大韓不妊學會誌: 第31卷 第1號 2004
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 31, No. 1, 2004, 3

# 생쥐 난자의 효율적인 냉동보존 방법 확립을 위한 연구

삼성제일병원 생식생물학 및 불임 연구실

최수진 · 김수경 · 김지선 · 조재원 · 전진현 · 변혜경

## Development of Effective Cryopreservation Method for Mouse Oocytes

**Su Jin Choi, Soo Kyung Kim, Ji Sun Kim, Jae Won Cho, Jin Hyun Jun, Hye Kyung Byun**

*Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, Samsung Cheil Hospital and Women's Healthcare Center, Seoul, Korea*

**Objective:** The purpose of this study was to evaluate the efficacy and effect of various cryopreservation method on the survival and the cytoskeletal stability of metaphase II mouse oocyte.

**Methods:** Mouse ovulated oocytes were collected and cryopreserved by a modified slow-freezing method with 1.5 M 1,2-propanediol (PrOH)+0.1 M sucrose or by vitrification using cryo loop and EM grid with 40% ethylene glycol+0.6 M sucrose. Four hours after thawing, intact oocytes were fixed and stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal anti-β-tubulin antibody to visualize spindle and propidium iodide (PI) to visualize chromosome. Spindle morphology was classified as follows: normal (barrel-shaped), slightly and absolute abnormal (multipolar or absent).

**Results:** Survival rate of the frozen-thawed oocytes in vitrification group was significantly higher than that of slow-freezing group (62.7% vs. 24.4%, $p<0.01$). Vitrification with cryo loop showed significantly higher survival rate than that with EM grid (67.7% vs. 53.5%, $p<0.05$). On the other hand, proportion of normal spindle and chromosome configurations of the frozen-thawed oocytes between two vitrification group was not significantly different.

**Conclusion:** For mouse ovulated oocytes, vitrification with cryo loop may be a preferable procedure compared to slow-freezing method. Further study should be needed to investigate developmental competency of frozen-thawed mouse oocytes.

**Key Words:** Mouse oocyte, Vitrification, Slow-freezing, Spindle, Chromosome

난자는 하나의 새로운 개체로 형성되기 이전의 생식자 상태이므로, 난자의 동결보존은 완전한 개체로서 인정되는 수정란이나 배아의 동결보존 시 발생되는 종교적, 윤리적 문제를 극복할 수 있으며, 가임 여성이 항암 약물 치료를 받아야 하는 경우 치료 전에 손상되지 않은 난자를 보관함으로써 그 생식력을 연장시킬 수 있다. 또한, 현재 많은 어려움이 있는 난자 공여 프로그램의 활성화에 이용되는 등 여러 가지 면에서 장점을 제공할 수 있다.

난자의 동결보존은 최근 여러 연구자들에 의해 보고되었으며, 성숙난자의 동결보존과 이를 이용한 성공적인 임신이 몇 차례 보고 되었으나,[1~3] 아

주관책임자: 변혜경, 우) 100-380 서울특별시 중구 묵정동 1-19, 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7590, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: byun0314@unitel.co.kr
*본 연구는 2002년도 제일의료장학재단 연구비 지원으로 진행되었음

직 난자 동결보존에 대한 방법이 정립되지 않아 융해 후 난자의 생존율과 임신 성공률이 매우 낮은 문제점이 있다.

동결 방법으로서는 완만 동결 (modified slow-freezing) 방법과 초자화동결 방법 (vitrification)이 여러 연구자에 의해 보고되고 있다. 특히, 초자화 동결 방법의 경우, EM grid, cryo loop, open 또는 closed pulled straw (OPS or CPS) 등 다양한 동결 기구를 이용한 방법들이 소개되고 있다.[4~10] 최근 자주 보고되는 초자화동결 방법은 고농도의 동결 보호제 사용과 고속의 동결 시간으로 빙결정 형성을 방지함으로써 기존의 완만 동결 방법이 지닌 단점을 보완하였다. 그러나 초자화동결 융해 후에도 완만 동결 융해 후 관찰되는 난자의 투명대의 경화현상과 미세구조의 손상이 발생하는 것으로 보고되고 있다.[11~17] 초자화동결 방법으로 냉동보존한 생쥐 난자의 경우 융해 직후 meiotic spindle에 존재하는 microtubule에 심각한 손상이 나타나고, 이 동결－융해된 난자를 1시간 동안 배양하면 microtubule에서 repolymerization이 일어나 회복되는 것이 관찰되었다.[9] 한편, 완만 동결 방법에서도 융해 직후 microtubule의 형태적 손상이 관찰되며 융해 후 배양하면 회복되는 것으로 보고 되었다.[17] 동결 융해 한 난자의 수정과정에서 digyny 현상이 증가하는 것은 이러한 microtubule의 손상의 결과로 생각되고 있다.[14,17,18]

