

肉牛受精卵 簡易凍結 및 融解方法에 관한 研究

— 耐凍劑에 sucrose 添加에 따른 液體窒素 container에서 諸凍結方法이 mouse 受精卵 生存率에 미치는 影響* —

金重柱 · 李揆勳 · 姜萬種 · 金登勳 · 文星浩 · 金承浩

Studies on Simplified Procedures for Freezing and Thawing of Bovine Embryos

— Effects of freezing procedures in a liquid nitrogen container on the survival rate of mouse embryos —

Kim, J. K., K. H. Lee, M. J. Kang, Y. H. Kim, S. H. Moon and S. H. Kim

SUMMARY

This study was done with mouse embryo to assess effects of freezing media containing sucrose, freezing methods (1-F 0.3°C/mim ; 2-F 3~5° C/mim ; 4-F, LN² vapour) and cell freezers on the embryo survival determined using the FDA test. The results are summarized as follows :

1. The FDA score obtained with 1, 2, 3 and 4-F was 3.8, 3.6, 3.2 and 3.2, respectively. There was a significant difference (P<0.05) between 1-F, 3-F and 2-F, 4-F.
2. The score at the morular stage (3.8) was higher (P<0.05) than the blastocyst stage of embryos(3.2).
3. No difference (P>0.05) was found between the score obtained with a automatic embryo freezer(4.0) and a liquid nitrogen container(3.7)

I. 緒 論

살아있는 細胞를 凍結하려는 많은 研究者들의 努力으로 1952年 Polge와 Rowson에 依하여 牛精液의 凍結保存이후, 現在 많은 나라에서 優秀한 種牡畜을 利用한 人工授精이 普遍化되고 있다.

한편, 受精卵移殖 研究에서도 1972年 Whittingham이 mouse 受精卵을 -196°C까지 凍結後 移殖한 結果의 受胎率을 報告한 以後부터 현재에 이르

면서 低溫生物學의 發達과 더불어 急速히 發展되었다. 初期의 研究에서는 耐凍劑를 使用하여 緩慢凍結方法으로 受精卵을 凍結保存하였으며(Whittingham, Leibo와 Mazur, 1972 ; Wilmut, 1972), 이러한 方法은 凍結時 細胞內 自由水의 脫水로부터 氷形成을 減少시킬수 있다는 理論(Mazur, 1970)에 基礎를 둔 것이다.

最近에는 細胞內 浸透되지 않고 滲透壓 충격을 緩衝시켜 細胞膜을 保護하는 sucrose를 使用하여

* 本 論文은 韓國家畜繁殖學會誌 12(2) : 72~78(1988)에 게재 되었음.

凍結前 predehydration을 시키므로서 mouse 受精卵에서急速凍結의 가능성을提示하고 있으며(Chupin과 Reviere, 1986; William과 Johnson, 1986; 宮本 등, 1986; Miyamoto 등, 1986), 이러한方法에依하여 bovine 受精卵(Leibo, 1983; Nieman, 1985; Bielanski 등, 1986)에서도 많은研究가發表되었다.

한편, Kasai(1980)를 비롯하여 Miyamoto와 Ishibashi(1983)는 mouse stage 受精卵, Renard 등(1984)은 家兎 stage 受精卵에서 2단계 동결법을 試圖하였으며, 그外 William과 Johnson(1985), Krag 등(1985), Frank 등(1985), 宮本 등(1986)에依하여 sucrose를 利用 液體窒素 Container 内에서 簡便한 凍結方法을 提示하였고, Rall과 Fahy(1985)는 高濃度 耐凍劑 保護物質(vitrification solution)을 製造하여 LN₂ container 蒸氣로 直接凍結에 成功(松本 등, 1987; HSU 등, 1986)하므로써 앞으로 더욱 劃期的인 受精卵 凍結方法이 開發될 것으로 期待된다.

本 研究는 大家畜 受精卵移植에 利用할 目的으로 mouse 受精卵의 LN₂ container 内에서 여러가지 凍結方法을 比較하여 가장 適合하고 簡便한 方法을 選擇하고 이를 自動 卵子凍結器의 成績과 比較하여 簡易凍結 可能性 如否를 把握하고자 實施되었다.

