

# 돼지 난자용 유리화동결 기구의 고안 및 생존율 분석

황인설<sup>1,2</sup>, 박미령<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통과, <sup>2</sup>컬럼비아대학교 의과대학

## Development of vitrification device and analysis of survival rate

In-Sul Hwang<sup>1,2</sup>, Mi-Ryung Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA

<sup>2</sup>Columbia Center for Translational Immunology, Columbia University Irving Medical Center, Columbia University

**요약** 본 연구에서는 돼지 난자용 유리화동결 기구를 고안하고 그 생존율을 분석하고자 하였다. 일반적인 실험실에 구비되어 있는 연구 기자재인 nylon mesh와 inoculation loop를 활용하여 유리화동결용 기구를 제작하였고, 체외성숙 돼지 난자를 이용하여 유리화동결 과정을 진행하였다. 그 결과, 40과 50 $\mu$ m의 nylon mesh를 사용하여 유리화동결 과정을 진행하였을 때 각각 71.7과 75.5%의 생존율을 보였으며, 이미 상용화된 동결기구인 Cryotop의 생존율 71.7%와 유사한 결과를 획득하였다. 하지만, 30, 60, 70 $\mu$ m의 nylon mesh를 사용한 경우, 각각 58.3, 65.0, 56.7%의 생존율로 Cryotop과 비교하여 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 감소되는 결과를 보였으며, 유리화동결과정 중 발생하는 동결상해로 인한 것으로 사료되었다. 또한 본 연구에서 제작된 nylon mesh 동결기구를 사용할 경우, 유리화동결과정 중 동결액 부피의 최소화를 용이하게 할 수 있었다. 결론적으로, 본 연구에서 고안된 간이 동결기구를 사용할 시 기존의 상용 기구인 Cryotop과 비교하여 유리화동결의 과정이 간소화된 것은 물론 다량의 난자를 일시에 처리할 수 있었다. 특히 40과 50 $\mu$ m의 nylon mesh 동결기구를 사용할 경우 높은 생존율을 확보할 수 있고, 이를 활용하여 다량의 난자를 처리해야 하는 가축이나 동물의 유전자원 보존에 있어 활용성이 매우 높을 것으로 사료된다.

**Abstract** This study endeavored to develop a vitrification device and examine the survival rates of pig oocytes following vitrification and warming. General lab equipment, such as nylon mesh and inoculation loop, were used to develop the vitrification device. The survival rate was examined using in vitro matured pig oocytes. Our results reveal that 40 and 50  $\mu$ m nylon mesh showed significantly ( $P < 0.05$ ) higher survival rates (71.7 and 75.5%, respectively) compared to other mesh sizes of 30, 60, and 70  $\mu$ m (58.3, 65.0, and 56.7%, respectively), and were comparable to survival obtained with Cryotop (71.7%). Cryoinjuries by dislocation of oocytes (with 60 and 70  $\mu$ m mesh) and higher volume of vitrification solution (30  $\mu$ m) resulted in reduced survival rates. However, the oocytes could be safely located and excessive vitrification solution could be removed easily in the 40 and 50  $\mu$ m groups. In conclusion, we confirm that 40 and 50  $\mu$ m of nylon mesh is very useful for preserving a high amount of pig oocytes with survival rates comparable to a commercialized vitrification device.

**Keywords** : Pig, Oocyte, Vitrification, Nylon Mesh, Device

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ01335401)의 지원에 이루어진 것임

\*Corresponding Author : Mi-Ryung Park(National Institute of Animal Science)

email: mrpark45@korea.kr

Received May 31, 2022

Revised July 5, 2022

Accepted July 7, 2022

Published July 31, 2022

## 1. 서론

생식세포의 동결보존은 농업, 생물 및 의학 관련연구의 중요 분야로, 유전자원의 영구보존 및 활용을 가능하게 하는 기술 분야이다. 특히 난자의 동결보존은 유전자원의 보존뿐만 아니라 의학적으로 활용 가능한 보조생식기술의 한 분야이다. 난자의 동결보존을 위해서는 완만동결[1] 방법과 초고속 동결[2] 방법이 활용 가능하며 초고속 동결방법은 유리화동결 방법으로 불리고 있다. 최근, 동결상해를 최소화 할 수 있는 유리화동결 방법이 많이 적용되고 있으며, 돼지[3], 소[4], 쥐[5] 그리고 사람[6] 등에서 많은 보고가 되고 있다. 하지만, 체외성숙 돼지 난자의 경우, 사람, 소, 설치류 등의 난자에 비해 동결상해에 대한 민감도가 높기 때문에 냉동 보존이 매우 어렵다고 알려져 있다[7,8].

