

배양 조건에 따른 한우 수정란의 발달과 초자화 동결 후 수정란의 생존성 비교

조상래*, 최선호, 최창용, 손준규, 이풍연, 고응규, 김현중, 연성흠, 손동수
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

Effect of Culture Condition on Hanwoo Embryonic Developments and Their Survival after Vitrification

Sang-Rae Cho*, Sun-Ho Choi, Changyong Choe, Jun-Kyu Son, Poongyeon Lee, Yeoung-Kyu Ko, Hyun-Jong Kim, Sung-Heum Yeon and Dong-Soo Son

Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

ABSTRACT

We investigated the cleavage rate and blastocyst yield for each culture condition to enhance tolerance of cryo-preservation of bovine IVF embryo with relatively lower cryo-tolerance compared to *in vivo* embryo. The cleavage rate and blastocysts yield for CR1aa, IVMD, IVD, CR1aa+10% FBS were 73.2, 69.3, 72.8, 68.5% and 44.1, 30.8, 33.3, 48.0%, respectively. The values did not differ among each treatments without serum. For embryo vitrification, *In vivo* and *In vitro* blastocysts were exposed to VS1 (10% glycerin, 0.1 M glucose, 0.1 M sucrose, PEG 1%) for 5 min, and VS2 (10% glycerin, 10% EG, 0.2 M glucose, 0.2 M sucrose, PEG 2%) for 5 min and then VS3 (10% glycerin, 30% EG, 0.3 M glucose, 0.3 M sucrose, PEG 3%) for 1 min. The exposed embryos were then loaded into the 0.25 ml plastic straws and then plunged into liquid nitrogen. The straws were held for period of 1 to 2 weeks before thawing. In embryo viability, no differences in blastocyst re-expansion rates were found between *in vivo* and *in vitro* embryos. whereas expansion-BL rates was significantly higher for *in vivo*-derived embryos (72.7%) when compared to *in vitro*-derived embryos (51.4%), respectively ($P < 0.05$). In conclusion, our results indicate that combined use of CR1aa culture medium with vitrification might enhance tolerance of cryopreservation for bovine IVF embryo production.

(Key words : bovine, embryos, *in vitro*, *in vivo*, cryopreservation)

서 론

최근 국내에서 수정란의 동결 보존은 한우 품종 개량으로 지역 브랜드 사업을 위주로 활발하게 연구가 진행되고 있으며, 국제 생물다양성 협약을 통해서 제시되고 있는 기후 변화에 따른 지구의 식생 변화와 각국의 재래가축 또는 희귀 품종의 보존으로 유전 자원 확보를 위해서 그 이용 측면이 확대되고 있다. 현재 수정란의 동결 용해 후 생존 효율에 따른 연구 결과는 상대적인 결과로 나타나고 있으며, 특히 가축의 난자 동결에서는 저온 충격의 감수성이 높기 때문에 더욱더 향상된 동결 기술이 요구되기도 한다(Chen 등, 1988; Yang 등, 1998). 또한, 동결 수정란에서는 세포 내의 빙정 형성으로 인한 세포의 미세소기관의 손상으로 비정상적인 활동(Gook 등, 1993; Baka 등, 1995)을 비롯한 물리적 손상을 쉽게 받을 수 있다. 이러한 손상을 최소화하기 위하여 수정란의 동결 방법에 따른 생존성 향상을 위해 연구자들은 동결

보호제의 특성과 삼투압 그리고 pH 변화와 같은 직접적인 원인에 대해서 연구를 수행하고 있다(Damien 등, 1990; Hunter 등, 1991, 1995). 수정란의 동결 보존 방법은 완만 동결(conventional freezing)과 초자화 동결(vitrification) 방법을 이용하고 있다(Fahning 등, 1992; Pereira 등, 2002). 수정란 동결은 동결 보호제의 종류와 분자량 크기에 대한 침투성 유·무에 따라 동결 방법의 선택이 가능하다(Rall 등, 1992; Wurth 등, 1994; Sommerfield and Massip, 1995). 완만 동결 방법에서는 주로 ethylene glycol의 동결 보호제를 가장 많이 소 수정란 동결에 사용되고 있다. 그 이유는 다른 동결 보호제와 비교했을 때 유해 성분 함유량이 낮기 때문이며, 수정란을 용해 후 바로 수란우에 이식이 가능하기 때문이다(Suzuki 등, 1993; Szell 등, 1989), 초자화 동결 보존은 1980년 중반 conventional freezing 기술을 대신하여 Rall과 Fahy(1985)에 의해서 소개되었으며, 동결 수정란이식으로 산자 생산 보고는

