

## Brilliant Cresyl Blue 염색 방법과 극체 방출 여부에 따른 돼지 체외수정용 난포란 선별 방법이 배발달에 미치는 영향

김연수<sup>1</sup> · 김철욱<sup>1</sup> · 김인철<sup>2</sup> · 꺾대오<sup>3</sup> · 정기화<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>진주산업대학교 동물소재공학과, <sup>2</sup>축산과학원 양돈과, <sup>3</sup>경상대학교 과학교육과

### Different Developmental Competence of Porcine Oocytes Selected by Brilliant Cresyl Blue Staining and Polar Body Extrusion

Yeon-Soo Kim<sup>1</sup>, Cheol-Wook Kim<sup>1</sup>, In-Cheol Kim<sup>2</sup>, Dae-O Kwack<sup>3</sup> and Ki-Hwa Chung<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Resources Technology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

<sup>2</sup>Swine Science Division, NLRI, RDA, <sup>3</sup>Department of Science Education, Gyeongsang University,

#### ABSTRACT

The brilliant cresyl blue (BCB) has been used to select the developmental competent oocytes in pigs, goats and cows. Growing oocytes have a higher level of active glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH) compare to mature oocytes and are rarely stained compared to mature oocytes, because G6PDH converts BCB to colorless. First polar body extrusion regard as a guideline of meiosis completion. Selection of polar body extrude oocyte is more developmental competent to blastocyst than unselected. This study was conducted to compare the BCB test to the polar body extrusion on selection of developmental competent porcine oocytes for the production of blastocyst. Cumulus-Oocytes complex were exposed to 26uM BCB stain diluted in NCSU-23 for 90 min. There was no significant difference embryo development to blastocysts between BCB treated and not treated(19.58±1.99 vs 18.75±2.27 %), which means there was no detrimental effect of BCB exposure to oocytes. Normal fertilization is not differed among treatment groups from 70.0 to 78.4% development to blastocyst, beside polyspermy did not. To compare two different selection methods, BCB test and polar body extrusion, evaluate the developmental competent of IVP embryos. BCB+PB+(blue stained and polar body extruded, 20.71±0.45%) and BCB-PB+(colorless and polar body extruded, 20.04±1.29%) groups are significantly ( $p<0.05$ ) higher developed than those of BCB+PB-(blue stained and no polar body, 13.24±0.73%) and BCB-PB-(colorless and no poladbody, 7.25±0.77%). These results showed that selection of polar body extruded oocytes method is more efficient than that of BCB test.

(Key words : BCB staining, Polar body extrusion, Porcine oocyte, Embryo development)

#### 서 론

난자의 체외성숙은 수정란의 체외생산에서 매우 중요한 부분이다. 양질의 난자를 이용함으로써 핵이식, 미세주입 및 형질전환 동물의 생산과 같은 발생공학 분야에서의 생산효율을 증진시킬 수 있다(정 등, 1999; Lonergan 등, 2003; Alm 등, 2005; Nicholas 등, 2005; Anguita 등, 2007). 수정 전 단계에서 발생능이 있는 난자를 선별하는 방법은 극체 방출 여부나 세포질 관찰 등을 이용하는데(Ebner 등, 2003), 일반적으로 돼지 미성숙 난자는 현미경에서 육안으로 관찰하여 난자의 크기, 난구세포의 부착 정도 및 세포질의 균일 등을 관찰하여 선별한다(Gordon, 2003). 그러나 이와 같은 방법은 난자의 발생능을 선별하기에 충분하지는 않다(De

Loos 등, 1992).