유리화동결[2] 방법은 기존의 완만 동결[1] 방법을 대체하기 위해 개발 되었으며, 고농도 동결보호제의 첨가로 얼음결정의 생성을 억제하여 난자나 배아의 동결효율을 극대화 한 방법이다. 또한, 유리화동결 중 액체질소에 침지되기 직전 동결액의 부피를 최소화함으로써 하강 온도를 극대화하고 얼음결정의 형성을 최소화 할 수 있다[9]. 난자나 배아 유리화동결의 효율을 극대화하기 위해 Cryotop, Cryoloop, EM-Grid, Cryoleaf 등 여러 종류의 기구가 개발되어 활용되고 있지만 상용화된 기구의 경우 고가에 판매되고 있어, 가축의 연구에는 경제적으로 부적합한 실정이다[10,11]. 또한, 이러한 동결 기구들은 다량의 난자를 일시에 처리하기에는 많은 무리가 따르며, 원활하고 효율적인 사용을 위해서는 고도로 숙련된 기술을 필요로 한다[9].

따라서, 본 연구에서는 실험실에 존재하는 기본적인 연구 기자재를 활용하여 간단하고 경제적으로 제작할 수 있는 유리화동결용 기구를 고안하고 그 효과를 분석하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 체외성숙 난자 생산

#### 2.1.1 미성숙 난자의 채취

특별히 명시하지 않을 경우 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich Chemicals(Louis, MO, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 돼지 난소의 수급은 인근(김제, 목우촌) 도축장을 통해 이루어 졌으며, 당일 채취 난

소를 30~35°C의 0.9% 생리식염수에 넣어 실험실로 반입하여 사용하였다. 미성숙 난자의 채취를 위해 3회 세척한 난소의 직경 3-6mm의 난포로부터 18호 주사바늘이 부착된 일회용 주사기를 이용해 난포액 및 함유물을 흡입 채취하였다. 채취한 난포액 및 함유물은 실제 현미경 하에서 난구세포 및 세포질이 균질한 cumulus-oocyte complex (COC)를 선별하였으며, 0.1% polyvinyl alcohol(PVA, w/v)이 첨가된 TL-Hepes buffer에 3회 세척 후 체외성숙 배양을 실시하였다.

#### 2.1.2 미성숙 난자의 체외성숙

체외성숙에 사용된 배양액의 조성은 0.1% PVA, 3.05mM D-glucose, 0.91mM sodium pyruvate, 0.57mM cysteine, 0.5µg/ml Leuteinizing hormone (LH), 0.5µg/ml Follicle stimulating hormone (FSH), 75µg/ml penicillin G 및 50µg/ml streptomycin이 첨가된 tissue culture medium-199 (TCM-199)을 사용하였다. 체외성숙 배양은 4-well dish를 이용하여 well당 50-70개의 난자를 40-42시간 동안 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 실시하였다. 제1 극체의 확인을 위해 체외성숙이 완료된 COC를 0.1% PVA 및 0.1% hyaluronidase가 포함된 Phosphate buffered saline (PBS)에 5분간 처리하고 부드럽게 pipetting 하여 난구세포를 제거하였고, 실제현미경 하에서 제1 극체가 방출된 것을 확인하고 방출이 완료된 성숙난자를 시험에 공시하였다.

