

Open Pulled Straw(OPS) 방법에 의한 체외 배양 동결 수정란의 미경산돈 이식

김인덕, 석호봉*
단국대학교 동물자원학과

Gilt Transfer of Cultured Freezing Embryos by Open Pulled Straw(OPS) Methods

In-Doc Kim and Ho-Bong Seok*

Department of Animal Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

ABSTRACT

In previous studies, we reported that sow which was transferred OPS-freezing embryos not able to deliver a piglet (Kim *et al*, 2004). This study was conducted to investigate a possibility of gilt as recipients which produce piglets after transfer of OPS-freezing embryos. All transferred embryos were prepared by *in vitro* production (IVP) system. *In vitro* culture (IVC) medium used glucose-free NCSU23 supplemented with 5mM sodium pyruvate, 0.5 mM sodium lactate and 4 mg/ml bovine serum albumin for 2 days at 39°C. From day 3 of IVC, 10% fetal bovine serum albumin was added to the culture medium. In preparing of freezing embryos, embryos were treated with 7.5 µg/ml cytochalasin-B for 30 min and centrifuged at 13,000 × g for 13 min. And then, embryos were exposed sequentially to an ethylene glycol (EG) solution, aspirated into open pulled straw (OPS), and plunged or thawed into the liquid nitrogen. In embryo transfer (ET), we used two kinds of type (surgical method vs. non-surgical method). In surgical method of embryo transfer, 55~65 embryo were transferred in both uterine horn of two recipient gilts by plastic straw. Non-surgical method which is like artificial insemination was performed on three gilts. Each 140 frozen embryos were transferred to two gilts and 40 fresh embryos to one gilt. Pregnancy establishment was shown one recipient at 45 days after ET. However, the one recipient was also aborted at 58 days after ET. These results suggest that gilts can be considered as a candidate of recipients for OPS-freezing embryo transfer.

(Key words : open pulled straw, vitrification, surgical, nonsurgical, gilt transfer)

서론

돼지 수정란 이식과 동결기술은 양돈 생명 산업에 있어 최상의 유전물질을 보존하며, 최소한의 경비로 국제간의 유전적 재료를 교환할 수 있고, 질병 전파의 위험을 경감할 수 있는 중요한 기술로 집중되고 있다. 그러나 실제로 돼지수정란 이식 자체의 제한된 여건으로 인해 소와 양에서처럼 빈번하게 응용되지 못하고 있다(Dobrinsky, 2001; Beebe 등, 2002). 즉, 특수한 장비와 인력이 필요한 외과적 이식에서 비외과적 이식으로 전환하여 임신 성공률을 향상시키고 새로운 동결 보존 방법을 개선할 수 있어야 할 것이다. 지금까지 유리화 동결에 의해 동결한 돼지 수정란의 체내 이식에 의한 산자 생산은 성공적인 결과를 얻고 있지 못하고 있는데, 이는 돼지 수정란의 동결에 대한 취약한 특성이 잘 알려지지 않은 상태에서 실험이 진행되어 반추동물 등 다른 동물들에서보다 생산

성이 저조한 것으로 판단된다.

최근 소개된 open pulled straw(OPS) 방법은 straw의 내경을 가늘게 만들어 동결하고자 하는 수정란과 동결액의 용적을 최소화함으로써 유리화 동결의 냉온 비율을 최대로 증가시키고 동결시 수정란이 받는 냉해를 감소시키도록 고안되고 있다(Vajta 등, 1997; Berthelot 등, 2007). 최근 돼지수정란에 함유된 지방구를 cytochalasin B와 같은 세포 골격 안정제를 이용하여 난세포질 내의 actin filament를 depolymerizing시킨 다음 원심분리하여 한쪽으로 모아진 지방구 상태에서 OPS에 의해 급속 동결하는 방법이 보고되고 있다(안 등, 2004; Beebe 등, 2005).