따라서 본 연구에서는 효율적인 난자의 냉동보존 방법을 확립하기 위하여 냉동 방법에 따른 난자 생존률을 비교하였으며, 특히 초자화동결 기구에 따른 생존률, spindle의 재회복 정도를 비교하고자 동결 융해 후 생존 난자를 배양한 뒤 spindle과 염색체 (chromosome)의 재배열 상태를 비교, 분석하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 실험 동물 및 난자의 준비

본 실험에서는 생후 5~6주 된 암컷과 생식력이 확인된 수컷 ICR 생쥐를 사용하였다.

과배란 유도를 위하여 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 생쥐 암컷에 복강 주사하고 48시간 후 5 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 복강 주사하였다. 성숙 난자를 얻기 위하여 hCG 주사 14시간 후 수란관을 적출하여 배란된 난자를 분리하였다. Hyaluronidase (Sigma)를 이용하여 난구 세포를 제거하고 제 1극체 (first polar body)가 관찰되는 성숙된 난자만을 선별하여 실험에 사용하였다.

### 2. 난자의 동결보존 및 융해 방법

#### 1) 완만 동결 (Modified slow-freezing) 및 급속 융해 방법

20% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 Dulbecco's phosphate-buffered saline (dPBS, GIBCO BRL)을 기본배양액으로, 1.5 M 1,2-propanediol (PROH, Sigma)와 0.1 M sucrose (Sigma)를 동결보호제로 사용하였다. 37℃ 기본배양액에서 5분, 상온에서 1.5 M PROH에서 10분, 1.5 M PROH＋0.1 M sucrose에서 10분간 처리한 후 0.25 ml straw에 동결액과 함께 넣고 양쪽 끝을 sealing powder로 봉합하여 세포동결기에 loading하여 완만 동결 방법으로 동결하였다. 동결 과정은 20℃에서 -7℃까지 1분당 2℃로 하강한 후 -7℃에 도달하여 1분 경과할 때 미리 액체 질소에서 냉각시킨 forcep을 이용하여 식빙 (seeding)을 시행한 후 5분간 정치시켰다. 정치 후 -30℃까지 분당 0.3℃, -30℃에서 -150℃까지 분당 30℃ 하강시켰다. -150℃에서 straw를 세포동결기에서 꺼내 액체 질소통에 직접 넣었다.

융해는 급속 융해 방법을 이용하였다. 액체 질소통에서 꺼낸 straw를 상온에서 40 초간, 37℃ 항온 수조에서 1분간 수평을 유지한 채 완전히 융해시켰다. 융해된 난자는 1.0 M PROH＋0.2 M sucrose, 0.5 M PROH＋0.2 M sucrose에서 각각 5분씩 상온에서 세척한 후, 0.2 M sucrose와 dPBS에서 10분씩 37℃에서 세척하여 동결보호제를 제거시킨 후 G-FERT (Vitrolife, Sweden) 배양액으로 옮겨 배양하였다.

#### 2) 초자화동결 및 융해

10% FBS-dPBS를 기본배양액으로 10% (v/v) ethylene glycol (EG, Sigma) 동결액에 난자를 5분간 노출시켜 탈수화 평형 (dehydration equilibration)을 유도한 후 40% (v/v) EG＋0.6 M sucrose 동결액

에 옮긴 즉시 electron microscope grid (EM grid, 400 mesh; Gilder, USA) 또는 cryo loop (Hampton, USA)에 적재하여 액체질소에 넣었다. 이때 EM grid 또는 cryo loop를 액체 질소 내로 침지하기까지 걸리는 시간은 60초를 넘기지 않았다.

난자의 융해는 액체 질소로부터 EM grid 또는 cryo loop를 꺼내어 0.5 M sucrose에 녹인 후, 0.25 M, 0.125 M sucrose, 기본 배양액에서 각각 2분 30초간 정체하였다. 기본 배양액에서 세척 후 G-FERT 배양액으로 옮겨 배양하였다.