II. 材料 및 方法

供試動物은 7週 以上の 雌性 ICR係 mouse를 使用하였으며, 飼育室의 溫度는 18~28°C로 維持하였고, 飼養管理는 配合飼料를 自由採食시켰다. 實驗時 體重은 20~30g이었다. 過排卵 誘起를 爲하여 腹腔 内에 5IU의 PMSG(三工社, 日本)를 注射하고 48時間 後 同量의 HCG를 注射하고 同一系統의 雄性 mouse를 1:1로 合舍하여 自然交尾를 誘導하였으며, 翌日 아침 際에서 陰栓을 確認하였던 個體만을 實驗에 使用하였다.

受精卵의 採卵은 HCG注射 後 72~80時間에 屠殺하여 卵管과 子宮을 切取한 後 m-PBS로 子宮을 관류하는 것으로 morula를 회수하였다. 回收된 受精卵은 實體顯微鏡下에서 形態의 正常卵子를 選別하여 凍結에 利用하였다.

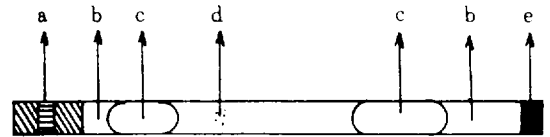


Fig. 1. Freezing apparatus with straw loaded as indicated

- a) cotton plug
- b) freezing solution (10% glycerol + 10% sucrose + PBS + 20% serum)
- c) air bubble
- d) freezing solution + embryos
- e) straw powder plug

凍結液으로는 10% glycerol, 10% sucrose와 20% donor serum(非働化시킴)을 含有하고 있는 PBS를 製造하여 Leibo(1983)가 使用한, 즉 受精卵를 直接 凍結液에서 平衡시키는 one-step 方法으로 5分間 平衡하였다.

平衡이 끝난 受精卵은 straw内에 Fig. 1과 같은 順序로 5~15個의 受精卵을 封入하였다.

受精卵의 凍結은 세포동결기(R204, planer product, England)와 30ℓ 액체질소(LN₂) container를 使用하였다.

溫度確認은 凍結液으로 채운 straw를 세포동결기 의 sensor에 끼워서 固定後 Auto-recorder로 確認하였고, 다음과 같이 凍結시켰다.

1-F; 常溫에서 -7°C까지는 1°C/min 下降시킨 後 植氷(seeding)하고 5分동안 靜置한 다음 -35°C까지는 0.3°C/min 凍結하여 液體窒素에 container에 浸漬보전하였다.

2-F; 植氷 後 5分 靜置까지는 "I-F"와 同一하게하고 -35°C까지는 3°C/min 下降시킨 다음 -80°C까지는 5°C/min씩 凍結하였으며 液體窒素에 浸漬 保存하였다.

3-F; 植氷 後 5分 靜置까지는 "I-F"와 같고 -80°C까지는 15°C/min씩 동결하여 液體窒素에 浸漬 保存하였다.

4-F; 植氷 後 5分 靜置까지는 "I-F"와 같고 바로 液體窒素에 浸漬 保存하였다.

受精卵의 融解는 38°C 溫水에서 氷片이 完全히 녹을때까지 實施하였으며 時間은 約 10秒였다.

耐凍劑 除法는 PBS에 10% sucrose를 添加시킨 것을 除法液으로 하여 添加方法과 同一한 one-step 方法으로 5分間 平衡하여 glycerol을 除法하였다. 耐凍劑 除法가 끝난 受精卵의 生死判定은 diacetyl fluorecence(FDA) 1mg을 aceton 1ml에 녹인 다음 이것을 PBS 液에 600,000對 1로 稀釋(pH 7-7.4)한 FDA液에 受精卵를 넣고 常溫에서 3~5分동안 培養한 後 FDA가 없는 PBS液에 옮겨 200倍 位相差 螢光顯微鏡에서 다음과 같이 六段階 score로 判定하였으며 이를 平均點數로 算出하였다.

P-5; 受精卵의 分割球 全體가 綠色螢光을 強하게 發散하는 것(5點: 100%).

P-4; 受精卵 分割球 中 80% 以上 綠色螢光을 띠는 것(4點: 80%).

P-3; 受精卵 分割球 中 60% 以上 綠色螢光을 띠는 것(3點: 60%).