선진 몇몇 국가에서 동결 처리한 돼지 수정란에서 자돈 생산을 성공적으로 보고한 예가 있으나 (Berthelot 등, 2000; Dobrinsky 등, 2000; Beebe 등, 2002; Misumi 등, 2003), 국내에서는 아직 성공한 예가 없다. 냉동 수정란의 체내 이식에 의한 자돈 생산은 물론 이식 후 생존율 향상과 산자수를 증가시키

* 이 연구는 2008학년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음.

* Correspondence : E-mail : hobong@dankook.ac.kr

는 새로운 방법이 계속 소개되고 있어 돼지의 번식 효율을 새로운 차원으로 향상시키는 기술과 방법이 절대적으로 요구되고 있다. 본 연구와 관련된 국내 보고(김 등, 2004)에서 6두의 sow recipient에 체외 배양한 수정란을 외과적 및 비외과적으로 이식한 결과 임신을 성공시키지 못하였는데, 주된 원인이 야외 농장 이식에 의한 환경과 sow의 자궁 상태가 이식 태아의 착상에 영향을 줄 수 있다고 고찰하였다.

따라서 본 연구에서는 도축돈의 미성숙 난자를 체외 성숙, 체외 수정 및 체외 배양을 통하여 생산된 체외 수정란을 OPS 방법을 이용하여 유리화 동결한 후 이를 미경산돈에 이식함으로써 OPS 동결 수정란으로부터 자돈을 생산할 목적으로 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 미성숙 난포란의 준비

미성숙 난포란을 채취하기 위하여 돼지 전용 도축장에서 난소를 채취한 후 생리식염수가 담긴 보온병에 담아 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 식염수로 난소를 세정하여 이물질과 혈액을 제거한 다음 18 gauge 주사침이 장착된 10 mL 주사기로 직경 3~6 nm의 포상난포들로부터 난포 내용물을 흡입, 회수한 후 15 mL conical tube에 분주하여 10분간 정지하였다. Tube 하단의 침전물을 채취하여 TCM-199(Sigma, St. Louis, MO, USA) 배양액에서 다층의 난구세포가 부착되어 있고 난세포질이 균일한 난포만을 선택하여 체외 성숙 배양액으로 6회 세척한 후 체외 성숙 배양에 이용하였다.

2. 난자의 체외 성숙

성숙 배양액은 TCM-199(Sigma)에 10 μ l/ml pyruvic acid, 0.5 μ l/ml gentamicin, 0.1 mg/ml cysteine, 1 μ l/ml β -estradiol, 2 μ l/ml FSH 그리고 10%의 pFF(porcine follicular fluid)를 각각 첨가하였고, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 40시간 동안 성숙 배양을 실시하였다.

3. 정자의 준비 및 체외 수정

체외 성숙한 난포란을 hyaluronidase(0.1%)와 caffeine(5 mM)이 함유된 mTBM(modified Tris-buffered medium: NaCl) 113.1 mM, KCl 3.0 mM, CaCl₂ 10.0 mM, Tris 20.0 mM, glucose 11.0 mM, Na-pyruvate 5.0 mM, gentamicin 50 μ g/mL, 0.4% BSA(fatty acid free, Sigma)에 노출시켜 부분적으로 난구세포를 제거한 후 mTBM 배지에서 3회 세척하였다. 미리 준비한 4-well cultured dish에 mTBM 배지를 0.5 mL씩 분주하고 mineral oil로 피복한 수정배지에 well당 40~50개의 난포란을 주입하여 수정 전 약 30분간 CO₂ 배양기에서 평형하였다. 체외 수정을 위한 정자는 동결정액을 분양받아 percoll처리한

후, CO₂ 배양기에서 수정능을 획득한 정자 부유액을 성숙난포란이 들어 있는 well에 주입하여 6시간 동안 배양함으로써 체외 수정을 유도하였다.