BCB 염색에 의한 난자의 선별법이 돼지(Ericsson 등, 1993), 육성산양(Rodriguez-Gonzalez 등, 2002), 육성우(Pujol 등, 2000; 2004) 및 소(Alm 등, 2005) 등의 체외수정란 생산효율을 높이는 방법으로 이용되어져 왔다. BCB는 성장하는 난자의 세포질내에서 합성 activity가 높고(Mangia와 Epstein, 1975), 성장이 완료된 난자에서는 활성율이 저하되는(Wassarman, 1988) 효소인 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)의 활성도를 측정하는 것이다. BCB는 푸른색의 염료로서 G6PD의 활성화 정도에 따라 색깔 유무가 결정된다. 따라서 성장중인 난자는 세포질의 색깔이 푸른색으로 염색되는 반면 성장이 완료된 난자는 G6PD의 활성이 없어지므로 색이 없어지게 된다(Pujol 등, 2000). 체외수정란 생산효율을 높이기 위하여 체외성숙 이전에 BCB test

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-55-751-3287, E-mail: kchung@jinju.ac.kr

를 거쳐 미성숙 난자를 선별하면 높은 효과를 기대할 수 있다.

Pujol 등(2000)은 BCB test를 거쳐서 선별한 소의 미성숙 난자는 metaphase 2(M2)에 도달하는 비율이 높았으며, 형태에 의한 외형적 판별법으로 선별한 난자보다 발달율이 높았다고 하였다. Roca 등(1998)은 BCB 염색된 난자가 BCB 염색되지 않은 난자보다 정자침투율이 높다고 하였고, 염소에서는 BCB 염색된 난자가 체외수정 시 수정율이 증가한다고 보고하였다(Rodriguez-Gonzalez 등, 2002). 난자의 성숙 여부는 핵염색을 통하여 할 수도 있지만, 제1극체의 방출로 판단할 수 있다. 김 등(2007)의 보고에 의하면 제1극체가 방출된 난자를 이용하여 체외수정란을 생산할 경우 형태에 의한 선별 방법보다 정상분할율과 배반포로의 발달율이 유의적으로 높았다고 하였다.

따라서 본 연구는 BCB 염색에 의한 미성숙난자의 선별과 제1극체 방출에 의한 성숙난자의 선별이 체외수정란의 생산효율을 향상시킬 수 있는지를 구명하기 위하여 실시하였다. BCB 첨가가 난자의 체외성숙 및 수정후 발생에 미치는 영향을 확인하고, BCB 염색 및 제1극체 유무에 따른 수정율 및 배발달율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 난소 및 난포란의 채취

도축된 암태지로부터 난소를 수집하여 항생제가 첨가된 0.9% 생리식염수에 담겨 2~4시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 2~3회 세척한 후 18 gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 직경 2~8 mm의 포상난포로부터 회수하였다. 실험에 사용된 시약은 모두 Sigma사(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 회수된 난포란은 TL-Hepes-PVA에 washing하여 60×15 mm의 tissue culture dish에 옮긴 후 실체 현미경(20~60×) 하에서 난세포질이 균일하고 난구세포가 세겹이상 잘 부착된 것을 선별하여 체외성숙에 이용하였다.

### BCB 염색

채취된 난자는 NCSU-23 용액에 26  $\mu$ M 농도로 BCB를 첨가하여 90분 동안 염색을 실시하였다. 염색의 유무는 세포질 착색에 따라서 분류하였는데, 세포질이 푸른색을 띠면 염색이 된 것(BCB+)으로 판단하였고, 색깔의 변화가 없는 것은 염색이 되지 않은 것(BCB-)으로 판단하였다.

### 난포란의 체외성숙 및 난포란의 극체 확인

BCB 착색 여부에 따라 선별된 난포란은 NCSU-23을 기본배양액으로 하여 10% 돼지 난포액, cysteine(0.1  $\mu$ g/ml), EGF(10 ng/ml), FSH(0.5  $\mu$ g/ml), estradiol-17 $\beta$ (0.1 mg/ml)를 첨가하여 만든 체외성숙용 배지에 세척한 후 700  $\mu$ l 씩의 배양액이 담긴 4-well dish(Nunc, Denmark)에 각 well마다 약 100~150개의 난자를 넣었다. 39 $^{\circ}$ C 온도와 5% CO<sub>2</sub>에서 20~22시간 배양한 다음, 난자를 호르몬이 첨가되지 않은 배지에 옮겨 20~22시간, 총 42시간 동안 배양하였다. 극체의 유무는 난구세포를 제거한 후 도립 현미경(40

~100×)에서 판단하였다.