P-2; 40% 以上 分割球 綠色螢光을 發散하거나 또는 全般的으로 弱하게 螢光을 發하는 것(2點: 40%).

P-1; 20% 以上 分割球 綠色螢光을 發하거나 分割球가 매우 弱하게 螢光을 發하는 것(1點: 20%).

N-0; 綠色螢光이 전혀 띠지 않고 어둡게 보이는 것(0點: 0%).

III. 結果 및 考察

凍結液에 sucrose를 添加하고 LN₂ container에서 凍結을 實施한 mouse 受精卵 生死를 FDA-test로 比較한 것은 Table 1과 같다.

緩慢凍結(1-F)은 P-5가 62.7%로 處理區 中 가장 優秀하였으며, P-3; 20.3%, N-0; 60%, 平均 score 3.8(76%)로 가장 좋은 成績을 보여주었다.

2-F(急·緩慢凍結)에서는 P-5; 48.3% P-3; 22.1%, N-0; 21.8%의 成績으로서 N-0에서 處理區 中 가장 높은 數值를 나타내어 주었으나, 平均 score는 3.2(64%)였다.

3-F(急速凍結)은 P-5; 49.4%, P-3; 35.1%, N-0; 11.7%로 平均 score 3.6(72%)을 나타내 1-F보다는 약간 低調하나 2-F와 4-F보다는 良好하였다.

Table 1. Effects of various freezing procedures by liquid nitrogen vapour(container) on mouse embryo survival evaluated by FDA-test in mice.

Freezing procedure	No. of embryos frozen	No. and(%) of survival embryos evaluated by FDA-test				Score
		P-5	P-3	P-1	N-0	
1-F ^a	217	136 (62.7)	44 (20.3)	22 (10.1)	15 (6.9)	3.8
2-F ^b	344	166 (48.3)	76 (22.1)	27 (7.8)	75 (21.8)	3.2
3-F ^c	231	114 (49.4)	81 (35.1)	9 (3.9)	27 (11.7)	3.6
4-F ^d	166	68 (40.9)	54 (32.5)	23 (13.9)	21 (12.7)	3.2
^a ; Room temp. → -7°C (1°C/min)		5 min seeding → -35°C (0.3°C/min)	→ -196°C			
^b ; Room temp. → -7°C (1°C/min)		5 min seeding → -35°C (3°C/min)	→ -80°C (5°C/min) → -196°C			
^c ; Room temp. → -7°C (1°C/min)		5 min seeding → -80°C (15°C/min)	→ -196°C			
^d ; Room temp. → -7°C (1°C/min)		5 min seeding → Rapid freezing by LN ₂ vapour for 5 min	→ -196°C			

Table 2. Effects of various freezing procedures by liquid nitrogen vapour on morula and blastocyst stages of mouse embryos survival evaluated by FDA-test

Freezing procedure	No. of embryos frozen		Morula stage				Score	Blastocyst stage				Score
	M	B	P-5	P-3	P-1	N-0		P-5	P-3	P-1	N-0	
			(%)	(%)	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)	
1-F	87	112	61 (72.6)	16 (19.0)	6 (7.1)	1 (1.2)	4.3	69 (61.6)	27 (24.1)	15 (13.4)	1 (0.9)	3.9
2-F	77	117	39 (50.6)	14 (18.2)	5 (6.5)	19 (24.7)	3.1	38 (32.5)	36 (30.8)	21 (17.9)	22 (18.8)	2.7
3-F	92	165	55 (59.8)	25 (27.2)	5 (5.4)	7 (7.6)	3.9	71 (43.0)	58 (35.2)	21 (12.7)	15 (9.1)	3.3
4-F	85	81	45 (52.9)	26 (30.6)	9 (10.6)	5 (5.9)	3.7	22 (27.2)	33 (40.7)	20 (24.7)	6 (7.4)	2.8

超急速凍結인 4-F는 P-5가 40.9%로 各處理中 가장 低調하였으며, P-3; 32.5%, N-0; 12.7%로 平均 score는 2-F와 同一한 3.2(64%)를 나타내었다(P<0.05).

Table 2를 χ^2 統計處理한 結果 有意性이 나타났으므로(P<0.05) 1-F와 3-f 凍結方法은 2-F와 4-F보다 優秀하였으나 2-F가 3-F보다 若干 떨어진 것은 考慮하여 볼 것으로 생각된다.