4. 체외 배양 및 배아 선별

체외 수정 종료 후 난자를 hyaluronidase가 포함된 배양액으로 난구세포를 완전히 제거하였으며, pH 7.4, 280~300 mOsmol로 조정된 0.5% BSA가 포함된 glucose-free NCSU 23 media로 3회 세척한 후 2~3시간 동안 38.5°C, 5% CO₂로 평형한 동일배지에 넣어 oil로 피복한 다음 48시간동안 배양하였다. 배 발달이 시작된 난자들만 따로 모아 0.1 mg/mL cysteine, 10 IU/mL eCG, 10 IU/mL hCG, 10 ng/mL EGF, 0.4% BSA, 10% FBSA, 10% pFF가 첨가된 NCSU 23에 옮겨서 체외 배 발달을 유도하였으며, 5~6일째에 실험현미경상에서 형태학적으로 우수한 배아를 선별하였다.

5. 동결과 융해

수정란의 동결 및 융해는 Beebe 등(2002)의 방법에 준하여 실시하였다. 동결 과정은 선별된 수정란을 7.5 μ g/ml cytochalasin B(Sigma-Aldrich Co.)액에서 30분 동안 처리한 후 13,000 rpm에서 13분 동안 원심분리함으로써 지방구를 한쪽으로 분리하였다. 수정란의 유리화 동결은 DPBS + 10% FBS 용액(vitrification solution 1:VS 1)에 1분간, 2회 반복 처리하였고, 2M EG 용액(VS 2)에 5분 침지한 후 다시 7% PVP 용액(VS 3)에 1분간 침지하였으며, OPS loading vessel(Minitüb, Germany)에 수정란을 loading한 후 LN₂액에 바로 침지하였다. 동결 수정란은 액체 질소에서 최소한 2주 이상 보관한 후 융해하여 이식 실험에 사용하였다. 융해 방법은 급속법으로 2M EG 융해액에 각 난포란을 2분간 침지하고 다시 0.5M EG 융해액에 2분간 침지한 후 DPBS + 10% FBS 용액에 2.5분씩 2회 반복 처리하여 역순으로 평행한 다음 신선한 배양액으로 3~4회 세척하였다(Table 1). 융해 후 수정란을 NCSU-23 배지에서 6~8시간 배양한 후 이식에 사용하였다.

6. 수정란 이식

융해한 수정란을 OPS straw에 loading하여 potable incubator(Minitüb, Germany)에 담아 이식할 농장으로 운반하였다. 이때 straw당 수정란은 20~50개씩 담아 전체 배양액은 0.5 mL 정도의 소량이 되도록 조절하였다. 수정란의 외과적, 비외과적 이식은 Brüssow 등(2000)과 Dobrinsky 등(2000)의 방법을 응용하였다. 본 연구에 이용된 마리의 수란돈은 평택 소재의 양돈장에서 모두 임신 경험이 없는 미경산 종돈(White Yorkshire, 체중 90 ± 20 kg)으로 선별하였고, 1,000 IU PMSG로 발정동기화를 실시한 후 발정 4일째 되는 날 이식하였다. 외과적 이식에 사용된 2두는 이식용 보정틀에 고정하여 마취와 정

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

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

중선 복부절개로 자궁각을 찾아 CL을 확인하고 자궁각의 상단부에 주입침으로 구멍을 내어 3 ml 주사기에 연결한 straw를 이용하여 양쪽 자궁선단에 수정란을 이식하였다(Fig. 1). 비외과적 이식 3두는 기존 돼지 AI용 catheter에 150 cm 정도의 길이로 자체 제작한 polyurethane tubing(IMV technologies, France)을 연결하여 한쪽 자궁각에 수정란을 이식하였다. 이 때 tubing 내에 남은 배양액은 공기를 이용하여 완전히 주입하였고, 주입 후 catheter내 수정란의 잔존 여부를 검사하였다.