* Correspondence : E-mail : chosr@korea.kr

1973년(Wilmot와 Rowson)에 처음으로 보고된 이후 체내·외 수정란을 이용한 동결 보존 방법은 괄목하게 발전을 거듭하였다(Niemann, 1991; Fahning and Garcia, 1992). 특히 수정란의 초자화 동결은 용해 후 냉각 온도(Wolfe와 Bryant, 2001), 용액의 점성과 샘플의 양(Arav 등, 2002) 등이 용해 후 생존성을 결정하는 중대한 영향을 미치는 요소들이다. 초자화 동결 후 생존을 강화를 위해 많은 연구자들(Martino 등, 1996; Vajta 등, 1998; Lane 등, 1999; Cho 등, 2002; Misumi 등, 2003; Cremades 등, 2004; Kuwayama 등, 2005)은 난자와 수정란의 동결 시 다양한 기구들을 활용하여 연구를 진행하기도 하였다. 이러한 기구들을 사용하는 초자화 동결은 액체 질소와 접촉하는 면에서, 보다 적은 동결 보호제의 양에 수정란을 장진하여 유리 상태에 도달하기 위해서 보다 큰 냉각 효율을 얻기 위해서 사용한다(Rios 등, 2010). 따라서 본 연구에서는 체외수정란의 내동성에 영향을 미치는 배양 조건에 따른 발달율과 수정란의 동결에 따른 생존성 조사로 유전 자원으로 수정란의 효과적인 보존 효율을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

한우 도축 암소로부터 적출된 난소를 회수하여 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다. 본 실험의 조건에 맞춘 난소 수송 온도는 0.9% 생리식염수의 온도를 25°C 이상의 조건으로 맞추어 보온병에 담아 실험실로 2시간 이내로 운반하였다. 직경이 2~6 mm의 난포로부터 난포액을 난포액과 함께 19 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡입 방법으로 난포세포를 채취하였으며, 체외성숙을 위한 난포세포는 1, 2등급(IETS 기준)만을 사용하였다. 체외성숙은 TCM199(Sigma, U.S.A)를 기본 배양액으로 5% fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A), 10 µg/ml LH(Sigma, U.S.A) 및 35 µg/ml FSH(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 22시간 동안 실시하였다.

2. 체외수정

체외수정에 사용된 정액은 한우동결정액(KPN)을 이용하였으며, 정자분리는 BO medium을 이용하여 1,800 rpm에서 5분 동안 2회 원심분리 후 체외수정용 배양액에서 1회 원심 분리하여 체외수정에 사용하였다. 사용된 정액의 최종 농도는 2×10^6 /ml이었다. 체외성숙된 난포란의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 0.1% PVA(polyvinyl alcohol)가 첨가된 D-PBS(Sigma) 배양액에서 약 10초간 vortexing 후 수정 배양액인 50 µl IVF 100(IFP, Japan) 미소적에 약 20개의 체외성숙된 난포란과 정자를 공동배양하여 수정을 유도하였다.

3. 수정란의 체외배양

체외배양에 사용된 수정란은 체외수정 후 무혈청 배양액인 IVMD(IFP, Japan) 배양액은 난구세포와 공동 배양을 실시하여 배양하였으며, CR1aa는 배양액에 0.3% bovine serum albumin(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 7, 8, 9일까지 배양하였다. 배양액 교환은 2일째, 4일째, 6일째 3회 실시하였다. 수정란 배양 조건은 38.5°C 온도에서 5% CO₂, 5% O₂ 그리고 90% 질소가 포함된 배양 조건에서 수정란을 배양하였다. 분할율은 체외수정 후 48시간에 확인하였으며, 3일과 5일째 신선한 배양액으로 배양액 교환을 하였으며, 수정란은 수정 후 7일과 8일째 생산된 배반포 수정란을 실험에 공시하였다.

4. 체내수정란 생산

체내수정란 생산을 위해서 한우 공란우의 처리는 발정발현과 무관하게 progesterone releasing intravaginal device인 CIDR (CIDR-plus, InterAg, New Zealand)를 질내에 삽입하고, CIDR 삽입 7~8일째부터 FSH(Antorin R-10[®], Kawasaki, Japan) 28 AU를 감량법으로 12시간 간격으로 4일간 나누어서 근육 주사를 실시하였으며, FSH 투여량은 5회째에 PGF_{2a} 제제인 Lutalyse[®](Belgium)를 25 mg, 6회째에 15 mg을 근육 주사하였고 CIDR를 제거하였다. 발정 징후를 나타내는 공란우는 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시하였다, 인공수정 후 7일째 비외과적인 방법으로 수정란을 채란하여 수정란 동결 실험에 공시하였다.