3. 난자의 미세구조와 염색체 (chromosome) 염색

동결 융해 후 생존한 난자는 미세구조의 재배열이 일어나도록 4시간 동안 배양한 후 permeability를 높이기 위해 modified buffer M (25% glycerol, 50 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM ethylenediaminetretraacetic acid (EDTA), 1 mM β-mercaptoethanol, 50 mM Imidazol, pH 6.7, 3% Triton X-100, and 25 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) 용액에[19] 10분 동안 담근 후 상온에서 2.5% formaldehyde로 1시간 동안 고정시킨 후 0.5% BSA, 0.02% sodium azide가 함유된 PBS에서 냉장 보관하였다. 냉장 보관된 난자의 spindle을 염색하기 위하여 0.1 mM glycine, 0.01% Triton X-100, 1% powdered milk, 0.5% BSA, 0.02% sodium azide가 첨가된 PBS에 30분간 처리한 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal anti-β-tubulin clone (1:100, Sigma, F-2043)으로 8시간 이상 처리하였다. 다시 염색체를 염색하기 위하여, blocking solution에 30분간 처리한 후 5 μg/ml propidium iodide (PI, Sigma, P-4170)로 90분간 처리하였다. 염색된 난자는 PBS로 세척하여 슬라이드에 고정시킨 후 400배 형광현미경 하에서 관찰하였다. Spindle의 형태는 정상 (barrel-shaped), 부분 비정상 또는 비정상 (multipolar or absent shaped)으로 구분하였다.

4. 통계 처리

통계적 분석은 ABstat (rel 6.54, Anderson-Bell Co.)의 chi-square test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

1. 동결 방법에 따른 생존률의 비교

생쥐의 성숙 난자를 냉동보존 방법인 완만 동결 방법과 초자화동결 방법으로 동결한 비교 실험에서 난자의 생존률은 완만 동결 방법을 사용한 실험군의 생존률 (24.4%)보다 초자화동결 방법을 사용한 실험군의 생존률 (62.7%)이 유의하게 높게 나타났다 ($p<0.01$). 한편 같은 초자화동결 과정에서도 각각 cryo loop와 EM grid의 결과를 비교하였을 때 cryo loop를 사용한 실험군에서 더 높은 생존률이 나타났으며 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 (67.7% vs 53.5%, $p<0.05$) (Table 1).

2. 초자화동결 방법 중 동결 기구에 따른 spindle과 염색체의 비교

Cryo loop와 EM grid를 각각 사용한 초자화동결 실험에서 두 실험군 간의 정상적인 spindle의 비율은 cryo loop를 사용한 실험군에서 약간 높게 나타났으나 (69.3% vs. 60.6%) 통계적 차이는 없었다. 또한, 두 실험군의 정상 염색체의 비율도 cryo loop를 사용한 실험군에서 높게 나타났으나 (65.3% vs.

**Table 1.** Survival rates of the mouse mature oocytes by different freezing methods

| | No. of experiments | No. of oocytes | No. of survival |
|---|---|---|---|
| Slow-freezing | 8 | 234 | 57 (24.4%)[a] |
| Vitrification | 8 | 244 | 153 (62.7%)[b] |
| Cryo loop | | 158 | 107 (67.7%)[c] |
| EM grid | | 86 | 46 (53.5%)[d] |

a vs. b, $p<0.01$; c vs. d, $p<0.05$.

**Table 2.** Spindle and chromosome configurations of mouse ovulated oocytes after vitrification

| | Cryo loop | EM grid |
|---|---|---|
| No. of oocytes | 75 | 33 |
| Spindle morphology | | |
| Normal | 52 (69.3%) | 20 (60.6%) |
| Slightly abnormal | 5 (6.7%) | 1 (3.0%) |
| Abnormal | 18 (24.0%) | 12 (36.4%) |
| Chromosome morphology | | |
| Normal | 49 (65.3%) | 19 (57.6%) |
| Slightly abnormal | 3 (4.0%) | 2 (6.1%) |
| Abnormal | 23 (30.7%) | 12 (36.4%) |

Two groups were not significantly different.

57.6%) 역시 통계적 차이는 없었다 (Table 2).

## 고 찰

난자의 동결 보존은 인간 배아의 동결시 야기될 수 있는 법적, 종교적, 윤리적 문제를 극복할 수 있으나, 낮은 생존률과 임신률이 가장 큰 문제점으로 대두되고 있다.