7. 임신 진단

이식한 후 임신 여부는 RE 법과 함께 간이 임신진단기(Me-dapar, USA)로 예비 측정한 다음 초음파임신진단기(model : SDL-32, Shimadzu, Japan)를 이용하여 최종 확인하였다. 임신 여부의 검사시간은 이식 후 2주부터 8주까지 확인하였다.

결 과

1. 외과적 이식

외과적으로 2두를 이식하였는데, Table 2에서 보는 바와 같

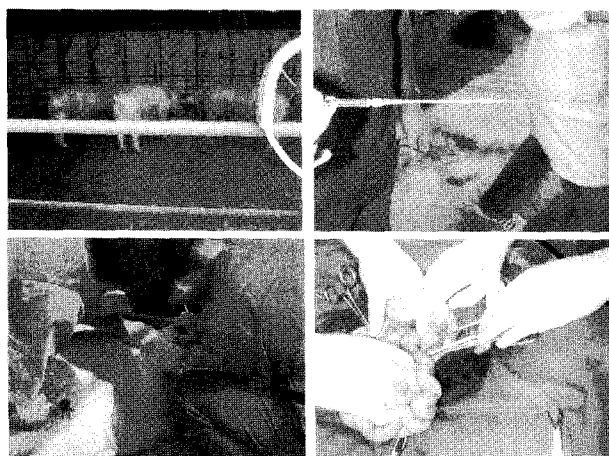


Fig. 1. Photographs of surgical embryo transfer: (clockwise from left top) gilt recipients, anesthesia, embryo loading into a straw, embryo transfer into the uterine horn.

이 동결-용해 수정란을 1두의 양측 자궁각에 55~60개를, 나머지 1두의 양측 자궁각에 60~65개를 각각 이식하였다. 수정란의 발생 단계는 compact morula 또는 배반포 단계의 수정란만을 골라 이식하였다. 수정란의 상태는 동결 수정란의 경우 fair/poor, 신선 수정란의 경우 excellent를 나타내었다. 이식 후 동결 수정란을 이식한 2두는 정상적인 임상조건을 보였다. 이식 결과 1두(25%)에서 임신 진단기에 의한 45명 임신 태아의 영상이 관찰되었으나 8주후 유산되었다. 초음파사진(Fig. 2)에서 6두 정도의 태아 영상이 관찰되었다. 다른 이식돈은 지연성 발정(delayed return)을 보였다.

2. 비외과적 이식

비외과적으로 3두를 이식하였으며, 3두 중 2두는 동결 수정란을 140개씩, 나머지는 대조군으로 신선 체외 수정란 40개를 각각 한쪽 자궁각에 이식하였다(Table 2). 수정란은 compact morula부터 배반포 단계의 수정란을 이식하였다. 수정란의 상태는 동결 수정란은 fair, 신선 수정란의 경우는 good을 나타내었다. 이식 후의 임상 조건을 보면 동결 수정란을 이식한 2두는 정상 상태를 보였지만, 신선 수정란을 이식한 대조군의 경우 경미한 endometritis 상태를 나타내었다. 이식 결과 모두

Table 2. Embryo transfers by surgical and non-surgical methods

No. *	Source of embryos	Embryo n	Embryos quality **	Pregnancy	Note
S-1	Frozen	55	EX/G	-	
	Frozen	60	F/P	-	
S-2	Frozen	60	EX/G	+	Aborted at 58 days
	Frozen	65	F/P	-	
NS-1	Frozen	140	F	-	
NS-2	Frozen	140	F	-	
NS-3 (Control)	Fresh	40	G	-	Mild endometritis

* S: surgical transfer, NS: non-surgical transfer.

