

Vitrification법에 의한 돼지 난자의 동결-용해 후 생존능력에 있어서 동해보호제와 Superoxide Dismutase의 영향

김미성 · 김세웅 · 정희태 · 이상영¹ · 양부근 · 김정익 · 박춘근[†]
강원대학교 동물자원과학대학

Effect of Superoxide Dismutase and Cryoprotectants on Viability of Frozen-thawed Porcine Oocytes by Vitrification Method

M. S. Kim, S. W. Kim, H. T. Cheong, S. Y. Lee¹, B. K. Yang,
C. I. Kim and C. K. Park[†]

College of Animal Resources Sciences, Kangwon National University

SUMMARY

This study was performed to investigate the effect of different cryoprotectants and superoxide dismutase(SOD) on viability of frozen-thawed oocytes by vitrification method in the pig. The proportions of oocytes matured to metaphase-I stage were higher in medium with ethylene glycol and DMSO(19.9%) than in medium with glycerol and DMSO(6.5%). When the oocytes were exposed in medium containing ethylene glycol, oocyte matured to prophase-I were not observed.

On the other hand, significant differences were not observed between in medium with and without SOD(1 unit/ml) during IVM of vitrified and thawed immature oocytes. However, the maturation rate from metaphase-I to metaphase-II were higher in medium with that than without SOD. The penetration rates after IVF of oocytes frozen-thawed were also higher in medium with that than without SOD.

These results indicate that frozen-thawed oocytes treated with ethylene glycol and DMSO was more protective against freezing effect and that addition of 1 unit/ml SOD in medium for prevent of lipid peroxidation may play a positive role in improving of viability of frozen-thawed oocytes.

(Key words : superoxide dismutase, ethylene glycol, DMSO, glycerol, frozen-thawed porcine oocytes)

서 론

최근 수정란 이식과 체외수정을 포함한 번식기

술은 동물에 있어서 종축의 유전적 개량을 가속화 하였으며, 수정란의 동결과 이식은 가축에서 이들 목적을 위하여 적용되어지고 있다. 이러한 기술은 멸종위기의 희귀동물이나 경제적 가치가 큰 동물

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-000-00208-0)지원으로 수행되었음.

¹ 경상남도 첨단양돈 연구소 생명공학과

[†] Correspondence : E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

의 생식세포를 장기간 보존할 수 있다는 점에서 그 의의가 매우 크다. 따라서 초기배의 대량확보수단으로서의 난자동결보존기술 개발이 시급히 요구되고 있다. 배아의 동결에 관한 연구는 1972년 Whittingham이 DMSO를 사용하여 완만동결에 의해 생쥐 배아를 빙결점 이하의 온도에서 장기간 동결보존에 성공하여 산자를 탄생시킨 이후 급속히 가속화되었다. 기존의 완만동결은 많은 시간이 소요되었으며 독성이 강한 동해방지제에서 난자의 노출 시간이 길어져 동결 상해를 가져왔다. 그러나 1985년 Rall과 Fahy가 초자화동결(vitrification)을 보고한 이후 많은 연구가 진행되어 왔다. 초자화동결은 고농도의 동해방지제를 사용하여 초급속으로 동결시켜 높은 동결율과 응집력을 가지게 하는 방법으로서 완만동결과는 달리 동결과정 중에 발생하는 빙결정(ice crystal) 형성을 막아 난자의 세포질 손상을 줄일 수 있다(Nakagata 등, 1989; Hotamisligil 등, 1996; Martino 등, 1996; Vajta 등, 1998). 또한, 동결에 소요되는 시간을 감소시키고, 기존의 automatic freezer의 필요없이 액화질소에 곧바로 침지함으로써 매우 경제적이면서 간편하다는 장점이 있다.