本 研究의 結果는 緩慢凍結에서 Massip 等(1984)이 sucrose를 添加하여 分當 0.3°C의 凍結한 後 融解시켜서 85.7%의 높은 生存率을 보고한 것 보다는 若干 높은 成績이었고 Lehn-Jensen(1983), Leibo(1985) 등이 牛受精卵에서 44%前後의 生存率보다는 優秀하였다.

그리고 急·緩慢凍結에서는 Bank와 Maueree(1974), Tsunoda와 Sugie(1977)가 sucrose를 使用하지 않고 家兔受精卵에서 47-67%의 生存率의 보고와 本 研究는 類似한 成績을 보이고 있으며 mouse 受精卵에서도 Wilmut(1972), 柳와 李(1984) 등과도 거의 一致된 傾向을 보이고 있다.

또한, 이미 보고된 家兔(第四報)에서 sucrose를 添加하여 凍結한 成績(score: 3.2)과 거의 同一한 結果를 보였다.

그리고 本 實驗의 各 處理區 中 가장 낮은 成績에 關한 原因에 對해서는 좀 더 檢討되어야 할 것으로 생각된다. 急速凍結에 있어서는 Kasai 等 (1980)이

sucrose를 添加하여 17°C/min로 凍結, 融解하여 82%의 生存率을 報告한 것과 Renard(1984)가 家兔受精卵에서 88%의 生存率을 보고한 것 보다는 低調하였으나, 이것도 역시 家兔에서의 成績(第四報)과 類似하였다.

超急速凍結에서는 Chupin과 De Reviers(1986), Williams와 Johnson(1985) 등이 報告한 79.6%, 84%의 生存率과, Szell과 Shelton(1987)이 5.0M glycerol에 0.5M sucrose를 添加한 PBS를 凍結液으로 使用하여 直接 液體素에 넣어서 凍結한 95%의 生存率 보다는 큰 差異를 보이고 있다.

이러한 傾向을 綜合적으로 考察하여 보면, 上記 研究者들은 急速凍結에서 本 研究의 成績보다 높은 數値를 보이는 것은 諸 要因이 있겠으나, 本 研究計劃當時 緩慢凍結을 基準으로 凍結液에 10% glycerol, 10% sucrose를 添加시킨 反面, Chupin과 Reviers는 2.8M glycerol과 0.5M sucrose를, Williams와 Johnson(1986)은 2.0M glycerol과 0.5M sucrose를, Szell과 Shelton(1987)은 glycerol이 4.0~5.0M에서 sucrose가 0.25~0.5M인 凍結液을 利用하여 좋은 成績을 報告하였으며, 앞으로 急速凍結을 目的으로 glycerol과 sucrose 濃度を 增加시켜 이에 따른 諸般 實驗이 遂行되어야 할 것으로 思料된다.

Table 2는 凍結 過程別 卵子 發育狀態에 따른 生存率을 FDA-test로 나타낸 것으로, 1-F에서는 桑實胚期의 P-5가 72.6%로 全處理區 中에서 가장

Table 3. Effects of freezing procedures between cell freezer and LN₂ container on mouse embryos survival evaluated by FDA-test

Method of freezing	No. of embryos frozen	No. and (%) of survival embryos evaluated by FDA-test						Score
		P-5	P-4	P-3	P-2	P-1	N-0	
Cell ^a freezer	167	95 (57)	29 (17)	23 (14)	6 (4)	1 (1)	12 (7)	4.0
LN ₂ ^b container	142	79 (56)	5 (4)	31 (22)	3 (2)	13 (9)	11 (8)	3.7

a, b; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5 min seeding → -35°C (0.3°C/min) → -196°C

優秀하였으며, 平均 score는 4.3(86%)으로 胞胚期의 3.9(78%)보다 좋은 成績을 나타내었다.

한편, N-0에서는 胞胚期가(0.9%)가 가장 낮은 數値를 보여주고 있다. 2-F에 있어서는 桑實胚期가 score 3.1(62%)로 胞胚期 2.7(54%)보다 良好한 成績을 보여주고 있으며 桑實胚의 N-0에서 24.7%로 가장 많은 受精卵이 죽은 것으로 나타났다.