** EX: excellent, F/P: fair/poor, G: good, F: fair.

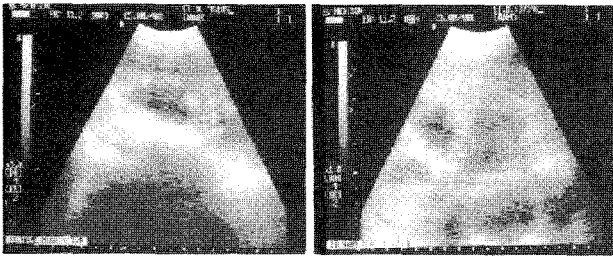


Fig. 2. Ultrasonogram of the porcine uterus in the longitudinal plane at 45 days pregnancy after surgical transfer: lateral (left) and ventral view (right).

자연성 발정을 보였다.

고 찰

동물의 수정란 동결은 유전자원 보존 및 활용이라는 차원에서 이점이 많아 소 이외에 생쥐, 토끼, 양 등 다른 실험 동물에서 많은 연구 성과가 이루어진 반면, 돼지의 경우는 다른 동물보다 동결에 대한 연구 성과가 부진하며 아직 미흡한데 그 이유는 수정란을 동결할 때 동해를 쉽게 받아 융해 시에 사멸되기 때문이다(김 등, 1998).

Vitrification은 저온에 예민한 돼지 수정란의 세포내에 빙결형성을 최소화하여 급속 동결하는 OPS 방법으로 동결한 후 융해처리한 수정란을 이식하여 자돈을 생산하는 새로운 기술로 알려져 있다(Vajta 등, 1997).

돼지의 수정란 이식은 외과적인 방법보다 비외과적인 이식 방법이 선호되고 있으나, 수태율이 낮은 것이 단점이다. 돼지 수정란의 비외과적 이식 방법은 정액의 주입 방법과 달라 수정란을 발정 증상 발현 후 5~6일에 자궁각 심부에 수정란을 주입해야만 수태가 가능하다. 각국에서 비외과적 수정란 이식 기를 고안하여 이식 효율을 높이고 있으나(Camano 등, 2003; Yonemura 등, 2003; Ducro-Steeverink 등, 2004), 아직까지 극대화할 만한 기구가 개발되지 못하고 있다. 최근 스페인에서 자체 개발한 이식 catheter로 donor에서 채취한 fresh embryo를 이식하여 70.8%의 높은 출산율을 보고하고 있어(Martinez 등, 2004) 수정란의 상태가 좋을 경우 수태율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 총 5두의 gilt recipient에 동결 또는 신선 체외 수정란을 이식하였다. 동결 수정란을 외과적 방법으로 2두, 비외과적 방법으로 2두에 이식하고 동결하지 않은 신선 수정란을 대조군으로 하여 1두에 이식한 결과, 외과적으로 이식한 1두(25%)에서 45일령 태아가 확인되었다. 본 실험을 수행하기 전에 수정란 준비와 야외 농장기술 방법은 연구팀이 1차 수행한 예비 실험의 방법과 거의 유사하게 수행하였다. 실험 결과(김 등, 2004)에서 체외 배양한 돼지수정란을 OPS

방법에 의한 동결한 후 융해하여 경산돈에 이식한 결과 수태가 성립되지 않았다. 즉 외과적 및 비외과적으로 이식한 6두의 경산돈 모두에서 지연성 발정(delayed return)을 나타내었는데, 불임 원인은 이식한 수란돈의 자궁 감염과 관리 부족에 의한 hernia 발생, 시술 미숙과 농장 수술에 의한 수정란 오염이라고 보고하였다. 비외과적 이식의 경우 난자의 이동과 수송도 중 좋지 않은 영향과 이식기 주입 미숙이 중요 원인으로 생각되었고, 이러한 결과는 적은 sample size에 원인이 있다고 보고 있지만 보다 숙련된 기술과 활력이 높은 수정란을 준비하여 청결한 자궁 상태인 gilt recipient의 적용을 요구하고 있었다.

