

## 배 발달단계와 Superoxide Dismutase가 Open Pulled Straw(OPS) 방법에 의해 동결-융해한 수정란의 생존성에 미치는 영향

이상영<sup>1,\*</sup> · 유재숙<sup>1</sup> · 사수진<sup>2</sup> · 박춘근<sup>2</sup>

<sup>1</sup>경상남도첨단양돈연구소 생명공학과, <sup>2</sup>강원대학교 동물생명과학대학

### Effects of Embryo Developmental Stage and Superoxide Dismutase on the Survival of Frozen-Thawed Porcine Embryos by Open Pulled Straw (OPS) Method

Sang-Young Lee<sup>1,\*</sup>, Jae-Suck Yu<sup>1</sup>, Soo-Jin Sa<sup>2</sup> and Choon-Keun Park<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Division, Gyeongsangnam Province Advanced Swine Research Institute, Sanchung 666-962, Korea

<sup>2</sup>College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### ABSTRACT

This study was performed to investigate the effects of embryo developmental stage and superoxide dismutase (SOD) on the survival of frozen-thawed porcine embryos by open pulled straw(OPS) method. Porcine IVF blastocysts were frozen-thawed by OPS method and cultured for 48 h under the existence of SOD. There are no significant differences in the proportions of normal morphology among the early, mid- and expanded blastocyst stages (30.8~38.6%). After culture of embryos, the developmental rates to the expanded blastocyst stage(38.7%) were significantly higher than those of other stages ( $P<0.05$ ). The proportions of expanded and hatched embryos were higher in medium with 1 unit/ml SOD than 0 and 10 units/ml of SOD. The result indicates that OPS method can use for the pig embryo cryopreservation, especially for the late stage blastocysts. SOD may can reduce the damage of frozen-thawed porcine embryos.

(Key words : OPS, SOD, Pig blastocyst, Survival ability)

#### 요 약

본 연구는 OPS 기법에 의한 돼지 수정란의 동결-융해 시 수정란의 발달 단계와 superoxide dismutase (SOD)가 수정란의 생존능력에 미치는 영향을 검토하였다. 돼지 체외수정 배반포는 OPS 방법에 의해 동결 후 융해하여 0~10 units/ml의 SOD 존재 하에 48시간 체외배양하였다. 동결-융해 후 형태학적으로 정상적인 수정란의 비율은 초기, 중기 및 확장배반포 간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다(30.8~38.6%). 그러나 발육단계가 높을수록 형태적으로 정상인 수정란의 비율이 높은 경향을 나타냈다. 수정란의 융해 후 48시간 추가 배양했을 때, 발육이 진행된 수정란은 후기배반포기에 동결한 수정란이 38.7%로 유의적으로 높았으며( $P<0.05$ ), 1 unit/ml의 SOD를 첨가한 경우 비교적 높은 생존율을 나타내었다. 본 연구의 결과로부터, 수정란의 OPS 방법에 의한 동결-융해 후 생존성의 향상을 위해서는 후기배반포기 단계에 동결하는 것이 유리하며, SOD의 첨가는 수정란의 손상을 어느 정도 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 서 론

돼지는 세대간격이 짧고 산자수가 많아 생산성이 높으며 사람과 장기의 형태와 크기가 유사하고 타 동물에 비하여 윤리적 부담이 적어, 복제 및 형질전환 동물과 장기 이식용 동물의 연구에 활발하게 이용되고 있다. 그러나 이와 같은 첨단 기술을 활용하기 위해서는 수정란의 대량 생산 보존 및 공급 체계에 대한 기술 정립이 요구

되고 있다. 타 가축에서 수정란의 동결보존에 대한 연구가 상당히 진전된 것과는 상대적으로 돼지의 경우 미성숙 및 성숙난자뿐 아니라 수정란의 동결 보존에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이며, 연구 결과에서도 돼지 수정란의 동결-융해후 생존성 및 발육 능력도 아직 매우 낮은 실정이다(이 등, 2003). 이와 같은 원인은 돼지난자의 동결시 세포내의 지방구 방출에 따른 세포 상해와 동결보호제의 삼투에 의한 세포질의 응축, 낮은 온도에서 세포질내 미세소관들이 민감하게 반응하기 때문에 동결 보