이러한 동결보존은 생쥐, 소, 토끼 등에서 많은 성과와 체계가 확립된 반면 낮은 온도에 특히 민감한 돼지의 경우 그 연구결과가 적으며 성과도 거의 없다. 특히 수정란에서의 동결보존에 비해 미수정란에 대한 연구는 매우 미흡하다. 미수정란의 동결보존은 다양한 수정란 연구에 대량의 난자를 공급하여, 시간에 구애받지 않고 여러 가지 실험을 할 수 있으므로 그 기술개선이 시급히 요구되어진다(Pieterse 등, 1991). 그러나 성숙난자의 경우 염색체에 부착되어 있는 미세소관인 방추사가 온도의 변화에 매우 민감하기 때문에 동결, 용해과정에서 미분리(non-disjunction)가 발생하여 염색체의 이상이나 이수현상(aneuploidy)이 증가되며(Van der Elst 등, 1988; Sathanathan 등, 1988; Pickering 등, 1987) 동결된 미수정란은 유사분열방추의 분열이나 파괴로 염색체 변이를 일으키기도 한다(Parks 등, 1992; Glenister, 1987).

동결 보존 후 난자의 생존율에 있어서 동결 방법만큼이나 중요한 것은 동결-용해 과정 중 사용되

는 동해방지제의 종류, 농도 및 처리 시간이다. 기존에는 독성이 강하고 점성이 높은 침투성의 동해방지제로서 DMSO, glycerol 그리고 1,2-PROH를 사용하였다. 그러나 최근에는 Martino 등(1996)이 소 성숙난자를 ethylene glycol을 사용하여 높은 배반포율을 보고한 것과 같이 ethylene glycol을 사용하는 빈도가 높다. 비침투성 동해방지제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 알부민이 있으나 glucose와 sucrose를 가장 많이 사용하고 있다(Kim 등, 1996; Rayos 등, 1994; Zhu 등, 1993).

한편, 동결-용해한 난자는 정상적인 난자보다 형태학적 뿐만 아니라 생물학적으로도 매우 불안정한 상태를 나타내고 있으며, 성숙이나 배발달시 동결 상해로 인한 투명대 파괴와 세포질 손상을 초래한다. 특히, 난자 원형질막의 인지질은 산화반응에 특히 민감한 에스테르화된 다불포화 지방산(Polyunsaturated fatty acids)의 대부분을 포함하며 이는 과산화물질에 의해 공격받기 쉽다. 이러한 막 인지질의 지질 과산화작용은 수정란 발달에 해로운 영향을 초래하지만 배양배지에 superoxide dismutase(SOD) 또는 catalase와 같은 항산화 효소의 첨가는 이를 예방할 수 있다고 보고하였다(Legge와 Sellens, 1991; Nasr-Esfashani 등, 1990; Halliwell와 Gutteridge, 1989; Aitken와 Clarkson, 1988; Halliwell, 1987).

따라서 본 연구는 vitrification방법을 사용하여 돼지 미수정란의 동결-용해시 난자 생존율에 있어서 적합한 동해보호제의 종류와 농도를 규명하고 배양액내에 SOD의 첨가시 그 영향을 검토하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 미성숙 난포란의 회수

난소는 도살직후 돼지에서 회수하여 35~37°C의 생리식염수에 침적하여 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포액은 10ml 주사기에 18-gauge 주사침을 장착하여 직경 2~6mm의 포상 난포로부터 흡입·회수한 후 실험현미경하에서 형태학적으로 세포질과 난구세포가 균일한 난포란을 선택하여 TL-Hepes(114mM NaCl, 3.2mM KCl, 2.0mM

Table 1. Component of frozen-thawing system in porcine oocytes

Group	Vitrification solution(VS)	Component	Time
1	VS 1	HM + 10% EG	3min
	VS 2	HM + 30% EG + 0.5M sucrose	30s
	TM 1,2,3,4	HM + 1, 0.5, 0.25, 0.125M sucrose	each of 3min
2	VS 1	HM +10% EG + 10% DMSO	3min
	VS 2	HM + 20% EG +20% DMSO + 0.6M sucrose	30s
	TM 1,2	HM + 0.5, 0.25M sucrose	each of 5min
3	VS 1	HM + 19% glycerol + 12% DMSO	3min
	VS 2	HM + 38% glycerol + 24% DMSO + 0.6M sucrose	30s
	TM 1,2	HM + 0.5, 0.25M sucrose	each of 5min

HM : holding media(D-PBS + 20% FBS); TM : thawing media; EG : ethylene glycol.

NaHCO₃, 0.4mM NaHPO₄ · H₂O, 10.0mM Na-lactate, 2.0mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.5mM MgCl₂ · 6H₂O, 10.0 mM HEPES, 100IU penicillin, pH 7.4, 280 Osm로 적정)으로 3회 세척한 후 동결에 사용하였다.