5. 수정란의 초자화 동결 보존

수정란 초자화 동결은 VS1(10% glycerin, 0.1 M glucose, 0.1 M sucrose, poly ethylene glycol(PEG) 1%)에서 5분간 처리 후, VS2(10% glycerin, 10% EG, 0.2 M glucose, 0.2 M sucrose, PEG 2%)에서 5분, VS3(10% glycerin, 30% EG, 0.3 M glucose, 0.3 M sucrose, PEG 3%) 1분간 침지 후 0.25 ml 스트로우에 장착 후 액체 질소 위에서 10초간 냉각 후 액체 질소에 침지하여 보관하였다. 관은 최소 2주간 이상 보관을 실시하였다. 수정란 용해 후 생존을 확인을 위한 수정란 용해는 스트로우를 보관고에서 꺼내어 공기 중에 약 10초간 노출시킨 후 37°C로 가온된 온수에서 약 20초간 용해한 다음, HEPES-Buffer 배양액에 0.13 M sucrose 첨가 배양액에서 5분간, 0.075 M sucrose에서 10분 동안 처리 후 체외배양액으로 옮겨 1회 세척한 다음 배양 48시간과 72시간에 수정란의 재확장 및 부화 여부로 생존성을 판단하였다.

6. 통계처리

수정란의 동결 후 체내 및 체외 수정란의 생존을 조사에 대한 결과 비교는 Chi-square Test 방법을 이용하여 유의성 검정 ($P < 0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

Table 1은 도축 난소를 이용한 체외배양 실험을 실시한 결과이다. 체외배양시 38.5°C 온도에서 5% CO₂ 조건과 습도가 최적화된 조건에서 난포란을 체외수정 시킨 후 체외배양을 실시하였을 때 수정란의 분할율과 수정란의 배반포 생산 효율을 조사하였다. CR1aa 배양액에서 배양한 난포란의 분할율은 73.2% 그리고 IVMD 배양액에서는 69.3%의 결과를 보였으며, IVD 배양액에서는 수정율은 72.8% 분할율을 보였다. 그러나 배양액 간의 수정란의 분할율은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 배반포 발생에 있어서는 CR1aa 배양액에서는 44.1%, IVMD 배양액에서는 30.8%, IVD 배양액에서는 33.3%의 결과를 나타내었다. 분할율과 마찬가지로 처리군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, CR1aa 배양액에서 다른 두 처리군보다 발달율이 다소 높은 경향을 보였다. Aoyagi 등(1999)은 복제수정란의 체외 발달에 사용된 IVMD 배양액은 성장인자(Transforming Growth Factor- α , Insulin)와 항산화제(Taurine, Selenium, Apotransferrin)를 포함하고 있으며, IVD 배양액은 낮은 농도의 glucose, lactate, 성장 인자 그리고 항산화제와 관련된 성분들을 포함하고 있어 수정란의 배반포 발생을 향상시켰다고 보고하였다. CR1aa 배양액에 10% FBS를 첨가한 후 수정란의 체외발달율은 48% 결과를 나타내었다. Aoyagi 등(1999)도 이와 유사한 실험 결과에서 CR1aa+5% CS를 첨가하였을 때 핵이식의 분할율은 80.9%였으며, 배반포 발달율은 23.4%로서 IVMD와 IVD 배양액에서 생산된 배반포 수정란과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 본 연구의 결과와 유사한 경향을 보였다.

최근에는 체외수정란 생산 기술이 향상되어 서로 다른 배양 조건하에서 다양한 배양액 조성을 통해서 성공적인 효과를 거두는 것으로 보고하고 있다(Gray 등, 1992). 체외수정란의 안정적인 생산 시스템은 유전자원의 활용성 제고를 위해서 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이며, 특히 수정란 이식을 위해서는 우수한 유전력을 지닌 개체 확보하여 생체내 난

Table 1. Effect of different culture medium on bovine oocytes fertilization and subsequent embryo development

Medium	No. of used embryos	No. of embryos (%)	
		Cleavage	Blastocysts
CR1aa	254	186(73.2)	82(44.1)
IVMD	266	224(69.3)	69(30.8)
IVD	276	201(72.8)	67(33.3)
CR1aa+10%FBS	368	252(68.5)	121(48.0)

Replicates 8.