이를 극복하기 위한 방법으로써 완만 동결 방법을 대체할 초자화동결 방법이 시도되었다. 초자화동결 방법은 고농도의 동결보호제 사용과 고속의 동결-융해 시간으로 빙결정을 이루지 않고 배아를 동결하는 방법이지만, 고농도의 동결 보호제를 사용하기 때문에 동결보호제의 독성과 삼투압에 의한 충격이 생존을 위협하는 주요한 요인으로 작용하는 것으로 생각된다. 또한 초자화 동결 융해 후 난자 투명대의 물리적 손상 및 경화 현상, microtubule과 microfilament 등의 미세 구조 손상도 발생하는 것으로 관찰되는데,[11~12] 이는 동결과정시 고농도의 동결보호제와 급격히 낮은 온도로의 노출이 spindle의 형태를 변형시켜 비정상적인 염색체 형태를 야기시키는 것과 관계있는 것으로 밝혀지고 있다.[13,20~22]

Gook 등이[4] PROH를 이용한 실험에서 완만 동결-급속 융해 방법을 사용한 생쥐 난자의 생존율은 4%로 매우 낮게 보고 되었으며, Aigner 등은[18] DMSO를 이용한 완만 동결 방법을 사용하여 69%의 생존률을 나타내었다. 본 실험에서는 PROH를 이용한 완만 동결 실험 결과 24.4%로 두 논문과는 다른 결과를 보였다. 또한 완만 동결 방법의 난자 생존률보다 초자화동결 융해 방법의 생존률이 유의하게 높게 나타났다 (24.4% vs. 62.7%, $p<0.01$). 초자화동결 융해 방법의 경우, 같은 동결보호제와 시간으로 동결하되 동결기구를 달리했을 때 cryo loop군이 EM grid군보다 높은 생존률을 나타내었다 (67.7% vs. 53.5%, $p<0.05$). Chen 등의[10] 실험에서 생쥐 동결 난자의 생존률은 CPS, OPS, EM grid 각각에서 79%, 63%, 39%로 EM gird군에서 낮게 관찰되었으나, 본 실험에서는 53.5%로 나타났으며 cryo loop를 이용한 생존률은 OPS를 이용한 생존률과 비슷하게 나타났다. 한편, Lane과 Gardner는[23] cryo loop를 이용하고 동결액으로 DMSO와 ethylenglycol을 사용하여 99.3%의 높은 생존률을 보고하였다. 또한 Park 등은[24] EM grid를 이용한 생쥐 난자의 초자화동결 실험에서 73.8%의 생존률을 보고하였으며, 이러한 여러 논문에서 생쥐 난자의 생존률은 생쥐의 종과 노출시간, 온도, 동결보호제의 종류와 농도 등 실험방법과 연구자에 따라 매우 다양하게 보고되고 있다.

또한 본 실험에서는 두 초자화동결 방법에서 spindle과 염색체의 정상비율이 69.3% 대 60.6%과 65.3% 대 57.5%로서 cryo loop 군에서 약간 높으나 통계적 차이는 나타나지 않았다. Park 등은[24] EM grid를 사용하여 생쥐 성숙난자를 초자화동결