### 체외수정

체외수정용 용액은 modified Tris-Buffered Medium(m-TBM)을 기본 배양액으로 하여 1 mM caffeine과 0.4% BSA가 함유된 mTBM 용액을 사용하였다. 활력이 높은 정자를 선별하기 위하여 swim up 방법을 이용하여 정자를 회수하였다. 액상정액 보관고에서 꺼낸 정액을 부드럽게 섞어준 다음 15 ml tube에 담아 830×g에서 5분간 원심분리 하였다. Pellet 부분의 정자를 제외한 상층은 버리고 체외수정용 용액을 Pellet이 흐트러지지 않도록 조심스럽게 5 ml까지 채운 후 incubator에 45 $^{\circ}$  각도로 기울여 약 40분간 swim up을 유도하였다.

난자는 42시간동안 성숙시킨 후 vortexing하여 난구세포를 완전히 제거하고 체외수정용 용액에 3회 세척한 후 50  $\mu$ l의 체외수정용 배양액 소적에 난자를 넣어 보관하였다. 체외수정은 정자의 최종농도가 0.5×10<sup>6</sup>/ml이 되도록 하여 6시간 동안 수정시켰다. 수정완료 후 수정을 실시한 난포란 중 일부는 수정을 조사를 위하여 염색을 실시하였고, 나머지는 모두 체외배양하였다.

### 체외배양

체외배양은 NCSU-23에 0.4% BSA를 첨가한 배양액을 사용하였다. BCB의 염색 여부에 따라 +(염색된 것)와 -(염색되지 않은 것)으로 구분하였고, 극체 방출(PB) 여부에 따라 +(극체 방출), -(극체 미방출)로 표시하였으며, 네 개의 처리구(BCB+ PB+, BCB+ PB-, BCB- PB+, BCB- PB-)로 나누었다. 각각의 체외수정란은 50  $\mu$ l의 배양액에 20개 씩을 넣어 39 $^{\circ}$ C 온도와 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

### 수정란의 관찰

체외수정 12시간 후에 성숙난포란의 정자침투율, 다정자침투율, 응성전핵 형성을 관찰하기 위하여 acetic-orcein 염색을 실시하였다. 난구세포를 깨끗이 제거한 후 72시간 정도 고정액(glacial acetic acid : ethanol=1:3)에 넣어두었다. Cover glass의 네 모서리를 wax로 찍은 다음 난자를 네 모서리의 중간에 놓고 살며시 눌러주었다. 1% acetic-orcein을 Cover glass 가장자리에 한 두 방울 떨어뜨리고 반대편에 여과지를 대어서 모세관 현상에 의해서 염색액이 이동하도록 하면서 약 5분 동안 염색하였다. 염색 후에는 위상차 현미경(200~400×)에서 관찰하였다.

### 통계분석

실험결과의 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) Procedure를 적용하여 각 요인의 Least square means와 Standard error(SE)를 구한 후 요인간의 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### BCB 처리가 체외발달에 미치는 영향

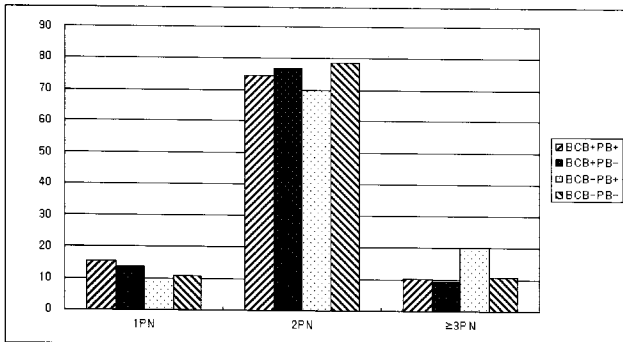
BCB 유해성 여부를 판단하기 위하여 26  $\mu$ M 농도의 BCB 용액에 90분 동안 처리하여 대조군과 비교한 결과는

**Table 1. Developmental confidence of IVM/IVF porcine embryos after incubation in BCB treated maturation medium**

Treatment	No. of oocytes	% of embryo		
		2-cell	8-cell	Blastocyst
Control	240	82.08±0.96	41.25±1.75	19.58±1.99
BCB treated	180	80.63±1.48	43.13±1.88	18.75±2.27

mean±SE.