2. 동결액과 융해액의 준비

동결과 융해는 동해방지제의 종류와 농도에 따라 Table 1에서 나타난 바와 같이 3개의 Group으로 나누어 실시하였다.

3. 동결과 융해

동결과정은 채란한 미성숙란 10개를 선택하여 VS 1에서 Group 1은 5분, Group 2는 3분, Group 3은 5분간 처리한 후 VS 2에 옮겨 Group 1은 1분, Group 2, Group 3은 30초 이내에 액체질소(LN₂)에 침지하여 동결하였다. Straw는 0.25ml를 사용하였으며 heat sealing하여 실온에서 준비한 액체질소에 난자가 있는 위치까지 30초동안 정치한 후 완전히 침지하였다. 동결된 straw는 보관용 container에 옮겨 7일 이상 보관한 후 실험에 이용하였다.

융해는 straw를 보관용 container내에서 꺼내는 즉시 37°C 증류수에서 30초간 융해 후 S-PBS내에서 난자를 회수한 후 즉시 TM 1에 옮겨 Group 1은 3분, Group 2와 Group 3은 5분간 처리한 후 TM 2에서 Group 1은 3분, Group 2는 30초, Group 3은 5분간 처리한 후 Group 1은 다시 TM 3에서 3분간 처리하여 체외성숙을 실시하였다.

4. 체외성숙

동결-융해된 미성숙란은 형태적으로 정상적이며 난구세포의 균일성과 세포질이 정상적인 것만을 선택하여 체외성숙에 사용하였다. 성숙배양액은 3.05mM glucose, 0.32mM Ca-lactate, 2.5mM HEPES(Quantum Biotechnologies INC, USA), 10% FBS, 0.2mM Na-pyruvate(Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA), 50 µg/ml gentamycin(Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA), 1 µg/ml FSH(Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA), 5 µg/ml LH(Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA) 및 1 µg/ml estradiol 17β(Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA)가 첨가된 TCM-199(Gibco, Life Technologies INC, USA)을 사용하였으며, 난자는 성숙배양액 내에서 3회 세척 후 미리 준비해둔 45 µl 소적내에 각각 10개씩의 난자와 porcine follicular fluid(PFF)를 5 µl씩 첨가하여 42~44시간 동안 성숙배양하였다.

5. 동결-융해 후 체외성숙과 수정시 SOD의 첨가

Group 2의 방법으로 처리하여 동결-융해한 후 형태적으로 정상적인 미성숙 난자만을 회수하여 체외성숙에 사용하였다. 체외성숙시 성숙배지 내에 0, 1, 10, 100 및 500 unit/ml의 SOD를 첨가하여 44시간 성숙배양하였다.

동결-융해과정 없이 체외성숙시킨 성숙란은 Group 2를 처리하여 동결-융해 후 체외수정을 실

시하였다. 체외수정 배양액은 3.05mM glucose, 2.88mM Ca-lactate, 10% FBS, 0.2mM Na-pyruvate (Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA), 50 µg/ml gentamycin(Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA) 및 2 mM caffeine(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)이 첨가된 TCM-199(Gibco, Life Technologies INC. USA)을 사용하였으며 1unit/ml SOD(Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA)를 첨가하였다. 동결정액 Straw는 37°C에서 30초간 용해 후 3.05mM glucose, 2.88mM Ca-lactate, 10% FBS, 0.2mM Na-pyruvate(Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA) 및 50 µg/ml gentamycin(Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA)이 첨가된 TCM-199 (Gibco, Life Technologies INC. USA)으로 10분씩 2회 원심분리하여 1×10^6 spermatozoa/ml이 되도록 희석하여 체외수정을 실시하였다.

6. 난자의 생존을 평가

미성숙 및 성숙난자의 동결-용해 후 성숙단계 및 수정 후 정자의 침입상황을 검토하기 위하여 난구세포와 투명대에 부착된 정자를 제거한 난자는 고정액(acetic acid : ethanol = 1 : 3)에서 2일간 보관 후 1% aceto-orcein으로 염색하여 위상차현미경하에서 성숙 및 수정상황을 검토하였다.

