기 이후의 난자가 우수한 동결능을 보인다는 Lim 등(1991)의 보고와 상이한 결과로 본 실험에 이용한 동결보존액을 이용한 성숙단계별 동결능 실험 등 추가적인 연구가 요구되었다.

3. 초급속동결에 의한 소 미성숙난자의 체외발생률

미성숙난자를 동결보존액 별로 electron microscope grid 위에 Fig. 1과 같이 정치하여 직접 액체 질소에 침지하는 초급속동결에 의한 체외발생률은 Table 3과 같다. 동결보존에 앞서 동결보존액 자체

가 난자세포에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 동결보존액에 30초간 노출한 후 체외수정을 실시한 경우 30EPT 처리군의 분할률은 65.4%였고 후기배로의 발육률은 5.8%였으며 30EFS 처리군의 경우 각각 62.5% 및 5.3%였다. 30EPT 처리군의 초급속동결융해 후 분할률은 13.5%였으며 후기배로의 발육률은 0.8%였다. 30EFS 처리군의 경우 각각 14.2% 및 0.8%였다. 총 분할률은 13.9%였으며 후기배로의 발육률은 0.8%였다.

4. 초급속동결에 의한 성숙난자의 체외발생률

성숙난자를 동결보존액 별로 electron microscope grid 방법으로 초급속동결융해한 후의 체외발생률은 Table 4와 같다. 30EPT 동결보존액에 30초간 노출한 후 체외수정을 실시한 경우 처리군의 분할률은 77.6%였고 후기배로의 발육률은 8.2%였으며 30EFS 처리군의 경우 각각 78.0% 및 3.7%였다. 30EPT 처리군의 초급속동결융해 후 분할률은 28.8%였으며 후기배로의 발육률은 1.9%였다. 30EFS

Table 3. Developmental capacity of frozen-thawed bovine immature oocytes by ultra-rapid freezing

Treatment*		No. of oocytes	No. of oocytes cleaved (%)	No. of oocytes developed to morulae & blastocysts
30EPT	Exposed	52	34(65.4)	3(5.8)
	Freezing	243	33(13.5)	2(0.8)
30EFS	Exposed	56	35(62.5)	3(5.3)
	Freezing	253	36(14.2)	2(0.8)
Total (freezing)		496	69(13.9)	4(0.8)

*30EPT: 30% ethylene glycol+10% polyvinyl pyrrolidone+0.5M trehalose, 30EFS: 30% ethylene glycol+18% ficoll+0.5M sucrose.

Table 4. Developmental capacity of frozen-thawed bovine matured oocytes by ultra-rapid freezing

Treatment*		No. of oocytes	No. of oocytes cleaved (%)	No. of oocytes developed to morulae & blastocysts
30EPT	Exposed	98	76(77.6)	8(8.2)
	Freezing	160	46(28.8)	3(1.9)
30EFS	Exposed	82	64(78.0)	3(3.7)
	Freezing	143	32(22.4)	2(1.4)
Total (freezing)		303	78(25.7)	5(1.7)

*30EPT: 30% ethylene glycol+10% polyvinyl pyrrolidone+0.5M trehalose, 30EFS: 30% ethylene glycol+18% ficoll+0.5M sucrose.

처리군의 경우 각각 22.4% 및 1.4%였다. 총 분할률은 25.7%였으며 후기배로의 발육률은 1.7%였다.

Electron microscope grid를 이용하여 소 난자를 30EPT 및 30EFS 동결보존액으로 동결할 경우 미성숙난자보다 체외성숙난자의 동결능이 더 양호한 것으로 나타났다. 이는 본 실험과 동일한 조건으로 수행한 연구는 아니나 성숙난자의 초급속동결용해 후 10~15%의 배반포 발생율을 보고한 Martino 등(1996)의 보고에는 미치지 못하는 결과였다. 이러한 차이는 난자의 질, 동결보존액의 종류의 차이 등에 기인한 것으로 추측된다.

본 연구를 통하여 소 난포란은 성숙, 미성숙에 관계없이 동결보존이 가능한 것으로 나타났다. 또한 고가의 동결기를 사용하지 않는 초급속동결도 가능함을 보였다. 그러나 그 효율은 수정란의 동결에 비하여 극히 낮은 수준에 머물러 있어 동결시 세포의 성상변화 및 난자의 동해방지에 관한 지속적인 후속연구가 수행되어야 할 것으로 사료되었다.

적 요

도축된 소의 난소에서 채취한 난포란을 미성숙난자와 체외성숙난자로 구분하여 10EPT, 10EFT 및 10EFS 동결보존액을 이용, cell freezer를 이용한 완만동결을 실시하고 30EPT와 30EFS 동결보존액을 이용, electron microscope grid를 이용한 초급속동결 및 용해 후의 체외발생률은 다음과 같다.