Values within columns are not significantly different( $p<0.05$ ).



**Fig. 1. Effect of oocytes selection according to BCB staining or polar body extrusion on sperm penetration of porcine oocytes *in vitro*.** BCB+; blue colored, BCB- ; unstained, PB+ ; 1st polar body extruded, PB- ; no polar body. Values are not significantly different ( $p<0.05$ ).

Table 1에서 나타난 바와 같다. 체외수정 후 배반포로의 발달율은 대조군 19.58±1.99%에 비하여 BCB 처리군 18.75±2.27%로 두 처리군 간에는 유의차( $p<0.05$ )가 나타나지 않아 BCB 처리는 체외성숙 및 체외수정란 후의 배 발달율에 영향을 미치지 않았다고 판단되어진다.

**BCB 염색 방법과 극체 유무에 의한 난포란 선별 방법이 수정율에 미치는 영향**

난포란을 BCB로 염색한 후 염색이 된 난자(BCB+)와 염색되지 않은 난자(BCB-)로 나누고, 극체의 방출 여부(PB+, PB-)에 따라 나는 다음 체외수정을 실시하여 수정율에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1). 두 개의 전핵이 형성된 수

정란(2PN)을 정상수정란, 3개 이상의 전핵이 형성된 수정란(≥3PN)을 다정자 침입수정란으로 판정하였으며, 1개의 전핵(1PN)은 미수정란으로 판정하였다. 정상수정율은 70.0~78.4% 범위로 각각 처리구간에는 유의적인 차이가 없었으며, 다정자 침입을 또한 유의차( $p<0.05$ )가 나타나지 않았다.

**BCB 염색 방법과 극체 유무에 의한 난포란 선별 방법이 체외발달에 미치는 영향**

체외성숙 후 BCB 염색 여부와 극체 방출 유무에 의한 난포란 선별 방법이 체외수정 후 수정란의 발달율에 미치는 영향을 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 2-cell까지의 발달율은 BCB+PB+처리군이 다른 처리군에 비해서 유의적으로( $p<0.05$ ) 높은 발달율을 나타내었다. 배반포로의 발달율은 푸른색으로 착색되고 극체가 방출된 난자(BCB+PB+) 처리군이 20.71±0.45%이었고, 착색되지 않고 극체가 방출된 난자(BCB-PB+) 처리군이 20.04±1.29%으로 다른 처리군에 비하여 유의적으로 ( $p<0.05$ ) 높았다.

**고 찰**

Brilliant cresyl blue (BCB)는 돼지, 산양 및 소 등의 난자를 선별하는 방법으로 이용되어져 왔는데, glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)의 activity를 측정하는 것으로, 이 효소는 성장하는 난자에서는 활성이 높으나(Mangia and Epstein, 1975) 성장을 멈춘 난자에서는 활성화 되지 않는 특성을 가지고 있다(Wassarman, 1988). BCB 농도

**Table 2. Effect of oocytes selection according to BCB staining or polar body extrusion on development of porcine oocytes *in vitro***

Treatment	No. of oocytes	% of embryo		
		2-cell	8-cell	Blastocyst
BCB+PB+	1,820	83.74±0.49 <sup>a</sup>	43.19±0.55 <sup>a</sup>	20.71±0.45 <sup>d</sup>
BCB+PB-	680	69.26±1.23 <sup>c</sup>	33.68±1.34 <sup>c</sup>	13.24±0.73 <sup>b</sup>
BCB-PB+	201	76.29±2.03 <sup>b</sup>	38.99±1.99 <sup>b</sup>	20.04±1.29 <sup>a</sup>
BCB-PB-	400	58.50±1.71 <sup>d</sup>	23.25±1.27 <sup>d</sup>	7.25±0.77 <sup>c</sup>

<sup>a-d</sup> Within a column, means with different superscripts are significantly different( $p<0.05$ ).