결 과

동결-용해된 돼지 미성숙 난자의 성숙율에 있어서 동해방지제에 따른 영향을 나타내기 위해 Group

1, 2, 3으로 나누어 실시하였다. Table 2에서 나타난 바와 같이 동결상해로 인해 난자의 대부분이 GV기에서 정지되었으며, Group 2에서 M I 기 난자는 18.7%로 유의적인 차이는 없었지만 다른 처리구(0%, 6.3%)에 비해 높게 나타났다. 그러나 모든 처리구에서 M II기까지 성숙된 난자는 관찰되지 않았다.

Table 3은 돼지 미성숙난자를 동결-용해 후 체외성숙시 SOD의 농도에 따른 영향을 검토한 결과이다. 동결과 용해 방법은 Table 1에서 다른 처리구보다 성숙율이 높았던 Group 2의 방법을 이용하여 실시하였으며, 그 결과 0, 1 및 10unit/ml의 SOD 첨가시 M-II기까지 성숙되었다. 비록 무첨가구와 1unit/ml SOD 첨가구에서 3%의 같은 성숙율을 보였지만 1unit/ml SOD 첨가시 M-I기 이상의 성숙율이 65.0%로 무첨가구(54.0%)에 비해 더 높게 나타났다.

한편, 돼지 성숙난자를 동결-용해 후 체외수정시 SOD의 첨가가 정자침입율에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 4에서 나타냈다. SOD는 Table 2에서 성숙율이 높았던 1unit/ml를 첨가하였다. 그 결과, SOD 첨가시 정자침입율이 6.0%로 무첨가시(3.7%)보다 더 높게 나타났으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 vitrification 방법에 의한 돼지 미수정란의 동결-용해시 난자 생존능력에 대한 특정 동해방지제 사용과 SOD의 영향을 검토하였다. 기

Table 2. Effect of different vitrification protectants on *in vitro* maturation of frozen-thawed immature oocytes in the pig

Different vitrification protectants	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes						
		GV	GVBD	P-I	M-I	A-I	T-I	M-II
Group 1	114	76(66.8)	38(33.3)	-	-	-	-	-
Group 2	161	62(38.5)	55(34.2)	12(7.5)	32(19.9)	-	-	-
Group 3	139	90(64.7)	34(24.5)	6(4.3)	9(6.5)	-	-	-

GV : Germinal Vesicle; GVBD : Germinal Vesicle Breakdown; P-I : Prophase I; M-I : metaphase I; A-I : anaphase I; T-I : Telophase I; M-II : Methaphase II.

Table 3. Effect of different concentrations of superoxide dismutase(SOD) on *in vitro* maturation of frozen-thawed immature oocytes in pig

Concentrations of SOD (units/ml)	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes						
		GV	GVBD	P-I	M-I	A-I	T-I	M-II
0	100	20(20.0)	8(8.0)	18(18.0)	47(47.0)	4(4.0)	-	3(3.0)
1	100	29(29.0)	3(3.0)	3(3.0)	60(60.0)	2(2.0)	-	3(3.0)
10	101	23(22.8)	7(6.9)	8(7.9)	61(60.4)	-	1(1.0)	1(1.0)
100	107	20(18.7)	8(7.5)	23(21.5)	55(51.4)	1(0.9)	-	-
500	103	28(27.2)	12(11.7)	11(10.7)	48(46.6)	4(3.9)	-	-

GV: Germinal Vesicle; GVBD: Germinal Vesicle Breakdown; P-I: Prophase I; M-I: metaphase I; A-I: anaphase I; T-I : Telophase I; M-II : Methaphase II.

Table 4. Effect of treat of superoxide dismutase (SOD) on *in vitro* fertilization after frozen -thawing of oocytes matured *in vitro* in pig

Presence of SOD (1unit/ml)	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes penetrated with		
		Total(%)	ESH(%)	BPN(%)
+	100	6(6.0)	6(6.0)	-
-	109	4(3.7)	4(3.7)	-

ESH : Enlarged sperm head; BPN : Both pronuclei.