### 2.2 유리화동결 및 융해

#### 2.2.1 동결액의 제조 및 조성

유리화동결에 사용되는 용액의 제조는 황[8,12] 등의 방법을 사용하였으며 1회 제작 후 최대 1개월간 냉동 보관하여 사용하였다. Equilibration solution(ES)의 준비는 TCM-199에 각 7.5%의 ethylene glycol (EG)과 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 혼합하여 준비하였고, vitrification solution(VS)의 준비는 1.25M 농도의 sucrose를 녹인 TCM-199에 각 15%의 EG와 DMSO를 혼합하여 준비하였다. 융해에 사용되는 용액의 준비는 1M 농도의 sucrose + TCM-199 용액을 이용하여 0.5, 0.25, 0M 농도의 융해액을 준비하였고, 유리화동결 과정에서 난자의 전평형을 위해 사용되는 pre-equilibration solution (PES)은 TCM-199에 5%의 fetal bovine serum (FBS)을 첨가하여 준비하였다. 융해 후 난자의

회복배양을 위한 recovery medium의 준비는 TCM-199에 5% FBS, sodium pyruvate, gentamycin을 첨가하여 사용하였다.

### 2.2.2 유리화동결 및 용해

유리화동결의 과정은 체외성숙이 완료된 난자를 PES 용액에 침지한 후 5분간 정치하여 전 평형 처리를 하였고, ES에서 3분, 그리고 VS에서 1분간 정치하여 최종적으로 난자 내 수분을 제거하는 작업을 수행하였다. VS에서 처리되는 1분 동안 난자는 본 연구에서 제작 된 기구 및 Cryotop에 안착되고 VS의 혼입을 최소화하여 액체 질소에 침지될 수 있도록 실험을 진행하였다. 전체적인 과정은  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 실온에서 진행하였다. 난자의 용해 과정은 액체질소에 최소 1주일간 보관된 난자가  $37^{\circ}\text{C}$ 로 유지되어있는 1M sucrose + TCM-199 용액에 담겨지면서 시작되었다. 1분 이내에 모든 난자를 0.5M 용액으로 옮기고 0.5, 0.25, 0M sucrose 용액으로 옮기면서 각 3, 5, 5분간 처리하여 난자 내 동결보호제를 제거하고 수분을 재유입 시키는 과정을 진행하였다. 용해과정이 완료된 난자는 1-2시간 동안의 회복배양을 실시한 후 분석시험에 공시하였다.

### 2.2.3 용해 후 생존율 분석

용해 후 난자의 생존은 이전에 보고된 연구를 기반으로 평가되었다[8]. 실제현미경 하에서 숙련된 연구자의 육안을 통해 형태학적 변화를 관찰함으로써 용해 후 난자의 생존을 평가 하였으며, 투명대의 이상 유무, 세포막의 이상 유무 그리고 세포질의 이상 유무를 평가하여 생과사를 구분하였다.

## 2.3 동결기구의 제작

### 2.3.1 동결기구의 고안

Nylon mesh를 이용한 유리화 동결용 기구 CryoMesh를 고안하였으며, Fig. 1-(a)과 같이 2mm의 헤드 크기를 기본으로 하여 Nylon mesh를 장착하여 난자나 수정란이 잘 안착 되도록 설계하였다. Fig. 1-(b)과 같이 정자의 동결에 사용되는 스트로우와 유사한 형태를 커버로 활용하여 난자가 동결 및 용해 과정에서 상온에 노출되는 위험을 줄이는 형태로 설계하였다. CryoMesh의 전체적인 형태는 Fig. 1-(c)과 같다.

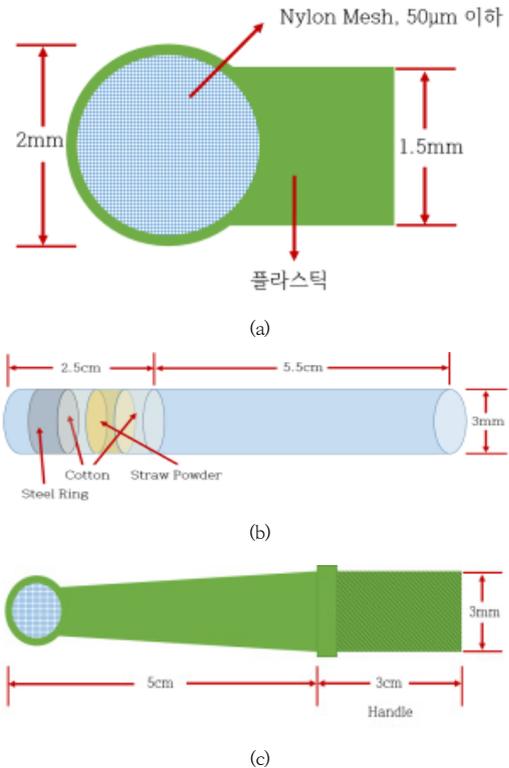


Fig. 1. Vitrification device (c) was designed with head part (a) and cover straw (b).