\* Corresponding author : E-mail: sylee@gsnd.net

존하는 데 어려움을 겪고 있다(Park과 Ruffing, 1992; Kai-di 등, 2000). 또한 동해 보호제의 노출이나 난자의 세포질 표면에 존재하는 cortical granule cell이 조기 방출하여 투명대의 물리적 손상이나 경화현상이 발생하므로 융해 후 난자의 생존율 및 수정율의 저하나 이상 수정 혹은 염색체 이상의 발생 빈도가 높아진다. 따라서 성숙난자 보존기술의 대안으로서 방추사가 형성되기 전 단계인 미성숙 난자의 동결-보존이 이러한 문제점을 해결해 줄 수 있을 것으로 제시되었다(Park 등, 1997). 그러나 미성숙 난자의 경우 성숙난자보다 낮은 온도에 더 민감하여 세포상해를 입으며, 동결보존의 기술적인 문제에 많은 어려움을 겪고 있다.

1972년 Whittingham이 DMSO를 사용하여 완만 동결에 의한 생쥐 수정란의 동결 보존에 성공한 이래, Rall과 Fahy(1985)가 초자화 급속 동결을 보고하는 등 동결 방법에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 초자화 급속 동결은 고농도의 동해 방지제를 사용하여 급속으로 동결시켜 높은 동결율과 응집력을 가지게 하는 방법으로서 완만 동결과는 달리 동결 과정 중에 발생하는 세포질내 얼음 결정(ice crystal) 형성을 막아 난자의 세포질 상해를 줄일 수 있다(Nagata 등, 1989; Vajta 등, 1989; Hotamisligil 등, 1996; Martino 등, 1996). 또한 초자화 급속 동결은 동결에 소요되는 시간을 감소시키고 액체 질소에 곧바로 침지함으로써 매우 경제적이면서 간편하다는 장점이 있다. 이와 같은 초자화 급속 동결 기술은 소 등의 동물에서는 많은 연구자의 연구결과에 의해 동결 보존 기법이 체계화되었으나, 돼지에서는 연구 결과가 거의 없을 뿐 아니라 성과도 거의 없다(Kim 등, 2002).

돼지 난자의 세포질 내에는 지방구가 다량 함유되어 있으므로 동결보존 시 상해가 다른 동물종에 비하여 매우 심하여(Dobrnisky, 2001), 지금까지 이용되어온 분당  $-0.1 \sim -0.3^{\circ}\text{C}$ 의 냉각 속도로 동결하는 완만동결기법과  $-2,000^{\circ}\text{C}/\text{분}$  초자화 급속 동결 기법을 개선하여 Vajta 등(1997a)이 소 배반포기 수정란을 동결시 분당  $-20,000^{\circ}\text{C}$ 의 동결 속도로 초급속 동결하여 난자의 상해를 최소화 시키는 기법을 개발하여 효과적인 결과를 얻었으며, 그 후 Berthelot 등(2000)이 돼지 산자의 출생에 성공하였다. 또한 동결-융해한 수정란은 정상 수정란보다 형태학적, 생물학적으로 매우 불안정하여 상해로 인한 세포질 손상을 가져와 수정란의 원형질막 인지질의 과산화작용으로 수정란에 악영향을 초래하지만 항산화제의 첨가로 이를 방지할 수 있다고 보고하였다(Nasr-Esfashani 등, 1990; Legge와 Sellens, 1991). 한편, Vajta 등(1997a)이 소의 배반포 및 확장배반포와 같은 수정란을 비롯하여 핵이식 난자를 동결-융해하여 효과적인 결과를 얻은 Open pulled straw(OPS) 동결 방법을 보고했으며, 그 후 OPS 동결 융해 후 이식하여 돼지 산자의 출산에 성공하였다(Berthelot 등, 2000). 그러나 OPS 법에 의해 동결-융해된 소 난자는 생리적 변화와 수정율, 수정란의 발육 및 산자의 생산에 효과적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있지만 돼지의 경우 이와 관련된 연구가 아직 불충분한 실정이다.

본 연구는 돼지 수정란의 OPS 방법에 의한 동결 및 융해 후 수정란의 발육단계와 배양액내에 SOD의 첨가가 수정란의 생존성에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 기본 배양액

난자의 체외성숙 및 체외배양을 위해 기본 배양액으로는 10.87 mM NaCl, 0.478 mM KCl, 0.17 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.119 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.119 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25.07 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.00 mM glutamine, 7.00 mM taurine, 5.55 mM glucose, 50  $\mu\text{l}/\text{ml}$  gentamycin이 첨가된 NCSU-23(North Carolina State University-23)을 사용하였다.