한편, 3-F에서도 胞胚期가 3.3(66%)의 score로 桑實胚期의 3.9(78%)보다 低調하였고, 4-F에서는 桑實胚期가 3.9(74%)로 胞胚期의 2.8(56%)보다는 큰 差異를 提示하고 있다.

이를 綜合的으로 比較하면 桑實胚期는 平均 score 3.8(76%)로 胞胚期의 平均 score 3.2(64%)보다 높은 生存率을 보여 주었다(P<0.1).

上記 成績의 結果는 Kasai等(1982)이 報告한 緩慢凍結時 桑實胚期에서 64-70%의 生存率을, 急速凍結에 있어서 20-39%의 生存率보다 優秀하였으며, Nieman(1985)은 bovine 受精卵을 利用하여 桑實胚에 46.2%, 胞胚期에서 54.2%로 本 研究와 相異한 傾向을 보이고 있다. 또한 最近에는 Szell과 Shelton(1987)은 8-16細胞期를 가지고 急速凍結時 90% 以上の 成績을 報告하고 있고, Tsunoda等 (1982), Rall과 Polge(1985), Nieman(1985)은 可及的 좋은 外貌와 明確한 分割球 狀態를 나타내어야 凍結後 生存率과 受胎率이 높다고 하였다. 이러한 것으로 볼 때 學者에 따라 相異한 報告를 하고 있으며 凍結液, 凍結速度 및 方法에 따라 受精卵 發育狀態別 生存率에 差異가 있을 것으로 생각되며 더욱더

多様な 研究를 遂行하여 明確한 結論을 얻어야 될 것으로 思料된다.

Sucrose를 添加한 後 緩慢凍結에 依한 세포동결기 自動凍結과 液體窒素 container에서의 凍結을 比較한 成績은 Table 3에 提示된 바와 같이 세포동결기에서 緩慢凍結하였을 때는 P-5; 57%, P-4; 17%, P-3; 14%, N-0; 7%로 平均 4.0(80%)의 score를 나타내고 있으며, LN₂ container에서는 P-5; 56%, P-4; 4%, P-3; 22%, N-0; 0%, 平均 score는 3.7(74%)로 세포동결기의 自動凍結과는 若干 差異가 있었으나 有意性은 없었다. 더욱이 LN₂ container에서 凍結時가 세포동결기에서보다 生存率이 높은 境遇도 있었으며, computer 대신 人力이 所要되었으나 經濟性을 比較할 때 相互間 長短點이 있었다.

本 成績의 結果를 考察하여 보면, Frank等(1985)이 bovine 受精卵에서 세포동결기로 凍結時 27.4%, LN₂ container 凍結의 26.6%와는 有意性이 없다고 보고한 것과 一致하고 있으며, 세포동결기의 凍結과 LN₂ container의 凍結에 있어서 같은 凍結速度로 凍結을 遂行한다면 經濟的인 液體窒素 凍結이 效果的으로 利用될 수 있는 可能性을 가져다 주었다.

또한 Williams와 Johnson(1985) 등은 LN₂ container를 이용했던 mouse 受精卵의 凍結後 85%의 높은 生存率을 報告하였으며, 또 container 凍結方法이 빠르고 經濟的인 利點이 있어서 凍結의 簡單한 野外方法을 開發하여 家畜에 적용할 수 있다고 지적하였다. 그리고 Krag等(1985), 宮本等(1986)도 0.5

M sucrose를 添加한 동결액을 이용하여 murine과 mouse胚에서 67~89%의 生存率을, Chupin과 Reviere(1986)는 rat에서 84~87% 生存率을 보고하여 LN₂ container 凍結 可能性을 提示하였으며 凍結前 卵자를 predehydration과 sucrose dilution이 開發 되어야 될 것으로 생각된다.

IV 摘要

耐凍劑에 10% sucrose를 添加하여 液體窒素(LN₂) container에서 諸 凍結方法(1-F; 0.3°C/min, 2-F; 3-5°C/min, 3-F; 15°C/min, 4-F; LN₂ container 蒸氣)을 比較한 後, 여기서 生存率이 높고 適合한 凍結方法을 選擇하고 이를 受精卵 自動凍結器의 成績과 比較하므로써 簡易凍結 如否를 究明하기 爲하여 實驗을 實施한 要約은 다음과 같다.