지금까지 외과적인 방법과 비외과적 이식에 사용되는 체외 배양 동결 수정란의 적정 이식개수는 정해지지 않으나 수정란의 발육 상태, 수정 상태, 수란돈 상태 및 이식 방법 등 체외 요인에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있다. Berthelot 등(2000)이 unhatched blastocyst 상태의 수정란을 미경산돈으로부터 회수하여 dimethyl sulfoxide와 ethylene glycol 그리고 sucrose를 포함한 용액에 평형시킨 다음 OPS 방법으로 동결, 융해하여 11마리의 미경산 모돈에 400개의 배아를 이식한 결과 38마리의 자돈이 생산되었다. Dobrinsky 등(2000)은 돼지 체외 수정란의 유리화 동결시 cytochalasin B를 전처리함으로써 유리화 동결 융해 후에 7마리의 모돈 내에 224개의 배아를 이식하여 29 마리의 자돈을 생산하였다는 연구 결과를 발표하였으며, Beebe 등(2002)은 Kobayashi 등(1998) 방법에 따라 early blastocysts를 8 M ethylene glycol과 7% PVP를 포함한 동결액으로 처리한 후 OPS 방법으로 동결, 융해 후 4마리에 모돈에 147개의 배아를 이식한 결과 5마리의 자돈을 생산할 수 있었다. 또한, Misumi 등(2003)은 돼지의 배아를 morulae와 early blastocyst 상태에서 다른 전처리 없이 microdroplet 방법으로 동결 융해하여 5마리의 모돈 내에 171개의 배아를 이식한 결과 17마리의 자돈을 생산했다고 보고하였다. 최근 호주에서의 보고에 의하면 donor에서 직접 채취한 수정란을 유리화 동결로 OPS에 의한 외과이식을 한 결과 경산돈과 미경산돈 간에 유의차가 없었으며, 이식 수정란의 수는 gilt에 139개, sow에 161개를 각각 이식하여 35일 임신 감지에서 50~70%의 높은 임신을 보고하였다(Cameron 등, 2004; Berthelot 등, 2007). 이처럼 몇몇 국가에서 동결처리한 돼지 수정란을 수란돈에 이식하여 자돈을 성공적으로 분만한 보고가 있으나, 국내에서는 아직 이에 대한 연구보고가 없다.

본 실험에서 경산 수란돈 5(4)두 중 외과적으로 이식한 1두(25%)에서 6두 가량의 태아임신을 확인하였다. 동결하지 않은 체외 수정란을 이식한 대조돈 1두는 이식 후 5~6주에 자궁 내염증산물의 출현으로 보아 이식시 오염된 것으로 추측되었다. 또한, 외과적으로 이식하여 임신에 성공한 모돈을 태아임신에서 자연분만에 의한 자돈출산까지 유도하지 못한 아쉬움이 있었다. 그러나 금후 샘플수를 넓혀 기존 연구의 경험을

바탕으로 안정적인 체제 하에서 이식을 계속 수행한다면 수태 및 분만율을 한층 높일 수 있을 것으로 확신한다. 국내에서도 돼지 유전자원 보존을 'ice bank' 형태로 활용하여 차세대 생명공학의 연구 기반이 되는 ice gene bank의 구축에 도움이 될 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 OPS 방법에 의한 돼지 배양 동결 수정란의 경산돈 이식 연구(김 등, 2004)의 1차 예비 실험 보고에 이어 냉동 수정란으로부터 미경산 이식돈에 이식한 후 태아를 생산할 목적으로 실험하였다. 도축돈의 난소로부터 미성숙난포란을 채취하여 돼지 배양 수정란을 생산하고, 지방구 분리와 OPS에 의한 유리화 동결을 실시하였다.