### 미성숙 난포난자의 회수

난소는 도살직후 돼지에서 회수하여  $35 \sim 37^{\circ}\text{C}$ 의 생리 식염수에 침적하여 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포액은 10 ml 주사기에 18-gauge 주사침을 장착하여 직경 2~6 mm의 포상난포로부터 흡입·회수한 후 실험미경하에서 형태학적으로 세포질과 난구세포가 균일한 난포란을 선택하여 TL-Hepes(114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.0 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 10.0 mM Na-lactate, 2.0 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10.0 mM hepes, 100 IU penicillin, pH 7.4, 280 Osm로 적정)으로 3회 세척한 후 체외성숙배양에 이용하였다.

### 난자의 체외성숙

채란된 난자는 형태적으로 정상적이며 난구세포의 균일성과 세포질이 정상인 것만을 선택하여 체외성숙에 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 5.0 mM hypotaurin, 0.57 mM cystein, 10% pFF, 10 IU/ml PMSG 및 10 IU/ml hCG가 함유된 NCSU-23(Wang 등, 1997) 배양액에서 24시간 배양 후 hormone 물질을 제거한 성숙 배양액 내에서 24시간 동안 추가 성숙배양을 실시하였다.

### 체외수정

체외수정은 48시간 동안 체외성숙시킨 난자를 0.1% hyaluronidase가 함유된 배양액 내에서 난구세포를 제거하였다. 이후 난자는 체외수정용 배양액 내에서 3회 세척하여 45  $\mu\text{l}$  소적 내에 난자를 5개씩 넣고 정자를 첨가할 때까지  $39^{\circ}\text{C}$ 의 5%  $\text{CO}_2$  조건의 인큐베이터 내에 넣어 두었다. 동결정액 Straw는  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 융해 후 5.56 mM glucose, 0.33 mM Na-pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin 및 4 mg/ml BSA가 첨가된 D-PBS액을 가지고 1,500 rpm에서 10분간 2회 원심분리를 실시하여 세척하였다. 체외수정을 위한 배양액은 pH 7.2~7.4에서 2 mM caffeine과 2 mg/ml BSA가 첨가된 modified Tris Buffer Medium(mTBM) 배양액을 이용하였다. 체외수정시 정자의 최종 농도는  $2.5 \times 10^6$  cells/ml로 조정하여 준비한 수정용 소적 내에 5  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 체외수정을 실시하였다.

### 체외배양

체외수정 8시간 후, 체외발육을 위하여 5.0 mM hypotaurine, 4 mg/ml BSA 및 10 ng/ml epidermal growth factor(EGF)가 첨가된 NCSU-23 배양액 45  $\mu\text{l}$  소적에

10개씩의 수정란을 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 그리고 포화습도가 유지되는 배양기내에서 7일간 배양하여 배반포 발달을 조사하였다.

**OPS 동결-융해**

OPS 동결은 Vajta 등(1997a)에 의해 보고된 동결과정을 변형하여 이용하였다. 동결에 사용된 스트로는 두께가 0.158~0.8 mm이며 내부 직경은 0.8~1.7 mm의 미세모세관으로 수정란이 들어있는 0.2 µl 동결보존액을 삼투압으로 흡입하여 수정란이 들어있는 동결보존액을 극소량으로 하여 초급속 냉동하였다. 한편, 동결을 위한 holding medium(HM)은 TCM-199 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 2.5 mM Hepes 및 20% FCS를 첨가하여 기본 배양액으로 하였으며, sucrose media는 TCM-199에 0.6 M sucrose과 20% FCS를 첨가하여 사용하였다. 동결에 사용되는 동결액 조성에서 vitrification solution (VS)1은 HM에 10% ethylene glycol(EG), 10% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 사용하였고, VS2는 sucrose media에 20% EG 및 20% DMSO를 첨가하여 사용하였다. 동결과정은 4 well dish에 HM, VS1을 첨가한 후 mineral oil로 피복하여 실험 시작 전 2~3시간 동안 preincubation을 실시하였다. 한편 난자는 HM에 옮겨가며 세척을 실시한 후 VS1에서 3분 동안 평형을 실시하여 VS2 100 µl 소적에 옮겨 다시 세척하였다. 세척과정에서 30초간 동해보호제에 노출 후 즉시 2 µl 소적에 5개의 난자를 넣어 모세관작용에 의해 난자를 흡입한 후 바로 -196°C LN<sub>2</sub> 내에 침적하여 동결을 실시하였다. 동결된 straw는 LN<sub>2</sub> container에 옮겨 7일 이상 보관한 후 융해하여 실험에 이용하였다. 융해 media는 HM과 0.6 M sucrose액을 2:1의 비율로 혼합하여 thawing medium(TM1)으로 사용하였으며, TM2는 HM과 0.6 M sucrose를 4:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. Straw는 LN<sub>2</sub> container내에서 꺼내는 즉시 TM1 media에 넣어 5분 동안 융해한 후 TM2에서 5분간 유지하다가 HM에서 5분 동안 융해하였다.