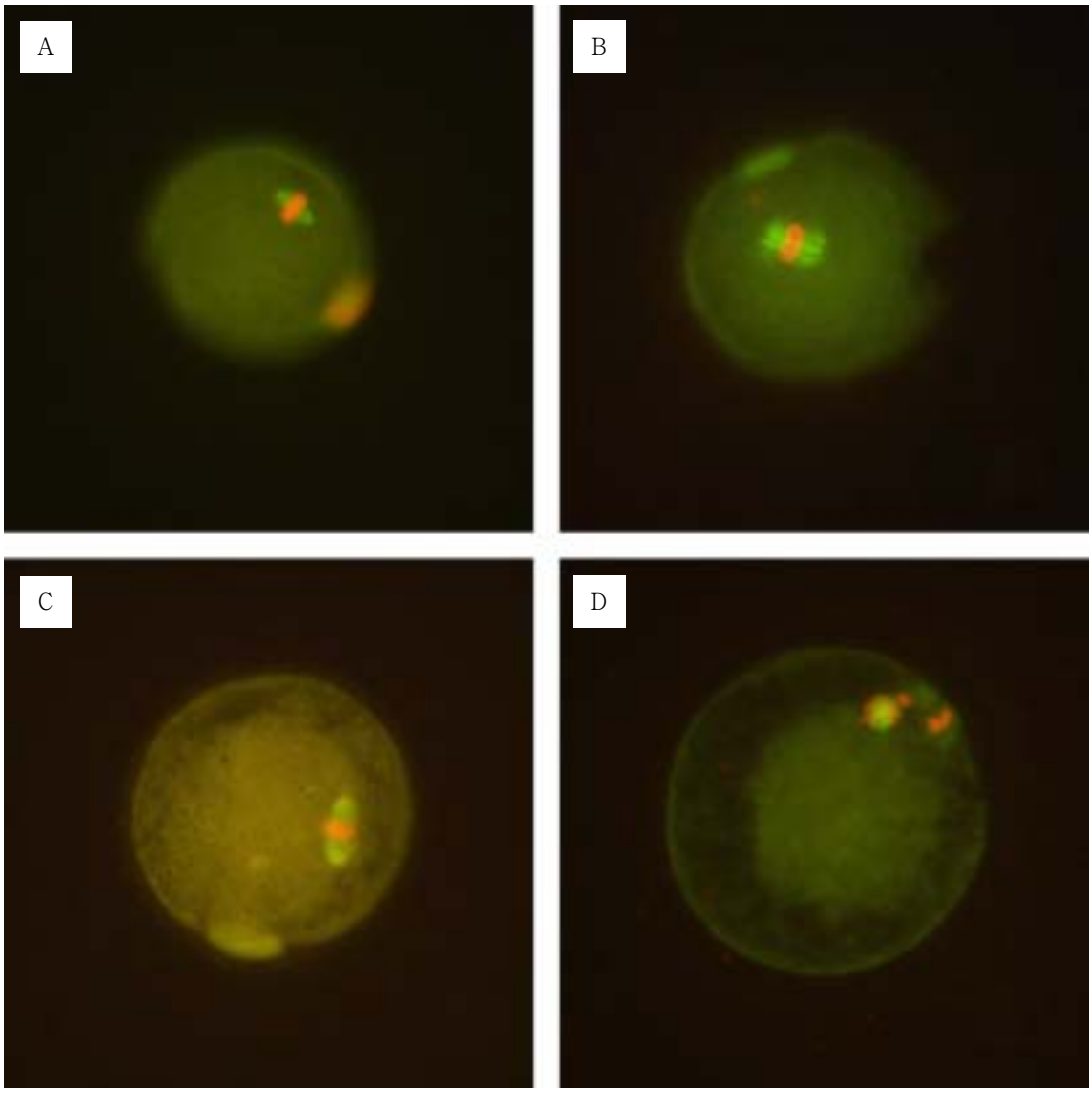


**Figure 1.** Mouse ovulated oocytes after vitrification were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC) to visualize spindle (green) and propidium iodide (PI) to visualize chromosomes (red).
A, normal spindle and chromosomes; B, slightly abnormal spindle; C, slightly abnormal chromosomes; D, abnormal spindle and chromosomes.

하였을 때 본 실험 결과와 유사한 60.6%의 정상 spindle과 65.5%의 정상 염색체를 관찰하였으며, 백 등이[25] EM grid에 ethylenglycol, ficoll과 sucrose를 사용하여 생쥐 성숙난자를 초자화동결한 실험에서는 정상적인 microtubule을 가진 비율이 49.1%로서 본 실험 결과보다 낮게 나타났다. Chen 등이[9] OPS로 초자화동결 융해 후 관찰한 생쥐 성숙 난자의 정상 spindle과 염색체의 비율은 78%와 87%로 높게 나타났으며, CPS, OPS과 EM grid를 이용한 실험에서는 초자화동결 융해 후 정상 spindle과 염색체의 비율이 89~95%로 융해 후 3시간 배양시 가장 높게 관찰되었다.[10] 이와 같이 동결융해에 걸리는 시간, 동결보호제의 종류와 농도 차이에 따라서도 다양한 결과가 보고 되고 있다.