자 채취(ovum pick up)후 체외수정란을 생산하기 위해서도 배양 체계에 대한 연구는 지속적으로 연구가 수행되어야 할 것이다.

Table 2의 실험에서는 체내·외 수정란을 초자화 동결 후에 용해하였을 때 생존성을 조사한 결과로서 체내수정란의 생존성 확인은 동결 후 약 20분후에 수정란이 형태적으로 배반포 단계의 수정란으로 재형성되는 비율은 91.7%의 결과를 나타내었으며, 수정란이식이 가능한 확장 배반포 단계까지 발달한 비율은 72.7%의 결과를 나타내었다. 그러나 체외수정란의 경우 재확장된 수정란은 82.2%, 확장배반포배까지의 발달율은 51.4%로서 체내수정란이 유의적으로($P<0.05$) 높은 배반포 발달율을 나타내었다. 이와 같이 수정란의 생존율을 향상시킬 수 있었던 것은 수정란 동결생리화학적 특성을 잘 이해하고 질 좋은 수정란 선별이 잘 이루어졌던 것으로 예측 가능하다(Niemann, 1991; Rall, 1992; Leibo and Loskutoff, 1993; Massip 등, 1995). 한편, Iwasaki 등(1994)에 의하면 소 수정란의 동결에 대한 손상은 내부 세포피와 영양막 세포의 대부분이 손상을 받았기 때문이라고 보고하기도 하였다. 특히 체외수정란의 경우는 수정란의 발달 단계와 선별과 수정란의 특성, 동결 보호제의 유독한 성분 그리고 동결 온도 및 냉각 속도를 비롯한 동결의 전반적인 기술과도 연관이 있는 것으로 보인다. 다양한 방법으로 생산된 체외 수정란의 생존성을 향상시키기 위해서는 배양액의 조성의 변화와 보다 향상된 배양체계 그리고 동결에 방법을 지속적으로 개선시켜 나갈 때 동결 수정란의 생존성은 향상될 수 있을 것이다(Semple 등, 1995).

Rizos 등(2002)은 수정란의 동결 용해 후 생존성의 향상에 기인하는 원인으로서는 가장 중요한 것은 수정란의 질적인 부분이며, 질 좋은 수정란은 동결 용해 후의 생존성 향상으로 수란우에 이식하였을 때 착상율에 중요한 영향을 줄 수 있으므로 적절한 배양액의 선택과 배양 체계를 확립하여야 할 것이다.

결 론

한우 수정란의 생산과 동결 기술의 응용은 산업적 측면뿐만

Table 2. *In vitro* survival rates of bovine embryos vitrification frozen with different embryo sources

Embryo	No. of used embryos	No. of embryos (%)	
		Re-expansion	Expansion-BL
<i>In vivo</i>	12	11(91.7)	8(72.7) ^a
<i>In vitro</i>	45	37(82.2)	19(51.4) ^b

Values within lines that do not have a common letter differ using the ANOVA test($P<0.05$).

Replicates 4.