**수정란의 생존능 검사**

동결-융해된 수정란은 형태적인 정상성을 검사하고, 형태적으로 정상인 수정란을 NCSU-23 배양액에 5.0 mM hypotaurine, 4 mg/ml BSA, 10 ng/ml EGF 및 0~10 units/ml SOD를 첨가하여 48시간 배양하여 발달율을 조사하였다.

**통계분석**

자료의 분석은 SAS 프로그램의 GLM 분석을 이용하여 유의성을 검정하였다.

**결 과**

**동결융해란의 생존성**

돼지 배반포를 발육단계별로 분류하여 OPS 기법으로 동결-융해 후 형태적인 정상성을 검사한 결과는 초기, 중기 및 후기배반포가 각각 30.8, 38.6 및 35.5%의 성적을 보여 유의적인 차이가 없었다(Table 1). 또한 수정란의 동해는 모든 발육단계에서 61.4~69.2%를 나타내어 유의차는 인정되지 않았으나, 완전한 세포상해의 경우는 초기배반포가 46.2%로 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05).

**동결융해란의 발육능**

돼지 수정란을 OPS 기법으로 동결-융해 후 형태적으로 정상인 배반포를 SOD가 첨가된 배양액 내에서 48시간 배양한 결과, SOD의 첨가 수준에 따른 생존율은 SOD 1 unit/ml 첨가구의 성적이 대체로 높게 나타났으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 배반포기 수정란을 발육단계별로 48시간 배양 후 발육이 진행된 수정란은 초기, 중기 및 확장배반포가 각각 30.0, 32.5 및 38.7%로, 확장배반포의 생존율이 가장 우수하였다(P<0.05). 또한 48시간 배양 후 부화된 수정란은 후기배반포(22.6%)가 제일 높았고 배반포(17.5%)와 초기배반포(16.7%) 순으로, 통계적 유의성은 인정되지 않았으나 발육단계가 높은 배반포를 동결-융해하였을 때 생존율이 높은 경향을 보였다.

**고 찰**

고능력동물의 생산, 특정 유용물질의 생산을 위한 bio-reactor의 생산 및 의학 분야에서 장기이식을 목적으로 한 장기 이식용 동물의 생산에 생식세포를 이용한 생명공학 기술의 개발과 활용을 위하여 난자 및 수정란의 안정적인 공급이 필요하다. 안정적인 수정란 공급의 일환

**Table 1. Morphology of frozen-thawed porcine embryos**

Stage of blastocyst	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered after thawing	Morphology of embryos thawed(%)			
			Intact	Damaged		
				Partial	Complete	Total
Early	112	104	32(30.8)	24(23.1) <sup>b</sup>	48(46.2) <sup>a</sup>	71(69.2)
Mid-	126	114	44(38.6)	40(38.6) <sup>a</sup>	30(26.3) <sup>b</sup>	70(61.4)
Expanded	95	93	33(35.5)	38(40.9) <sup>a</sup>	22(23.6) <sup>b</sup>	60(64.5)

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05).

Table 2. Effect of SOD on developmental ability of frozen-thawed pig embryos after *in vitro* culture for 48 hrs

Stages of embryos cultured	SOD (unit/ml)	No. of embryos cultured	No. (%) of developed to		
			Total	Expanded	Hatching
Early blastocyst	0	10	4(30.0)	2(20.0)	2(20.0)
	1	10	4(40.0)	2(20.0)	2(20.0)
	10	10	1(10.0)	-	1(10.0)
	Subtotal	30	9(30.0) <sup>b</sup>	4(13.3)	5(16.7)
Mid-blastocyst	0	13	4(30.8)	2(20.0)	2(15.4)
	1	13	6(46.2)	3(20.0)	3(23.1)
	10	14	3(21.4)	1( 7.1)	2(14.3)
	Subtotal	40	13(32.5) <sup>b</sup>	6(15.0)	7(17.5)
Expanded blastocyst	0	10	3(30.0)	1(10.0)	2(20.0)
	1	10	5(50.0)	1(10.0)	4(40.0)
	10	11	4(36.4)	3(27.3)	1( 9.1)
	Subtotal	31	12(38.7) <sup>a</sup>	5(16.1)	7(22.6)