BCB+; blue colored, BCB- ; unstained, PB+ ; 1st polar body extruded, PB- ; no polar body.

결정을 위한 본 연구실의 선행 시험에서 13 uM의 농도로 염색하였으나 착색이 희미하여 명확한 판단이 어려웠다. Ericsson 등(1993)과 Roca 등(1998)은 돼지 난자를 이용한 실험에서 13 uM 농도의 BCB를 이용하였으나, Manjunatha 등(2007)은 Buffalo를 이용한 실험에서 13 uM 농도는 BCB 발현율이 10%에 그침으로써 발현율이 낮다고 하였다. 또한, 그들은 23 uM과 39 uM에서는 57.2%와 61.8%로 유의적으로 높게 발현되었으며, 높은 농도의 BCB도 난자의 발달에 무해하다고 보고하였다. 본 시험에서도 26 uM의 농도를 이용한 결과, 80.6%의 BCB 발현율을 나타내어 Ericsson 등(1993)의 91%보다 약간 낮았으나 Roca 등(1998)의 81%와 유사한 결과를 얻었다. 체외성숙된 난자에 BCB 염색처리 후 체외수정-체외배양한 결과, 대조구의 배발달율 19.58±1.99와 비슷한 18.75±2.27%의 발달율을 나타내어 BCB 처리가 배발달에 무해함을 증명하였다.

Manjunatha 등(2007)은 BCB- 난자가 BCB+ 난자에 비하여 유의적으로 polyspermy 비율이 높았다고 하였는데 (16.2±4.6 : 3.2±1.8%,  $p<0.05$ ), 이러한 이유는 낮은 핵 성숙율이 불완전하거나 비정상적인 세포질 성숙을 야기할 수 있기 때문이라고 하였으며, 이럴 경우 정자 침투율도 낮아진다고 하였다. 본 연구에서는 BCB 발현 여부 및 극체 발현 여부에 관계없이 미수정, 정상수정 및 polyspermy 비율에 차이가 나타나지 않았다.

김 등(2007)은 돼지 난자의 체외성숙 후 형태적으로 선별하거나 극체 방출란을 선별하여 활성화 처리 후 배발달율을 검토한 결과, 정상 분할율은 52.6%와 73.1%로 극체방출란이 높았다고 하였다. 또한, 체외 성숙된 난모 세포를 형태적으로 선별한 처리구는 16.7%가 배반포기로 발달하였으나 극체 방출란을 선별하여 활성화 처리한 구는 39.0%가 배반포기로 발달하였다고 보고하여, 극체 방출란만을 선별하여 12~36시간 사이에 분할하는 난자들만을 선별하여 배양한다면 배발생능을 가진 난자들의 비율을 높일 수 있을 것으로 보고하였다. 또한, Somfai 등(2005)에 의하면 돼지 난포란은 체외성숙 후 75.4%가 polar body를 방출하였으며, 극체 미방출군(PB-)과 비교하였을 경우 체외수정 후 정자침입율, 정상수정을 및 2~4세포기 분할율에는 두 처리군간에 차이가 없었으며, 배반포로의 발달율은 polar body 방출군(PB+)이 31.7%로 극체 미방출군(PB-)의 20.7%에 비해 유의적으로 높은 발달율을 나타내었다고 보고하였다.