1. 미성숙난자를 동결보존액 종류별로 cell freezer를 이용, 완만동결, 용해 및 체외수정을 실시한 후의 분할 및 후기배로의 발육률은 10EPT 동결보존액에서 동결하였을 때 각각 18.8% 및 4.5%였으며 10EFT 처리군에서는 각각 30.4% 및 5.6%였다. 10EFS 처리군에서는 각각 22.7% 및 5.2%를 나타내었으며 완만동결에 의한 세 군 모두의 총 분할 및 발육률은 각각 23.0% 및 5.1%를 나타내었다.
2. 체외성숙난자를 동결보존액 별로 cell freezer를 이용하여 완만동결, 용해 및 체외수정을 실시한 후의 분할 및 후기배로의 발육률은 10EPT 동결보존액에서 동결하였을 때 각각 19.0% 및 4.8%였으며 10EFS 처리군에서는 각각

27.2% 및 4.4%였다. 10EFT 처리군에서의 분할률은 11.1%였으나 후기배로 발육한 수정란은 없었다. 성숙난자의 완만동결 및 용해 후 총 분할률은 19.7%였으며 후기배로의 발육률은 3.2%였다.

3. 동결보존액에 따른 체외성숙난자의 분할률 및 후기배로의 발육률은 10EPT 및 10EFS 처리군이 10EFT 처리군에서보다 다소 높게 나타났으나 10EPT 처리군과 10EFS 처리군은 유사한 결과를 나타내었다.
4. 초급속동결보존에 앞서 동결보존액 자체가 미성숙난자에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 동결보존액에 30초간 노출한 후 체외수정을 실시한 결과 30EPT 처리군의 분할률은 65.4%였고 후기배로의 발육률은 5.8%였으며 30EFS 처리군의 경우 각각 62.5% 및 5.3%였다.
5. 미성숙난자를 30EPT 동결보존액으로 처리하고 electron microscope grid에 의한 초급속동결용해 및 체외수정을 실시한 후의 분할률은 13.5%였으며 후기배로의 발육률은 0.8%였다. 30EFS 처리군의 경우 각각 14.2% 및 0.8%였다. 총 분할률은 13.9%였으며 후기배로의 발육률은 0.8%였다.
6. 초급속동결보존을 위한 동결보존액이 성숙난자에 미치는 영향을 조사하기 위하여 난자를 동결보존액에 30초간 노출한 후 체외수정을 실시한 경우 30EPT 처리군의 분할률은 77.6%였고 후기배로의 발육률은 8.2%였으며 30EFS 처리군의 경우 각각 78.0% 및 3.7%였다.
7. 성숙난자를 30EPT 동결보존액으로 처리하고 electron microscope grid에 의한 초급속동결용해 및 체외수정을 실시한 후의 분할률은 28.8%였으며 후기배로의 발육률은 1.9%였다. 30EFS 처리군의 경우 각각 22.4% 및 1.4%였다. 총 분할률은 25.7%였으며 후기배로의 발육률은 1.7%였다.
8. 소 난자를 30EPT 및 30EFS 동결보존액을 이용하여 electron microscope grid를 이용하여 동결할 경우 미성숙난자보다 체외성숙난자의 동결능이 상대적으로 양호한 것으로 나타났다.

참고문헌

- Al-Hasani S, Kirsch J, Diedrich K, Blanke S, VanDerVen H and Krebs D. 1989. Successful embryo transfer of cryopreserved and *in-vitro* fertilized rabbit oocytes. Hum. Reprod. 4:77-79.
- Didion BA, Pomp B, Martin MJ, Homanics GE. 1990. Observation on the germinal vesicle stage. J. Anim. Sci. 68:2803-2810.
- Fuku E, Kojima T, Shijoiya Y, Marcus J and Downey B. 1992. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. Cryobiol. 29:485-492.
- Glenister PH. 1987. Incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. Gamete Res. 16:205-216.
- Lim JM, Fukui Y and Ono H. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. Theriogenology, 35:1225-1235.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod., 54:1059-1069.
- Mauzer P. 1970. The freezing of biological systems. Cryobiol., 168:939-949.
- Otoi T, Tachikawa S, Kondo S and Suzuki T. 1992. Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation *in vitro* and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen matured oocytes. Theriogenology, 38:711-719.
- Otoi T, Ogura T, Tachikawa S, Kitamura S and Suzuki T. 1993. Deep freezing of bovine oocytes using different cryoprotectants. Theriogenology, 39:275(abstr).
- Parks JE and Ruffing NA. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. Theriogenology, 37:59-73.
- Rall W and Fahy G. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature, 313:573-575.
- Rebecca RA and Parks JE. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *In vitro* matured bovine oocytes. Biol. Reprod., 50:103-110.
- Rubinsky B, Arav A and Devries AL. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. Cryo-letters, 12:93-106.
- Schellander K, Brackett BG, Fuhrer F and Schleger W. 1988. *In vitro* fertilization of frozen-thawed cattle oocytes. Proc. 11th. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem. June Dublin, Ireland, Vol. I. p349(abstr).
- Suzuki T and Nishikata U. 1992. Fertilization and cleavage of frozen-thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. Theriogenology, 37:306(abstr).
- Taha TA and Schellander K. 1992. Developmental capacity of immature and *in vitro* matured bovine oocytes after exposure to vitrification solution. Theriogenology, 37:307(abstr).
- Van Blerkom J. 1990. Maturation at high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocytes in mice. Theriogenology, 33:365(abstr).
- Willadsen SM, Trounson AO, Polge C, Rowson LEA and Newcomb R. 1976. Low temperature preservation of eggs. In: Egg transfer in cattle, Rowson LEA ed., Commission of the European Community Publications, Luxembourg, pp117-124.

(접수일자 : 1998. 7. 15 / 채택일자 : 1998. 8. 20)