<sup>ab</sup> Values with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

으로 최근에 들어서는 수정란의 동결보존을 위한 여러 가지 새로운 방법들이 발표되었는데 그 가운데 초자화 동결법이 개발되면서 동결보존이 보편화 되었고, 일반적으로 사용된 slow-rates freezing 법에 대한 좋은 변화로 간주되고 있다. 현재 수정란의 경우 동결과 융해속도에 대한 연구에 관심이 집중되었는데, electron microscopy grid(Park 등, 1999), open pull straw법(Vajta 등, 1997b; Lewis 등, 1999)과 nylon-loop(Lane과 Gardner, 2001) 등이 개발되었다. Vajta 등(1998)은 OPS 방법이 동결과 융해율을 증가시켰으며, 동결보호제를 낮은 농도로 사용함으로써 독성을 감소시키고 삼투압 손실을 줄이는 것으로 보고했다. OPS 방법이 쉽고 유용하게 사용될 수 있지만 LN<sub>2</sub> 내에 직접 넣으면 straw가 떠나므로 동결속도의 감소로 난자에 손상을 줄 가능성이 있지만 이들 기술적인 문제만 해결된다면 매우 효과적인 동결법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다 (Kim 등, 2001).

본 연구는 OPS 방법에 의한 돼지 배반포기 수정란의 동결-융해 후 형태적인 정상성을 검토한 결과, 배반포기 stage에 따른 유의차를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 동결시 수정란의 발육단계가 높을수록 발육의 지연 또는 정지되는 수정란보다는 정상적으로 발육이 진행된다는 보고 (Lee 등, 2003)와는 차이가 있다. 그러나 형태적인 정상성만으로는 생존성을 판정할 수 없다. 한편, 동결-융해 후 48시간 배양 후의 생존성을 검토한 결과, 후기배반포기에 동결하는 것이 유의적으로 높은 성적을 나타내었다. 이러한 결과는 Lee 등(2003)이 통계적 유의차는 인정되지 않았으나 발육단계가 높을수록 후기배반포와 부화까지 발육율의 성적이 높게 나타났다는 보고와 Dobrinsky 등(2000)이 cytochalasin-B가 돼지 수정란의 vitrification 동결에 미치는 영향의 실험에서 발육단계가 높

을수록 생존율이 유의적으로 높다는 결과와 대체로 일치하였다. 한편 Vajta 등(1997b)이 다양한 발육단계의 돼지 수정란을 OPS vitrification 방법으로 동결 융해 후 생존성 실험에서 상실배 이상 발육단계의 수정란의 생존율(91%)과 부화율(67%)의 성적과는 차이를 보였으며, 상실배 이상 발육단계의 수정란의 생존율과 부화율은 크게 다르지 않다는 결과와는 차이를 나타냈으나, 동일 실험에서 8~16세포기의 생존율과 부화율은 유의적으로 낮은 성적을 나타낸 것과 유사한 결과를 나타냈다.

돼지 체외수정란의 체외배양시 체외 발육 억제 현상은 초기배 수정란의 genome을 활성화시키는 체내의 난관과 자궁의 조건을 체외에서 만들지 못하며, 체외수정란의 세포발육에 유해한 요인을 제거하지 못하는 것으로 보고되었다 (Corsby 등, 1988; Li 등, 1993). 세포의 체외배양시 세포내의 과산화물은 세포의 독성물질로 작용하는데, 이러한 과산화물을 환원시키기 위하여 체내에는  $\alpha$ -tocopherol(vitamin-E), ascorbic acid(vitamin-C), superoxide dismutase, catalase 등과 같은 항산화 물질(antioxidants)이 존재하나, 체외에서는 이와 같은 항산화 물질이 첨가되지 않아 세포의 성장을 억제하는 경우가 있어(Murray 등, 1990), 항산화제를 첨가함으로써 발육 억제 현상을 극복할 수 있다고 보고하였다 (Li 등, 1993). 본 실험에서는 동결 상해로 인한 세포질이 파괴되고 투명대가 손상되는 난자가 다수 관찰됨에 따라 이를 방지하기 위하여 돼지 배반포기 수정란을 초급속 동결-융해 후 체외배양시 SOD를 첨가하여 그 영향을 검토하였다. 세포의 산화에 의한 상해는 세포 사멸의 주된 원인이며 원형질막에서 지질산화는 활성산소에 의해 촉매된 arachidonic acid의 과산화와 관련된 기작에 의해 매우 불안정하며 결국 원형질막 구조의 변화를 초래한다. 이는 난자내 방추사,