존에 사용되었던 동해방지제인 glycerol과 DMSO는 VS 1(각각 2.0M, 1.5M)과 VS 2(각각 4.0M, 3.0M)에서 높은 농도로 첨가되었지만 M-I기까지 6.5%로 낮은 성숙율을 나타냈다. 이는 glycerol과 DMSO의 높은 점성으로 인한 삼투압 스트레스와 독성의 영향에 의한 것으로 사료된다. 그에 반해 독성과 점성이 낮은 ethylene glycol만을 첨가해 실험한 결과 만족할 만한 결과는 나타나지 않았지만 ethylene glycol과 DMSO를 동시첨가하여 사용한 결과 M-I까지의 성숙율(19.9%)이 다른 처리구에 비해 비교적 높게 나타났다. 이는 Rubinsky 등(1991)이 돼지의 동결-융해된 미성숙난포관의 체외성숙 후 단지 25%만이 M-I 또는 M-II에 도달되었다는 결과와 유사하게 본 실험에서도 낮은 성숙율을 나타내었다. 동해방지제의 노출시간은 동결-융해 후 생존율에 있어 동해방지제의 선택과 농도만큼 중요하다. Vitriification 방법은 급속동결-융해에 따라 동해방지제에 노출되는 시간이 감소된다.

VS 1 및 2에서 각각 5분 및 1분동안 처리한 것과 비교해 3분 또는 30초동안 처리하는 것이 동해방지제의 독성과 삼투압의 스트레스에 의한 세포의 손상을 감소시켰다. 따라서 짧은 시간동안 동해방지제의 처리시 높은 성숙율을 나타냈으며 straw에 loading후 동결되기 전까지 처리시간의 감소는 생존율을 향상시킬 것이다. 그러나 본 실험에서 동결상해로 인해 세포질이 파괴되고 투명대가 손상되는 난자가 다수 관찰됨에 따라 이를 방지하기 위해 돼지 미성숙난의 동결-융해 후 체외성숙시 SOD를 첨가하여 그 영향을 검토하였다. 세포의 산화에 의한 상해는 세포사의 주된 원인이며 원형질막에서의 지질산화는 활성산소에 의해 촉매된 arachidonic acid의 과산화와 관련된 기작에 의해 매우 불안정하여 결국 원형질막구조의 변화를 초래한다. SOD 무첨가와 1unit/ml의 농도로 첨가시 M-II까지의 성숙율은 3.0%로 같았다. 그러나 M-I에서 M-II까지의 성숙율은 1unit/ml의 SOD 첨가시(65.0%)가 무첨가시(54.0%)보다 더 높은 경향을 나타냈다. 이는 성숙전 난자내 방추사, 미세소관 그리고 미세섬유 등이 낮은 온도나 동결액의 첨가시의 삼투압 스트레스 등에 의하여 쉽게 손상을 받기 때문이며, Suzuki 등(1996)은 동해방지제의 사용이 난자의 dehydration 또는 rehydration될 때 방추사의 이상을 초래하여 염색체 이상을 유도한다고 보고하였다. Mandelbaum 등(1987)은 사람에서 성숙 및 미성숙 난자의 동결-융해 후 성숙 난자에 비해 미성숙 난자가 생존성이 2배 정도 높다고 보고하

었다. 본 실험에서 성숙난자의 동결-융해 후 수정율은 지질 과산화를 방지하기 위해 SOD 1unit/ml의 유무에 따른 영향을 검토하였다. SOD 첨가시 정자침입율(6.0%)이 무첨가시(3.7%)보다 높게 나타났지만 수정률은 낮게 나타났다. 이 결과는 Carroll 등(1990)의 보고에서 성숙란의 경우 동결-융해 후 수정시 표층과립의 조기 방출, 투명대의 물리적 손상, 이상수정이 발생되어 낮은 수정율을 나타내었지만 SOD의 첨가시 원형질막의 손상을 줄여 무첨가시보다 약간 높은 수정율을 나타냈다.

본 연구에서는 돼지 미수정란을 vitrification 방법으로 ethylene glycol과 DMSO를 동해방지제로 사용하여 초자화동결시 성숙율은 낮았으나 다른 처리구에 비해 높은 성과를 나타냈으며 동결-융해 후 성숙배양액에 1unit/ml의 SOD를 첨가시 다른 처리구에 비해 원형질막의 지질 과산화를 방지해 높은 성숙율과 수정율이 나타났다. 이와 같이 동결-융해에 따른 성숙율과 수정율이 낮은 이유는 아직 해결되지 못한 돼지 미수정란의 동결 상해때문일 것으로 생각된다. 그러나 아직 동결융해후의 성숙율의 저하 원인은 정확히 규명되지 않았으므로 동결 후 난자의 세포질 손상에 관한 다양한 연구가 필요하며 이를 방지할 수 있는 대안이 시급히 요구된다.

