

# 肉牛受精卵簡易凍結 및 融解方法에 關한 研究\*

第Ⅱ報 : 耐凍劑에 sucrose 添加에 따른 液體窒素 container 에서  
諸 凍結方法이 mouse 受精卵 生存率에 미치는 影響

金重桂 · 李揆勳 · 姜萬鍾 · 金瑩勳 · 金承浩

## Studies on Simplified Procedures for Freezing and Thawing of Bovine Embryos

Ⅱ. 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 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/min; 2-F, 3-5 °C/min; 3-F, 15 °C/min; 4-F, LN<sup>2</sup> 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).

### 序 論

살아있는 細胞를 凍結하려는 많은 研究者들의 努力으로 1952年 Polge 와 Rowson 에 依하여 牛 精液의 凍結保存 이후 現在 많은 나라에서 優秀한

種牝畜을 利用한 人工受精이 普遍化되고 있다.

한편, 受精卵移植 研究에서도 1972年 Whittingham이 mouse 受精卵을 -196 °C까지 凍結後 移植한 結果 受胎率을 報告한 以後부터 현재에 이르면서 低溫生物學의 發達과 더불어 急速히 發展되

濟州大學校 農科大學 (College of Agriculture, Cheju National University)

\* 本 研究는 1986년도 韓國科學財團의 지원에 의하여 수행되었으며 韓國家畜繁殖學會誌 12(2): 65~71 (1988)에 掲載되었음.

었다. 初期의 研究에서는 耐凍劑를 使用하여 緩慢凍結 方法으로 受精卵를 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시킬 수 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 凍結前 predehydration을 시킴으로써 mouse 受精卵에서 急速凍結의 可能性을 提示하고 있으며(Chupin과 Reviere, 1986; William과 Johnson, 1986; 宮本 等, 1986; Miyamoto 等, 1986), 이러한 方法에 依하여 bovine 受精卵(Leibo, 1983; Renard 等, 1983; Nieman, 1985; Bielanski 等, 1986)에서도 많은 研究가 發表되었다.

한편, Kasai (1980)를 비롯하여 Miyamoto와 Ishibashi (1983)는 mouse 受精卵, Renard 等(1984)은 家兔 受精卵에서 2 단계 동결법을 試圖하였으며, 그 外 Williams와 Johnson (1985), Krag 等(1985), Frank 等(1985), 宮本 等(1986)에 依하여 sucrose를 利用 液體窒素 container 內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 LN<sub>2</sub> container 蒸氣로 直接凍結에 成功(松本 等, 1987; Hsu 等, 1986)함으로써 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를 LN<sub>2</sub> container 內에서 여러가지 凍結方法으로 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.

## 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℃로 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 腹腔內에 5 IU의 PMSG(三共社, 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 體에서 臍栓이 確認된 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 灌流하는 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.

凍結液으로는 10% glycerol, 10% sucrose와 20% doner serum(非働化시킴)을 含有하고 있는 PBS를 製造하여 Leibo (1983)가 使用한 受精卵을 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 內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(R 204, planer product, England)와 30ℓ 액체질소(LN<sub>2</sub>) container를 使用하였다.

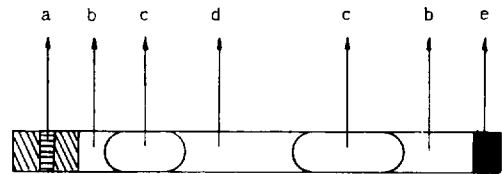


Fig. 1. Freezing apparatus with straw loaded as indicated.

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

溫度確認은 凍結液으로 채운 straw를 세포동결기의 sensor에 끼워서 固定 後 auto-recorder로 確認하였고, 다음과 같이 凍結시켰다.

I-F; 常溫에서 -7℃까지는 1℃/min F降시킨 後 植氷(seeding)하고 5分동안 定置한 다음

-35℃까지는 0.3℃/min 씩 凍結하여 液體窒素 container 에 浸漬保存하였다.

2-F ; 植水 後 5分 定置까지는 "1-F"와 同-하게 하고 -35℃까지는 3℃/min 下降시킨 다음 -80℃까지는 5℃/min 씩 凍結하였으며 液體窒素에 浸漬保存하였다.