이러한 여러 가지 동결 방법에도 불구하고 동결융해한 난자의 생존률을 배아와 같은 수준으로 높

이기 위해서는 아직도 많은 기술적인 변화가 요구되고 있다. 포유류의 난자는 제 1극체가 방출되고 염색체가 감수분열 spindle의 중앙에 배치된 제 2 중기에서 배란된다. 감수분열이 완성되는 동안 염색사의 정상적인 배열은 완전한 spindle의 미세관 유무에 달려 있다. 그러나 동결과정과 동결보호제의 사용은 spindle의 변형과 염색체의 비정상적인 배열을 가져 올 수 있다. 동결 융해한 난자의 생존률이 배아의 동결 융해시보다 낮은 이유로는 이러한 spindle 손상과 투명대 경화 현상 등에 의한 것으로 생각되고 있다.[13~17]

본 실험에서는 생쥐 난자의 동결시 초자화동결 방법이 완만 동결법보다 높은 생존률을 나타내었다. 그러나 초자화동결시 사용되는 두 기구 모두 액화 질소 내에서 저장하는 동안 액화 질소에 직접 노출되므로 액화질소에 의한 오염 가능성이 제기되고 있다. 따라서 앞으로 동결 융해한 난자의 생존률을 배아의 동결융해 후 생존률과 같은 수준으로 높이기 위한 초자화동결 방법을 적용하기 위해서는 액체 질소의 오염 가능성 문제를 극복하여야 한다. 또한 최근 소개되고 있는 동결액의 조성물질 중 sodium을 choline으로 대체시켜 solution effect를 감소시키는 방법[26] 등 다양한 부분에서 연구가 이루어져야 하고, 이러한 결과들을 인간 난자에 적용하기 위해서는 spindle 손상에 대한 안정성을 증명할 수 있는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌


1. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet 1986; 19: 884-6.
2. Van Uem JFHM, Siebzehnrubl ER, Schuh B, Kock R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. Lancet 1987; 1: 752-3.
3. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. Hum. Reprod 1999; 14: 3077-9.
4. Gook DA, Osborn SM, Johnston WIH. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. Hum Reprod 1993; 8: 1101-9.
5. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling Biol Reprod 1996; 54: 1059-69.
6. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by virtification in straws. Cryobiology 1998; 37: 77-85.
7. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryo-injuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev 1998; 51: 53-8.
8. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. Fertil Steril 1999; 7: 1073-8.
9. Chen SU, Lien YL, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Open pulled straws for vitrificaitonof mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and choromosomes better than conventional straws. Hum Reprod 2000; 15: 2598-603.
10. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Hornstein HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. Hum Reprod 2001; 16: 2350-6.
11. Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ, Whittingham DG. Cytogenetic analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. Biol Reprod 1995; 53: 780-5.
12. Van der Elst J, Nerinckx S, Van Sterteghem AC.

Association of ultrarapid freesing of mouse oocytes with increased polyploid at the pronucleate stage, redused cell numbers in blastocysts and impaired fetal development. J Reprod fertil 1993; 99: 25-32.

13. Pickering S, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. Hum Reprod 1987; 2: 207-16.
14. Carroll J, Warnes GM, Matthews CD. Increase in digyny explains polyploidy after in-vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. J Reprod fertil 1989; 85: 489-94.
15. Carrol J, depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. J Reprod Fertil 1990; 90: 547-53.
16. George MA, Johnson MH. Use of fetal bovine serum substitutes for the protection of the mouse zona pellucida against hardening during cryoprotectant addition. Hum Reprod 1993; 8: 1898-900.
17. Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. Fertil Steril 1998; 69: 944-57.
18. Aigner S, Van der Elst J, Siebzehnrubl E, Wildt L, Lang N, Van Steirteghem AC. The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. Hum Reprod 1992; 7: 857-64.
19. Schatten G, Simerly C, Schatten H. Microtubule configurations during fertilization, mitosis and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammaliam ferilization. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 4152-6.
20. Johnson MH and Pickering SJ. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. Development 1987; 100: 313-24.
21. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, Wisse E, Van Steirteghem AC. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. Hum Reprod 1988; 3: 960-7.
22. Pickering SJ, Cant A, Braude PR, Currie J, Johnson MH. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. Fertil Steril 1990; 54: 102-8.
23. Lane M, Gardner D. Vitirification of mouse oocytes using a nylon loop. Mol Reprod Dev 2001; 58: 342-7.
24. Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES, Lim JM. Cryopreservation of ICR mouse oocytes improved post-thawed preimplantation development after vitrification using TaxolTM, a cytoskeleton stabilizer. Fertil Steril 2001; 75: 1177-84.
25. 백원영, 최원준, 김세나, 이종학. 생쥐난자의 초자화동결 시 cytochalasin B가 cytoskeleton에 미치는 영향. 대한불임학회지 2002; 29: 229-36.
26. Stachecki JJ, Cohen J, Schimmel T, Willadsen SM. Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconventional freezing medium. Cryopreservation 2002; 44: 5-13.