1. Glycerol 添加液과 除法液에 sucrose를 添加하고 LN₂ container에서 凍結할 때, 凍結速度에 따른 FDA-test score의 順位는 1-F(3.8), 3-F(3.6), 2-F(3.2) 그리고 4-F(3.2)였으며 處理別 有意性이 나타났다(P<0.05).

2. LN₂ container에서 凍結시킬 때, 桑實胚期의 胚(3.8)가 胞胚期의 胚(3.2)보다 生存率이 높았다(P<0.05).

3. 10% sucrose를 glycerol 添加液과 除法液에 添加하여 卵子 自動凍結器와 LN₂ container에서 凍結할 때 score는 各各 4.0, 3.7로 有意性은 없었다.

V 引用文獻

- 1 Bank, H. and R.R. Maurer. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Expl. Cell. Res.*, 89 : 188-196
- 2 Bielanski, A., V. Schneider, V.P. Pawlyshyn, and R.J. Mapletoft. 1986. Factors affecting survival of deep frozen bovin embryos in vitro; The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. *Theriogenology*, 25 : 429-437
- 3 Chupin, D. and M.M. De Reviere. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26 : 157-166.
- 4 Frank, G.C., S.L. Goley, B. Betterbed, R.D. Page. 1985. The effects of cryoprotective agents, dilution rates, freezing rates and freezing units on the survival of bovine embryos. *Theriogenology*, 23 : 194.
- 5 Hsu, Teng-Tsal., Yamkawa, Yamanoi and Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 32 : 29-32.
- 6 Kasai, M. K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59 : 51-56.
- 7 Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1982. Survival of rat embryos after freezing. *J. Reprod. Fert.*, 66 : 367-370.
- 8 Krag, K.T., I.M. Koehler and R.W. Wright, Jr. 1985. A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 23 : 199.
- 9 Lenn-Jensen, H. 1983. Survival of cow blastocyst using rates of 1°C/min to -25°C before plunging. *Theriogenology*, 19 : 138.
- 10 Leobo, S.P. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovin embryos. *Theriogenology*, 23 : 201.
- 11 Massip, A., P. Van Der Zwalm, F. Puissant, M. Camus and F. Leroy. 1984. Effects of in vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. *J. Reprod. Fert.*, 71 : 199-203.
- 12 Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Solid CO₂ freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 67 : 107-111.
- 13 Miyamoto, H., Y. Miyamoto and T. Ishibashi. 1986. The importance of equilibration time to glycerol prior to in the cryopreservation of mouse embryos. *Japan. J. Zootech. Sci.*, 57 :

- 250-256.
- 14 Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos ; Effects of a one-step dilution or 1.4M glycerol. *Theriogenology*, 23 : 369-379.
 - 15 Rall, W.P. and G.M. Fahy. 1985. Vitrification ; A new approach to embryos cryopreservation. *Theriogenology*, 23 : 220-221.
 - 16 Renard, J.P., B.X. Nguyent and V. Garnier. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.*, 71 : 573-580.
 - 17 Reneard, J.P., Y. Hehman, P. Leymonie and J. C. Plat. 1983. Sucrose dilution ; A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 19 : 145.
 - 18 Szell, A. and J.N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 ; 699-703.
 - 19 Tsunoda, Y. and T. Sugis. 1977. Survival of rabbit eggs preserved in plastic straw in liquid nitrogen. *J. Reprod. Fert.*, 49 : 173-174.
 - 20 Tsunoda, Y., T. Soma and T. Sugie. 1982. Effects of postovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morulae. *J. Reprod. Fert.*, 65 : 483-487.
 - 21 Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to 196°C and -296°C. *Science*, 178 : 411-414
 - 22 Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23 : 235.
 - 23 Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 26 : 125-133.
 - 24 Wilmut, U. 1972. The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*, 11 : 1071-1079.
 - 25 柳俊熙, 李在根. 1984. Rat 受精卵의 凍結保存에 있어, 凍結速度 및 凍害防止劑에 관한 研究. 韓國家畜繁殖研究會報 8 : 22~28.
 - 26 松本徹郎, 石渡学, 山井淳子, 山川宏, 近藤ゆり, 川手秀一, 尾川昭三. 1987. vitrification 法で凍結融解されたマウス胚における ; 胚の生存性に対する sucrose 稀釋の效果, 家畜繁殖誌. 33 : 200~205.