### 2.3.2 간이 동결기구의 제작

본 연구에서 고안된 동결기구의 효율성을 분석하기 위해 간이 동결기구를 제작하였다. 일반적인 실험실에서 쉽게 구할 수 있는 Inoculation loop과 cell strainer의 nylon mesh를 활용하였다. 먼저, Inoculation loop의 끝부분에 nylon mesh를 무독성 접착제를 사용하여 접착시킨 후 난자의 유리화 동결 및 용해에 활용하였다. 난자에 적합한 nylon mesh pore 크기를 결정하기 위해 30-70µm 사이의 mesh를 사용하여 간이 동결기구를 제작하였다. 시중에서 구입하여 사용할 수 있는 유리화동결 기구인 Cryotop을 사용하여 동결 및 용해 후 분석을 하고자 하였다.

## 2.4 통계처리

생존율 결과는 Origin 8 소프트웨어 (OriginLab corporation, Northampton, MA, USA)에 의해 분석되었으며, 일방향 분산분석을 적용하여 분석하였다.  $p < 0.05$ 의 값은 유의한 것으로 간주되었다.

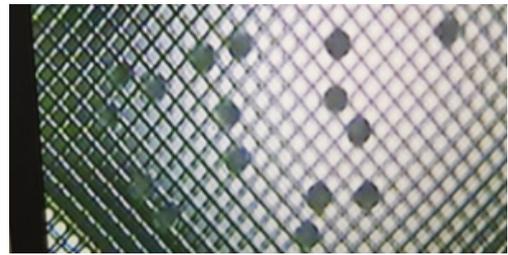


Fig. 2. Temporal vitrification device was produced with nylon mesh and inoculation loop.

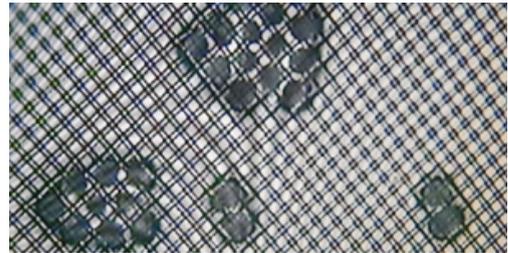
### 3. 결과 및 고찰

간이 동결기구를 이용하여 유리화동결 난자의 생존율을 분석하기 위해 Fig. 2와 같이 inoculation loop와 nylon mesh를 이용하여 동결기구를 제작하였다. 30-70 $\mu\text{m}$ 의 nylon mesh를 사용하여 10 $\mu\text{m}$  크기별로 간이 동결기구를 제작하여 유리화동결 및 융해과정을 진행하였다. Fig. 3과 같이 간이 동결기구를 이용하여 유리화동결 과정을 진행하였으며, 헤드 부분에 장착된 nylon mesh에 전처리된 난자를 위치하였다. Fig. 3-(a)에서 보이는 것과 같이 nylon mesh의 pore 크기가 70 $\mu\text{m}$ 로 클 경우, 난자가 nylon mesh pore 내부에 위치함을 알 수 있었다. 반면, Fig. 3-(b)에서 보이는 것과 같이 nylon mesh의 pore 크기가 작아질 경우, 난자의 위치는 nylon mesh pore 내부가 아닌 nylon mesh의 위쪽에 위치함을 알 수 있었다. 일반적으로 난자나 배아를 유리화동결 시키기 위해서 여러 가지 도구들이 개발되고 활용되고 있다. Electron microscope grid[13], 동결용 straw[14], fiber[15] 등 기존의 연구에 사용되고 있는 도구를 활용하거나 Cryotop[7,8], Cryoloop[16], Cryoleaf[17] 등과 같이 새롭게 개발되어 상용화된 도구도 존재한다. 본 연구에서는 비교적 고가에 속하는 상용화된 도구를 대체하고 비교적 쉽게 구비할 수 있는 도구를 활용하여 유리화동결 도구를 개발하고 활용가치를 분석함으로써 두 가지 이점을 지녔다고 할 수 있다.