1. 도축돈 난소로부터 채란된 돼지 미성숙란을 체외로 성숙-수정-배양하였다. 체외 배양액은 glucose-free NCSU 23을 이용하였으며, 2일째에 10% 소 혈청 알부민을 첨가하여 배반포 발달을 유도하였다.
2. 돼지 배양된 수정란은 7.5 $\mu\text{g/mL}$ cytochalasin B에 30분 처리한 후 13,000 rpm에 13분간 원심하고, EG 동결액에 의한 OPS 방법을 이용하여 동결·용해하였다.
3. 이식은 용해수정란을 plastic straw에 loading하여 55~65개씩 외과적으로 2두에, 140개씩 비외과적으로 2두에 그리고 1두의 대조군에 40개의 비동결란을 각각 이식하였다.
4. 임신 45일령에 외과 이식한 1두(25%)에서 임신이 확인되었으며 초음파 영상에서 6두 가량의 태아를 관찰할 수 있었고, 그 외의 이식돈은 지연성 발정에 의한 재발정을 보였다.
5. 야외이식에 의한 이동 시간을 줄이고 시설화된 장소에서 생존 효율이 높은 수정란을 준비하여 clean uterine 상태로 수정란을 이식하고 모돈을 건강하게 유지함으로써 불임 원인을 해소하여 임신 효율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구의 수행하기 위해 외과적 이식수술에 협조하여 주신 축산과학원 허태영 연구관께 감사를 드립니다.

참고문헌

Beebe FS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Higgins A and

- Nottle MB. 2002. Piglets born from vitrified zona-intact blastocysts. *Theriogenology* 57:2155-2165.
- Beebe FS, Cameron RDA, Blackshaw AW and Keates HL. 2005. Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer. *Theriogenology* 64: 879-890.
- Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C and Terqui M. 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 41:116-124.
- Berthelot F, Venturi E, Cognie J, Furstoss V and Martinat-Botte F. 2007. Development of OPS vitrified pig blastocysts: Effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. *Theriogenology* 68:178-185.
- Brüssow KP, Torner H, Kanitz W and Rátky J. 2000. *In vitro* technologies related to pig embryo transfer. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40:469-480.
- Caamano JN, Wu GM, McCauley TC, Rieke AR, Cantley TC, Mao J, Didion BA, Prather RS, Martinez EA and Day BN. 2003. Non-surgical embryo transfer in swine : preliminary results. *Theriogenology* 59:361, abstracts.
- Cameron RDA, Beebe LFS, Blackshaw AW and Keates HL. 2004. Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *Theriogenology* 61:1533-1543.
- Dobrinisky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 62:564-570.
- Dobrinisky JR. 2001. Cryopreservation of swine embryo : A chilly past with a vitrifying future. *Theriogenology* 56:1333-1344.
- Ducro-Steverink DWB, Peters CGW, Maters CC, Hazeleger W and Merks JWM. 2004. Reproduction results and offspring performance after non-surgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 62:522-531.
- Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M and Leibo SP. 1998. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology* 36:20-31.
- Martinez EA, Caamano JN, Gil MA, Rieke A, McCauley TC, Cantley TC, Vazquez JM, Roca J, Vazquez JL, Didion BA, Murphy CN, Prather RS and Day BN. 2004. Successful non-

- surgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 61:137-146.
- Misumi K, Suzuki M, Sato S and Saito N. 2003. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 8836:1-8.
- Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997. Vitrification of porcine embryos using open pulled straw method. *Acta. Vet. Scand.* 38:349-352.
- Yonemura I, Miyamoto K and Nishida M. 2003. Non-surgical transfer of porcine embryos. *Theriogenology* 59:378, abstracts.
- 김상근, 이명현, 남윤이. 1998. 돼지 수정란 및 미성숙난자의 동결융해 후의 생존율에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 22:187-194.
- 김인덕, 안미현, 허태영, 홍문표, 석호봉, 2004, Open Pulled Straw(OPS)방법에 의한 체외 배양 동결 수정란의 경산돈 이식: 예비실험 결과, *한국수정란이식학회지* 19:155-163.
- 안미현, 김인덕, 석호봉. 2004. 돼지배아의 유리화 동결 시 cytochalasin B의 농도와 처리시간에 의한 효과. *한국수정란이식학회지* 19:35-42.

(접수일: 2008. 9. 18 / 채택일: 2008. 9. 25)