아니라 기초 연구를 위한 샘플의 채취에 따른 보존과 우수한 품종의 개체를 확보하고 보존함으로써 국가적 이용효율을 극대화 시킬 수 있는 기술력이다. 본 연구에서는 체내수정란보다 상대적으로 내동성이 떨어지는 체외수정란의 동결성을 향상시키기 위하여 수정란의 배양 조건에 따른 분할율과 배반포 발생율을 조사하였다. 각 처리군으로 나누어 실험한 결과는 혈청이 첨가되지 않은 배양액에서는 세가지 처리구인 CR1aa, IVMD, IVD 배양액에서 분할율은 각각 73.2%, 69.3% 그리고 72.8%의 결과를 보였으며, 배반포 발달율은 CR1aa, IVMD, IVD 배양액에서 44.1%, 30.8% 그리고 33.3%의 결과로서 분할율과 배반포 발생율 모두 CR1aa 배양액에서 상대적으로 높은 분할율과 배반포 발달율을 보였다. 혈청이 10% 첨가된 CR1aa 배양액에서의 배반포 발달율도 세가지 처리군과 비교했을 때 유의적인 차이를 보이지 않아 체외배양 시 혈청을 첨가하지 않는 것이 체외수정란 동결을 위해서는 효과적일 것으로 보인다. 그리고 체내 및 체외수정란의 초자화 방법으로 동결성 조사를 실시한 결과, 용해 후 수정란의 재형성 비율은 체내수정란 91.7%, 체외수정란은 82.2%의 생존율을 보였으며, 확장 배반포까지 발달율은 72.7%와 51.4%로서 체내수정란이 유의적으로($P<0.05$) 높은 결과를 보였다. 이러한 결과를 볼 때 체외수정란 생산을 위해서는 CR1aa 배양액 선정과 초자화 동결 방법으로 동결하였을 때 동결성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aoyagi K, ITO H, Saitou M, Kanauchi T, Kobayashi M and Hoshi H. 1999. *In vitro* development and production of Offspring from bovine nuclear transfer embryo cultured in aserum- free medium. J. Reprod. Dev. 45:129-134.
- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I and Gacitua H. 2002. Newtrends in gamete's cryopreservation. Mol. Cell. Endocrinol. 187:77-81.
- Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones Jr HW, Muasher SJ and Lanzendorf SE. 1995. Evaluation of the spindle apparatus of *in-vitro* matured human oocytes following cryopreservation. Hum. Reprod. 10:1816-1820.
- Chen C. 1988. Pregnancies after human oocyte cryopreservation. Ann. NY Acad. Sci. 541-549.
- Cho SK, Cho SG, Bae IH, Park CS and Kong IK. 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). Anim. Reprod. Sci. 73: 151-158.
- Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira da Silva J and Barros A. 2004. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. Hum. Reprod. 19: 300-305.
- Damien M, Luciano AA and Peluso JJ. 1990. Propanediol alters intracellular pH and developmental potential of mouse zygotes independently of volume change. Hum. Reprod. 5: 212-216.
- Fahning ML and Garcia MA. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. Cryobiology 29:1-18.
- Gook DA, Osborn SM and Johnston WI. 1993. Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol. Hum. Reprod. 10:654-658.
- Gray CW, Morgan PM and Kane MT. 1992. Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. J. Reprod. Fertil. 94: 471-480.
- Hunter JE, Bernard A, Fuller B, Amso N and Shaw RW. 1991. Fertilization and development of the human oocyte following exposure to cryoprotectants, low temperatures and cryopreservation: A comparison of two techniques. Hum. Reprod. 6:1460-1465.
- Hunter JE, Fuller BJ, Bernard A, Jackson A and Shaw RW. 1995. Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants; initial studies on fertilization and embryonic development. Hum. Reprod. 10:1184-1188.
- Iwasaki S, Yoshikane Y, Li X, Watanabe S. and Nakahara T. 1994. Effects of freezing of bovine preimplantation embryos derived from oocytes fertilized *in vitro* on survival of their inner cell mass cells. Mole. Reprod. and Develop. 37:272-275.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S and Kato O. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Reprod. Biomed. 11:608-614.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK and Phil D. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. Fertil. Steril. 72:1073-1078.
- Leibo SP, Martino A, Kobayashi S and Pollard JW. 1996. stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. Anim. Reprod. Sci. 42:45-53.
- Leibo SP, Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. Theriogenology 39:81-94.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Developmental into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod. 54:1059-1069.

- Massip A, Mermillod P and Dhmyes A. 1995. Morphology and biochemistry of *in-vitro* produced bovine : Implications for their cryopreservation. *Human Reproduction* 10:3004-3011.
- 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* 60:253-60.
- Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124.
- Pereira PV, Dayan A, Watanabe MR, Avila FM, Marchizeli JC, Accorsi MF and Watanabe YF. 2002. Pregnancy rate following transfer of cryopreservation *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 57:475.
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.* 28:237-245.
- Rall, WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575.
- Rios GL, Mucci NC, Kaiser GG and Alberio RH. 2010. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos. *Animal Reprod. Sci.* 118: 19-24.
- Rizos D, Lonergan P, Ward F, Papadopoulos S and Boland MP. 2002. Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 62:320-327.
- Semple ME, Betteridge KJ and Leibo SP. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. *Theriogenology* 43:320.
- Sommerfeld V and Niemann H. 1999. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38:95-105.
- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H and Ooe M. 1993. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology* 40:651-659.
- Sz ell A, Shelton JN and Sz ell K. 1989. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* 26(3):297-301.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callensen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51:53-58.
- Wilmot I, Rowson LEA. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92, 686-690.
- Wolfe J, Bryant G. 2001. Cellular cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects. *Int. J. Refrig.* 24, 438-450.
- Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF and Kruip TAM. 1994. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology* 42:1275-1284.
- Yang DS, Dhlohm PL, Winslow L and Cramer L. 1998. A twin pregnancy after microinjection of human cryopreserved oocyte with a specially developed oocyte cryopreservation regime. *Fertil. Steril.* 70:S239.

(접수: 2010. 8. 19 / 심사: 2010. 8. 20 / 채택: 2010. 8. 27)