유리화동결 과정 중 VS 용액에서의 짧은 처리시간(1분 이내) 내에, 난자는 냉각 속도의 최대화를 위해 VS의 부피가 최소로 동결기구에 위치해야 하며, 이때 최소 부피에 대한 정확한 기준은 없으나 일반적으로 1 $\mu\text{l}$  미만으로 간주된다[9,11]. 일반적으로, 유리화동결을 진행할 때



(a)



(b)

Fig. 3. Representative images of mounted oocyte on 70 (a) and 40  $\mu\text{m}$  (b) of nylon mesh devices.

최종 1분 이내의 과정에서 VS용액에 처리되면서 동결기구에 올려지게 되는데, 이때 VS용액의 혼입을 최소화할 필요가 있다. VS용액의 혼입으로 부피가 커질 경우, 냉각 속도가 낮아지게 되고 낮아진 냉각속도는 난자 내 빙정의 형성을 촉진할 수 있으며, 결과적으로 융해 후 난자의 생존율 및 발달율에 치명적인 동결상해를 초래할 수 있다[8,11,12].

Cryotop이나 기타 상용화된 동결 기구의 경우, 최종 과정에서 난자를 둘러싸고 있는 VS 용액을 흡입해서 제거하는 과정이 필요하며, 이로 인해 다수의 난자를 한꺼번에 처리하기가 매우 어렵고 소수의 난자를 처리하는 사람이나 특수 동물에서 많이 활용되고 있다[18-21]. 본 연구에서 사용한 nylon mesh의 경우, 난자가 위치한 nylon mesh 아래쪽 부분을 통해 VS 용액을 종이 타월에 흡수시킴으로 VS 부피의 최소화를 쉽고 간편하게 처리하였다. 따라서, 본 연구에서 제작된 간이 동결기구를 사용하여 유리화동결 과정을 진행할 경우, VS 부피 최소화 단계를 간소화함으로써 다량의 난자를 일시에 처리할 수 있는 조건을 확보하였다.

본 연구에서 제작된 간이동결기구를 이용하여 Table 1의 내용과 같이 유리화동결 및 융해에 따른 돼지 난자의 생존율을 분석하였다. 그 결과, 50 $\mu\text{m}$ 의 nylon mesh를 사용하였을 때 회복 배양 전 76.7% 회복 배양 후 75.5%의 생존율을 나타냈다. 50 $\mu\text{m}$ 의 nylon mesh는

Table 1. Analysis of survival rates after vitrification procedures with different size of nylon mesh.

Groups	No. of oocytes examined	No of oocytes survived (%) <sup>a</sup>	
		before recovery culture	after recovery culture
30 $\mu$ m	60	37 (61.7 $\pm$ 1.2) <sup>a</sup>	35 (58.3 $\pm$ 1.2) <sup>a</sup>
40 $\mu$ m	60	45 (75.0 $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>	43 (71.7 $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>
50 $\mu$ m	60	46 (76.7 $\pm$ 1.4) <sup>b</sup>	45 (75.5 $\pm$ 1.4) <sup>b</sup>
60 $\mu$ m	60	40 (66.6 $\pm$ 1.8) <sup>a</sup>	39 (65.0 $\pm$ 1.8) <sup>c</sup>
70 $\mu$ m	60	38 (63.3 $\pm$ 2.4) <sup>a</sup>	34 (56.7 $\pm$ 2.4) <sup>b</sup>
Cryotop	60	47 (78.3 $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>	43 (71.7 $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Data are represented as mean  $\pm$  SD of three replicates in each groups. a-cDifferent superscripts denote significant differences within columns ( $P < 0.05$ ).

상용화된 Cryotop의 생존율 71.7%와 유의한 차이는 없었으나, 높아지는 경향을 보였다. 60과 70 $\mu$ m의 경우, 상용화된 기구인 Cryotop과 비교하여 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 낮은 수준을 보였으며, 이는 난자가 동결이 되는 과정에서 nylon mesh에 끼임으로 발생하는 물리적인 상해에서 기인한 것으로 사료된다. 난자는 유리화동결 과정 중 동결액의 처리로 인한 탈수과정을 거치면서 난자의 크기가 줄어들게 되는데, 이때 60-70 $\mu$ m의 nylon mesh의 틈에 난자가 끼이는 현상이 발생하는 것으로 나타났다. 반면, 30 $\mu$ m의 nylon mesh를 사용했을 경우, 상용화된 기구인 Cryotop과 비교하여 난자의 생존력이 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 유리화동결 과정에서 VS액의 제거가 원활히 이루어지지 않아 생기는 동결상해에 따른 것으로 사료된다.