3-F ; 植水 後 5分 定置까지는 "1-F"와 같고 -80℃까지는 15℃/min 씩 凍結하여 液體窒素에 浸漬 保存하였다.

4-F ; 植水 後 5分 定置까지는 "1-F"와 같고 바로 液體窒素에 浸漬 保存하였다.

受精卵의 融解는 38℃ 溫水에서 氷片이 完全히 녹을 때까지 實施하였으며 時間은 約 10秒였다.

耐凍劑 除去는 PBS에 10% sucrose 를 添加시킨 것을 除去液으로 하여 添加方法과 同一한 one-step 方法으로 5分間 平衡하여 glycerol 을 除去하였다. 耐凍劑 除去가 끝난 受精卵의 生死判定은 diacetyl fluorescence (FDA) 1mg 을 acetone 1 ml 에 녹인 다음 이것을 PBS 液에 600,000 對 1 로 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가 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% 以下 分割球가 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% ).

### 結果 및 考察

凍結液에 sucrose 를 添加하고 LN<sub>2</sub> container에 서 凍結을 實施한 mouse 受精卵 生死를 FDA - test 로 比較한 것은 Table 1 과 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;6.9% 平均 score 3.8 (76%)로 가장 좋은 成績을 보여 주었다.

**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 <sup>a</sup>	217	136 (62.7)	44 (20.3)	22 (10.1)	15 (6.9)	3.8
2 - F <sup>b</sup>	344	166 (48.3)	76 (22.1)	27 (7.8)	75 (21.8)	3.2
3 - F <sup>c</sup>	231	114 (49.4)	81 (35.1)	9 (3.9)	27 (11.7)	3.6
4 - F <sup>d</sup>	166	68 (40.9)	54 (32.5)	23 (13.9)	21 (12.7)	3.2

\*a ; Room temp. → -7℃ (1℃/min) 5 min seeding → -35℃ (0.3℃/min) → -196℃  
 b ; Room temp. → -7℃ (1℃/min) 5 min seeding → -35℃ (3℃/min) → -80℃ (5℃/min) → -196℃  
 c ; Room temp. → -7℃ (1℃/min) 5 min seeding → -80℃ (15℃/min) → -196℃  
 d ; Room temp. → -7℃ (1℃/min) 5 min seeding → Rapid freezing by LN<sub>2</sub> vapour for 5 min → -196℃

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數値를 나타내어 주었으나, 平均 score는 3.2(64%)였다.

3-F(急速凍結)는 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.

超急速凍結인 4-F는 P-5가 40.9%로各處理區中 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  $\chi^2$  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℃씩 凍結한 後 融解시켜서 85.7%의 높은 生存率을 보고한 것보다는 若干 높은 成績이었고 Lehn-Jensen(1983), Leibo(1985) 等의 牛 受精卵에서 44% 前後의 生存率 보다는 優秀하였다.

그리고 急緩慢 凍結에서 Bank와 Mauerer(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와 類似한 成績을 보이고 있으며 mouse 受精卵에서도 Wilmut(1972), 柳와 李(1984) 等 과도 거의 一致된 傾向을 보이고 있다.

**Table 2. Effects of various freezing procedures by liquid nitrogen vapour on morula and blastocyst stages of mouse embryo 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

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 좀더 檢討되어야 할 것으로 생각된다. 急速凍結에 있어서는 Kasai 等(1980)이 sucrose를 添加하여 17℃/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 것보다는 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) 等이 報告한 79.6%, 84%의 生存率과, Szell과 Shehon(1987)이 5.0 M glycerol에 0.5M sucrose를 添加한 PBS를 凍結液으로 使用하여 直接 液體窒素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% sucrose 를 添加시킨 反面, Chupin 과 Reviens 는 2.8M glycerol 과 0.5 M sucrose 를, Williams 와 Johnson (1986) 은 2.0 M glycerol 과 0.5 M sucrose 를 Szell 과 Shelton (1987) 은 glycerol 이 4.0~5.0 M에서 sucrose 가 0.25~0.5 M인 凍結液을 利用하여 좋은 成績을 報告하였으며, 앞으로 急速凍結을 目的으로 glycerol 과 sucrose 濃度를 增加시켜 이에 따른 諸般 試驗이 遂行되어야 할 것으로 思料된다.