본 연구에서는 BCB 염색 여부와 극체 방출 여부를 동시에 고려하여 선별한 결과, 정상 수정률에는 영향을 미치지 않았으나 분열과 배반포로의 발달율은 유의적( $p<0.05$ )인 차이를 나타내었는데, 푸른색으로 착색되고 극체가 방출된 난자(BCB+ PB+) 처리구가 20.71±0.45%, 착색되지 않고 극체가 방출된 난자(BCB- PB+) 처리구가 20.04±1.29%로 다른 처리구에 비하여 유의적으로 ( $p<0.05$ ) 높은 발달율을 나타내었다. 이러한 결과를 BCB 염색 여부에 따라 선별할 경우의 배 발달율(18.7%)보다 극체 발현 여부에 따라 선별할 경우의 배 발달율(20.6%)이 높았다는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 극체 방출 여부로 선별하는 방법이 BCB 선별법보다 더 나은 방법인 것으로 사료되지만 시간과 노력이 많이 소요된다는 단점이 있다. 따라서 제한된 시간에 많은 수의 난포란을 체외수정용으로 사용할 경우 BCB 염색을 통하여 선별한다면 체외발달율을 높일 수 있는 방법이 될 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합할 때 다수의 난포

란을 선별할 경우 BCB 염색 방법을 이용하고, 적은 수의 난포란을 선별할 경우에는 극체 방출 여부를 고려하여 선별하는 것이 더 나은 방법으로 사료된다.

## 인용문헌

1. Alm H, Torner H, Löhrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W (2005): Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63:2194-2205.
2. Anguita B, Vandaele L, Mateusen B, Maes D, Van Soom A (2007): Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology* 67:537-549.
3. De Loos F, van Maurik P, van Beneden T, Kruip Th-AMA (1992): Structure aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 31:208-214.
4. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G (2003): Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development : A review. *Hum Reprod Update* 9:251-262.
5. Ericsson SA, Boice ML, Funahashi H, Day BN (1993): Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology* 39:214.
6. Gordon I (2003): Receiving the bovine oocyte. In: *Laboratory Production of Cattle Embryos (Biotechnology in Agriculture No. 27)* 2nd ed. Cambridge, UK: CAB International Cambridge University Press. pp 79-111.
7. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adam A, Fair T, Boland MP (2003): Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Dom Anim* 38:259-267.
8. Manjunatha BM, Devaraj M, Ravindra JP, Nandi S (2007): Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology* 68:1299-1304.
9. Mangia F, Epstein CJ (1975): Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Dev Biol* 45:211-220.
10. Nicholas B, Alberio R, Fouladi-Nashta AA, Webb R (2005): Relationship between low-molecular weight insulin-like growth factor-binding proteins, caspase-3 activity and oocyte quality. *Biol Reprod* 72:796-804.
11. Roca J, Martinez E, Vazquez JM, Lucas X (1998): Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reprod Fertil Develop* 10:479-485.
12. Pujol M, Lopez-Bejar M, Paramio MT (2000): Selection

- of immature oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 53:466.
13. Pujol M, Lopez-Bejar M, Meterns MJ, Rodriguez-Gonzales E, Venilla E, Paramio MT (2004): Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue(BCB) test. *Theriogenology* 61:735-744.
  14. Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Velilla E, Paramio MT (2002): Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57:1397-1409.
  15. Somfai T, Kikuchi K, Medvedev S, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Sato E, Nagai T (2005): Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arranged before the metaphase-II stage and fertilized *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 90:307-328.
  16. Wassarman M (1988): The mammalian ovum *In*: E. Knobil and D. Neil, Editors, *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, Raven Press, NY, USA, pp 69-102.
  17. 김현중, 조상래, 최창용, 최선호, 한만희, 손동수, 이승수, 상병돈, 류일선, 김인철, 김성재, 김일화, 김상근, 임경순 (2007): 돼지 난모세포의 Ethanol 처리에 의한 단위발생에 있어서 극체방출란과 분할란 선별에 따른 배발달을 비교. *한국수정란이식학회지* 22:121-126.
  18. 정기화, 허태영, 곽대오, 박충생, Day BN (1999): 돼지난자의 직경이 체외성숙 및 체외발달에 미치는 영향 *한국수정란이식학회지* 14:17-22.
- (접수일자: 2009. 2. 27 / 채택일자: 2009. 3. 20)