일반적으로 유리화동결에 있어서 고농도의 동결보호제의 사용으로 인한 화학적 동결상해가 빈번히 발생한다고 알려져 있다[11]. 이러한 화학적 동결상해는 투명대의 경질화, 염색체 배열 불량 그리고 난할의 지연 등을 야기함으로써 배아의 정상적인 발달을 저하시키는 것으로 알려져 있다[12,22]. 앞서 언급한바와 같이 물리적 동결상해의 경우, 동결속도의 부적절함, dehydration 과정의 불충분 등으로 동결과정에서 발생하는 빙정의 형성으로 주로 발생하는 것으로 알려져 있다[8,11,12].

따라서 본 연구에서 고안된 간이 동결기구를 사용할 시 기존의 상용 기구인 Cryotop과 비교하여 적어도 한 단계의 유리화동결 과정을 간소화함으로써 대량의 난자를 동결보존 할 수 있는 조건을 확립하였으며, 가축이나 동물의 난자를 보존하기에 매우 유용할 것으로 사료된다.

## 4. 결론

본 연구에서는 돼지 난자용 유리화동결 기구를 제작하여 용해 후 생존율을 분석하였다. 결론적으로, 본 연구에서 고안된 유리화동결 기구는 이미 상용화되어 활용되고 있는 동결기구와 유사한 생존율을 보였다. 또한 본 연구에서 개발된 동결기구를 활용하여 유리화동결을 진행할 경우, 최종 동결액의 제거에 이점이 있으며, 다량의 난자를 처리함으로써 효율성이 증대됨을 알 수 있었다. 다량의 난자를 처리해야 하는 가축이나 동물의 연구에 있어 활용성이 매우 높을 것으로 사료된다.

## References

- [1] R. Taft. "Mouse Embryo Cryopreservation by Slow Freezing", Cold Spring Harb Protoc 2018,2018. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot094540>
- [2] C.C. Chang; D.B. Shapiro; Z.P. Nagy. "The effects of vitrification on oocyte quality", Biol Reprod 106, 316-327,2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/iaob239>
- [3] A. Lopez; Y. Ducolomb; E. Casas; S. Retana-Marquez; M. Betancourt; F. Casillas. "Effects of Porcine Immature Oocyte Vitrification on Actin Microfilament Distribution and Chromatin Integrity During Early Embryo Development in vitro", Front Cell Dev Biol 9, 636765,2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.636765>
- [4] T. Garcia-Martinez; I. Martinez-Rodero; J. Roncero-Carol; I. Yanez-Ortiz; A.Z. Higgins; T. Mogas. "Impact of equilibration duration combined with temperature on the outcome of bovine oocyte vitrification", Theriogenology 184, 110-123,2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.02.024>
- [5] C. Cantatore; J.S. George; R. Depalo; G. D'Amato; M. Moravek; G.D. Smith. "Mouse oocyte vitrification with and without dimethyl sulfoxide: influence on cryo-survival, development, and maternal imprinted gene expression", J Assist Reprod Genet 38, 2129-2138,2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02221-1>
- [6] Z. Zhang; T. Wang; Y. Hao; F. Panhwar; Z. Chen; W. Zou; D. Ji; B. Chen; P. Zhou; G. Zhao; et al. "Effects of trehalose vitrification and artificial oocyte activation on the development competence of human immature oocytes", Cryobiology 74, 43-49,2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.004>
- [7] I.S. Hwang; D. Kwon; T.U. Kwak; J.W. Lee; G.S. Im; S. Hwang. "Improved Survival and Developmental Rates in Vitrified-Warmed Pig Oocytes after Recovery Culture with Coenzyme Q10", Cryo Letters 37, 59-67, 2016.