Table 2 는 凍結 過程別 卵子 發育狀態에 따른 生存率을 FDA-test 로 나타낸 것으로, 1-F에서는 桑實胚期의 P-5 가 72.6%로 前處理區 中에서 가장 優秀하였으며 平均 score 는 4.3 (86%) 으로 胞胚期의 3.9 (78%)보다 좋은 成績을 나타내었다.

한편, N-0에서는 胞胚期의 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 score 로 桑實胚期의 3.9 (78%)보다 低調하였고, 4-F에서는 桑實胚期가 3.7 (74%)로 胞胚期의 2.8 (56%)보다는 큰 差異를 提示하고 있다.

이를 綜合적으로 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 보여주었다 (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에서 46.2%, 胞胚期에서 54.2%로 本 研究와 相異한 傾向을 보이고 있다. 또한 最近에 Szell 과 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), Rall 과 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 多樣한 研究를 遂行하여 明確한 結論을 얻어져야 될 것으로 思料된다.

Sucrose 를 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% 平均 4.0 (80%)의 score 를 나타내고 있으며, LN<sub>2</sub> container에서는 P-5; 56%, P-4; 4%, P-3; 22%, N-0; 0%, 平均 score 는 3.7 (74%)로 세포동결기의 自動凍結과는 若干 差異가 있었으나 有意性은 보여지지 않았다. 더욱이 LN<sub>2</sub> container에서 凍結時와 세포동결기보다 生存率이 높은 境遇도 있었

**Table 3. Effects of freezing procedures between cell freezer and LN<sub>2</sub> container on mouse embryo 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 <sub>2</sub> 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)  $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$  → -35°C (0.3°C/min) → -196°C

으며, 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 세포동결기의 凍結時 27.4%, LN<sub>2</sub> container 凍結의 26.6%와는 有意性이 없다고 보고한 것과 一致하고 있으며, 세포동결기의 凍結과 LN<sub>2</sub> 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 효과적으로 利用될 수 있는 가능성을 가져다 주었다.

또한, Williams 와 Johnson (1985) 등은 LN<sub>2</sub> container 를 이용했던 mouse 受精卵의 凍結 후 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 sucrose 를 添加한 凍結液을 이용하여 murine 과 mouse 胚에서 67~89%의 生存率을, Chupin 과 Reviers (1986)는 rat에서 84~87% 生存率을 보고하여 LN<sub>2</sub> container 凍結 可能性을 提示하였으며 凍結前 卵子를 pre-dehydration 시킴으로써도 可能하다고 하였다.

이러한 結果를 綜合的으로 考察하여 보면, LN<sub>2</sub> container에서의 凍結 可能性을 充分히 나타내고 있으므로 解決되어야 할 것은 凍結前 受精卵의 合理的인 predehydration 과 sucrose dilution 이 開發되어야 될 것으로 생각된다.

## 摘 要

耐凍劑에 10% sucrose 를 添加하여 液體窒素 (LN<sub>2</sub>) 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; LN<sub>2</sub> 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함으로써 簡易凍結 如否를 究明하기 爲하여 實驗을 實施한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Glycerol 添加液과 除去液에 sucrose 를 添加하고 LN<sub>2</sub> 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. LN<sub>2</sub> container에서 凍結시킬 때, 桑實胚期의 胚(3.8)가 胚胞期 배(3.2)보다 生存率이 높았다 (P < 0.01).

3. 10% sucrose 를 glycerol 添加液과 除去液에 添加하여 卵子 自動凍結器와 LN<sub>2</sub> container에서 凍結할 때 score는 各各 4.0, 3.7로 有意性은 없었다.

## 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 Reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26:157~166.
4. Frank, G. C., S. L. Coley, 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 cooling rates of 1°C/min to -25°C before plunging. *Theriogenology*, 19:138.
  10. Leibo, S. P. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovin embryos. *Theriogenology*, 23:201.
  11. Massip, A., P. Van Der Zwalm, F. Puisant, 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.*, 71:199~204.
  12. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Solid CO<sub>2</sub> 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 1.4 M 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. Heyman, 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. Sugie. 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 關한 研究. 韓國家畜繁殖研究會報, 8:22~28.
  26. 松本徹郎, 石渡學, 山井淳子, 山川宏, 近藤わり, 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.