미세소관 그리고 미세섬유 등이 낮은 온도나 동결액의 첨가시의 삼투압의 스트레스 등에 의하여 쉽게 손상을 받기 때문이며, Suzuki 등(1996)은 동해방지제의 사용이 난자의 dehydration 또는 rehydration 될 때 방추사의 이상을 초래하여 염색체 이상을 유도한다고 보고하였다. 본 실험에서는 동결-융해 후 수정란의 지질 과산화를 방지하기 위하여 SOD 첨가 영향을 검토하였다. 처리구별로 통계적으로는 유의차를 나타내지는 않았으나 1 unit/ml 첨가구의 생존율이 더 높은 경향을 나타내어 SOD의 첨가시 원형질막의 손상을 방지에 영향을 미친다는 것을 입증하였다.

본 연구의 결과로부터, 돼지 수정란의 OPS 방법에 의한 동결-융해 후 생존성의 향상을 위해서는 후기배반포기 단계에 동결하는 것이 유리하며, SOD의 첨가는 수정란의 손상을 어느 정도 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Berthelot F, Martinat-Butte F, Locatelli A, Perreau C, Terqui M (2000): Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 41:116-124.
- Corsby IM (1988): Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil* 82:769-775.
- Dobrinsky JR (2001): Cryopreservation of swine embryos: A Chilly past with a vitrifying future. *Theriogenology* 56:1333-1344.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA (2000): Birth of piglets after in transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification.
- Hotamisligil S, Toner M, 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.
- Kaidi S, Donnay I, Lambert P, Dessy F, Massip A (2000): Osmotic behavior of *in vitro* produce bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology* 41:106-115.
- Kim MS, Kim SW, Cheong HT, Lee SY, Yang BK, Kim CI, Park CK (2002): Effect of superoxide dismutase and cryoprotectants on viability of frozen-thawed porcine oocytes by vitrification method. *Korea J Emb Trans* 16:117-126.
- Kim SW, Park CK, Cheong HT, Yang BK, Kim CI (2001): Survival ability of porcine oocytes frozen-thawed by open pulled straw method. *Korea J Emb Trans* 16:117-126.
- Lane M, Gardner DK (2001): Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Dev* 58:342-347.
- Lee SY, Park YH, Chung DS, Park CK (2003): Survival ability of pig embryos frozen-thawed by open pulled straw methods. *Proc 3rd Int Dev Engineering Cong* p. 108.
- Legge M, Sellens MH (1991): Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum Reprod* 6:867-871.
- Lewis IM, Lane MW, 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).
- Li J, Foote RH, Simkin ME (1993): Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine orsuperoxide dismutase. *Biol Reprod* 48:33-39.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP (1996): Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol Reprod* 54:1059-1069.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VA (1990): Lipid peroxidation is a source of free radicals *in vivo*. *Harper's Biochem(eds.)* pp. 142-143.
- Nakagata N (1989): High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil* 87:479-483.
- Nasr-Esfahani MH, Aitken RJ, Johnson MH (1990): Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development* 103:501-507.
- Park SE, Chung CJ, Son WY, Chung HM, Lee SH, Lee WS, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY (1997): Chromosome configurations of human oocytes matured *in vitro* following cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Korean J Fertil Steril* 24:253-259.
- Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS, Lim JH (1999): Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum Reprod* 14:2838-2843.
- Rall WF, Fahy GM (1985): Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 313:573-575.
- Suzuki T, Boediono A, Takagi M, Sha S, 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, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H (1997a): Successful vitification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letter* 18:191-195.
- Vajta G, Greve T, Callesen H (1997b): Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta Vet Scand* 38:349-352.
- Vajta G, Lewis IM, Kuwayama M, Greve T, Ca-

- Ilesen H (1998): Sterile application of the open pulled straw (OPS) vitrification method. *Cryo-Letters* 19:389-392.
25. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972): Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science* 187:411-414.
26. 이상영, 박영호, 도은희, 김형주, 정대석 (2003): 돼지에서 open pulled straw(OPS) 방법에 의해 동결-융해한 수정란의 생존능력. 제19차 한국축산기술협의회 학술발표 논문집 59-74.  
(접수일자: 2006. 2. 15 / 채택일자: 2006. 3. 12)