- [8] I.S. Hwang; M.R. Park; T.U. Kwak; S.H. Park; J.H. Lim; S.W. Kim; S. Hwang. "Effect of Cytochalasin B Treatment on the Improvement of Survival Rate in Vitrified Pig Oocyte", *Dev Reprod* 22, 245-252, 2018. DOI: <https://doi.org/10.12717/DR.2018.22.3.245>
- [9] S. Hochi. "Cryodevices developed for minimum volume cooling vitrification of bovine oocytes", *Anim Sci J* 93, e13683, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/asi.13683>
- [10] J. Saragusty; A. Arav. "Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification", *Reproduction* 141, 1-19, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-10-0236>
- [11] I.S. Hwang; S. Hochi. "Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes", *Biomed Res Int* 2014, 570647, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/570647>
- [12] I.S. Hwang; H. Hara; H.J. Chung; M. Hirabayashi; S. Hochi. "Rescue of vitrified-warmed bovine oocytes with rho-associated coiled-coil kinase inhibitor", *Biol Reprod* 89, 26, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109769>
- [13] S.H. Kim; S.Y. Ku; K.C. Sung; M.J. Kang; S.A. Kim; H.S. Kim; S.K. Oh; B.C. Jee; C.S. Suh; Y.M. Choi; et al. "Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for mouse mature oocyte cryopreservation", *Yonsei Med J* 47, 399-404, 2006. DOI: <https://doi.org/10.3349/ymj.2006.47.3.399>
- [14] S. Ghasem; K. Negar. "Effect of vitrification on number of inner cell mass in mouse blastocysts in conventional straw, closed pulled straw, open pulled straw and cryoloop carriers", *J Pak Med Assoc* 63, 486-489, 2013
- [15] M. Murakami; T. Otoi; N.W. Karja; P. Wongsrikeao; B. Agung; T. Suzuki. "Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose", *Cryobiology* 48, 341-348, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.02.012>
- [16] Z. Wang; Z. Sun; Y. Chen; F. He. "A modified cryoloop vitrification protocol in the cryopreservation of mature mouse oocytes", *Zygote* 17, 217-224, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0967199409005309>
- [17] X.L. Wang; X. Zhang; Y.Q. Qin; D.Y. Hao; H.R. Shi. "Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study", *J Assist Reprod Genet* 29, 883-889, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9814-y>
- [18] M. Antinori; E. Licata; G. Dani; F. Cerusico; C. Versaci; S. Antinori. "Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries", *Reprod Biomed Online* 14, 72-79, 2007. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60766-3](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60766-3)
- [19] M. Bottrel; T. Mogas; B. Pereira; I. Ortiz; M. Diaz-Jimenez; C. Consuegra; M. Hidalgo; R. Morato; J. Dorado. "The cryoprotective effect of Ficoll 70 on the post-warming survival and quality of Cryotop-vitrified donkey embryos", *Theriogenology* 148, 180-185, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.013>
- [20] Y. Liang; D. Rakwongrit; T. Phermthai; T. Somfai; T. Nagai; R. Parnpai. "Cryopreservation of immature buffalo oocytes: effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods", *Anim Sci J* 83, 630-638, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2012.01013.x>
- [21] M.G. Palmerini; M. Antinori; M. Maione; F. Cerusico; C. Versaci; S.A. Nottola; G. Macchiarelli; M.A. Khalili; S. Antinori. "Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification", *J Reprod Dev* 60, 411-420, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-027>
- [22] H. Hara; I.S. Hwang; N. Kagawa; M. Kuwayama; M. Hirabayashi; S. Hochi. "High incidence of multiple aster formation in vitrified-warmed bovine oocytes after in vitro fertilization", *Theriogenology* 77, 908-915, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.018>

황 인 설(In-Sul Hwang)

[정회원]



- 2009년 2월 : 서울대학교 농생명공학부 (농학석사)
- 2013년 9월 : 신수대학교 종합공학계연구과 (농학박사)
- 2021년 5월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연수사
- 2021년 6월 ~ 현재 : 컬럼비아대학교 의과대학 연구과학자

<관심분야>

이종장기, 복제동물, 저온생물학

박 미 령(Mi-Ryung Park)

[정회원]



- 2000년 2월 : 경상대학교 낙농학과 (농학석사)
- 2005년 2월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2010년 1월 ~ 2012년 12월 : 건국대 동물자원 전임연구원
- 2013년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연수사

<관심분야>

동물발생, 생명공학