적 요

본 연구에서는 vitrification방법을 사용하여 돼지 미수정란의 동결-융해시 난자생존능력에 대한 특정 동해방지제 사용과 superoxide dismutase (SOD) 첨가의 영향을 검토하고자 수행하였다. 그 결과 미성숙 난자를 ethylene glycol과 DMSO 노출 후 성숙율(M-I에서 19.9%)이 glycerol과 DMSO 노출 후 성숙율(M-I에서 6.5%)보다 더 높았으며 ethylene glycol에 노출 후에는 M-II기로 성숙발달한 난자는 관찰되지 않았다. 한편, 미성숙 난자의 동결-융해 후 성숙배양시 SOD 1unit/ml의 첨가시 (3.0%) 무첨가시(3.0%)와 성숙율이 같았으나 M-I에서 M-II 단계까지의 성숙율은 1unit/ml 첨가 (65.0%)가 무첨가(54.0%)보다 높은 경향을 보였다. 또한, 성숙난자의 동결-융해 후 수정시 정자침입율

은 1unit/ml SOD 첨가(6.0%)의 경우 무첨가시 (3.7%)보다 더 높게 나타났다.

본 연구의 결과로부터 vitrification방법을 이용한 돼지 미수정란의 동결-융해시 ethylene glycol과 DMSO를 동해방지제로 사용하는 것이 효과적이며, 지질산화를 방지하기 위해 배양액에 1unit/ml의 SOD를 첨가하는 것이 동결-융해된 미수정란의 생존능력을 향상시키는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Al-Hasani SK, Diedrich H, Van der ven A, Reinecke and D. Krebs. 1987. Cryopreservation of human Reprod., 2:695-700.
- Aitken RJ and Clarkson JS. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J. Androl., 9:367-376.
- Carroll JH, Depyere and CD. Matthews. 1990. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. J. Reprod. Fert., 90:547-553.
- Glenister PH, Maureen J, Wood K, Carol K and Whittingham DG. 1987. Incidence of chromosome abnormalities in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. Gamete Res., 16:205-216.
- Halliwall B. 1987. Superoxide-development formation of hydroxy radicals in presence of iron chelators. FEBS Lett., 92:321-326.
- Halliwall B. and Gutteridge JMC. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd edn Oxford University Press, Oxford.
- Hotamisligil S, Toner M. and Powers RD. 1996. Changes 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, Lim JH. 1996. Cryopreservation of

- mouse IVF zygotes by vitrification. Korean J Animal Reprod., 20:119-126.
- Legge M. and Sellens MH. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. Hum. Reprod., 6:867-871.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M and Alnot MD. 1987. Cryopreservation of human embryos and oocytes. Human Reprod., 3:117.
- Martino A, Songsasen N. and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. Biol. Reprod., 54:1059-1069.
- Nakagata N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. J. Reprod. Fertil., 87:479-483.
- Nasr-Esfahani MH, Aitken RJ and Johnson MH. 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. Development, 103:501-507.
- Parks JE and Ruffing NA. 1992. Factors affecting low temperature survivals of mammalian oocytes. Theriogenology, 37: 59-73.
- Pickering SJ and Johnson MH. 1987. The influenced 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.
- 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.
- Rubinsky B, Arav A and Devires AL. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. Cryo-Letters, 12:93-106.
- Sathanathan AH, Ng AC, Thounson AO, Bongso A, Ratnam SS and Ho J. 1988. The effect of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryos. Gamete Res., 21: 385-401.
- Schalkoff ME, Oskowitz SS and Powers RD. 1989. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservation. Bio. Reprod., 40:370-393.
- Suzuki T, Boediono A, Takagi M, Saha S. and Sumantri C. 1996. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution methods *in vitro*. Cryobiology, 33:515-524.
- Vajta G, Holm P. and Kuwayama M. 1998. Open pulled straw(OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol. Reprod. Dev., 51:53-58.
- 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.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . Science NY, 187:411-414.
- Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T and Machida T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol -based solutions. J Reprod. Fertil., 98: 139-145.

(접수일: 2002. 9. 2/ 채택일: 2002. 11. 10)