肉牛受精卵簡易凍結 및 融解方法에 關한 研究*

第 I 報 : Glycerol 耐凍劑에 sucrose 添加 如否가 FDA-test 에 依한 mouse 受精卵의 生存에 미치는 影響

金重桂 · 李揆勳 · 姜萬鍾 · 金瑩勳 · 康珉秀

Studies on Simplified Procedures for Freezing and Thawing of Bovine Embryos

I. Effects of the glycerol cryoprotectants containing sucrose on the mouse embryo survival rate determined by FDA test

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

Summary

Effects of the glycerol addition and removal medium containing 10% sucrose on the mouse embryo survival after freezing in a liquid nitrogen container were determined using the FDA test. The summarized results are the following.

1. The FDA score was higher ($P < 0.05$) when embryos were frozen in the glycerol addition medium with sucrose that the one without it (3.4 vs 3.0).
2. No difference in the score was found between the glycerol removal medium containing 10% sucrose (3.2) and PBS + 10% sucrose (3.3).
3. The score was higher ($P < 0.01$) at morular stage than blastocyst stage of embryos.

序 論

受精卵의 凍結에 있어 耐凍劑에는 細胞膜을 透過하여 內部細胞를 保護하는 溶質(DMSO, glycerol, ethylenglycol)과, 外部細胞膜을 保護하는 不透過性 溶質(sucrose, raffinose, albumin)로 區別할 수 있다 (Szell 과 Shelton, 1986 b).

이러한 耐凍劑中 DMSO에 關해서는 Whittingham

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

* 本 硏究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 揭載되었음.

等(1972)이 mouse 受精卵의 凍結에 利用하여 成功한 以後 많은 硏究者에 依하여 廣範圍하게 利用되었으며 (Willmut, 1972 ; Leibo 等, 1974 ; Whittingham 等, 1975, 1976, 1979 ; 角田, 1978 ; Kasai 等, 1980), glycerol 에 關해서는 Bilton 과 Moore(1976)에 의해서 山羊 受精卵 凍結에서 耐凍効果가 確認된 後 牛 受精卵(Bilton 과 Moore, 1977)에서 再立證되어 많은 硏究가 進行되어 왔고 (Parkening 等, 1976 ; Miyamoto 와 Ishibashi, 1979 ; Kasai 等, 1982 ; Merry 等, 1983 ; Miyamoto 等, 1983, 1986), 그리고, DMSO 와 glycerol 이외의 耐凍劑에 關해서는 ethylen glycol (Miyamoto 와 Ishibashi, 1977, 1978 ; Miyamoto 等, 1986 ; Urano 等, 1986), propanediol (Reneard 等, 1981 ; Reneard 等, 1984), erythritol (Miyamoto 等, 1986 ; Urano 等, 1986) 등에 對하여 硏究되고 있다. 그러나 現在 많은 耐凍劑中 glycerol 을 많이 使用하고 있다.

한편 最近에는 glycerol 을 凍結液으로 利用할 때 卵子內에 浸透되지 않고 外部 細胞膜을 保護하는 sucrose 를 添加하여 受精卵의 높은 生存率이 Kasai 等 (1980)에 의하여 報告된 後 繼續的인 硏究가 이루어지고 있다 (Miyamoto 等, 1986 ; William 과 Johnson, 1986 ; Chupin 과 Reviers, 1986).

이러한 sucrose 의 使用은 硏究者에 따라, 凍結以前 脫水 (Miyamoto 等, 1986 ; Reneard 等, 1984 ; 宮本等, 1986 ; Chupin 과 Reviers, 1986)와 融解後 耐凍劑 除去法 (Reneard, 1983 ; Bielenski 等, 1986 ; Kasai 等, 1980 ; Reneard 等, 1984 ; Rall 과 Palge, 1984), 그리고 凍結前後의 耐凍劑 添加 및 除去液 (Nieman, 1985 ; William 과 Johnson, 1985, 1986 ; Leibo, 1986 ; Reneard 等, 1984) 等에 관해서 多樣하게 利用되고 있으며, 凍結液에 sucrose 를 添加할 경우에는 凍結前 細胞內의 自由水를 脫水시킴으로써 急速凍結이 可能하고 外部 細胞膜을 保護한다고 하였다 (Wood 와 Farrant, 1980).

또한 sucrose 를 耐凍劑 除去에 利用하면 滲透壓의 差異에 依한 受精卵 內의 耐凍劑를 瞬間的으로 外部變化 없이 除去하므로 直接 one-step 除去가 可能하다고 하였다 (Leibo, 1983, 1984 ; Renard 等, 1983 ; Merry 等, 1983).

그리고 前述한 두 가지 方法을 混合하여 凍結前後에 sucrose 를 添加하는 것은 두 가지 長點을 모두 活用할 수 있으며 이러한 方法에 依하여 one-step straw (Kasai, 1980 ; Leibo, 1983 ; 鈴木, 1984)를 製造하여 實用化 段階에 있으나 凍結시킬 卵子를 straw 內의 下部에 넣는 것 (鈴木, 1984)과 上部에 넣는 것 (Leibo, 1984) 等 어느 것이 良好한 것인지는 앞으로의 硏究課題이다.

그러므로 本 硏究는 家兎의 第Ⅲ報를 補完한 것으로서 glycerol 添加液과 除去液에 sucrose 의 添加如否에 따라 液體窒素 container 에서 凍結할 경우 生死判定을 FDA - test 로 하여 mouse 受精卵의 生存率을 相互 比較하여 牛 受精卵 凍結에 應用하고자 實施하였다.

材料 및 方法

供試動物은 7週 以上의 雌性 ICR系 mouse (體重 20∼30 g)를 使用하였으며 飼養管理는 配合飼料를 自由採食 및 給水시켰으며 飼育室의 溫度는 18∼28 ℃를 維持하였다.

過排卵 誘起를 爲하여 腹腔內에 5 ∼ 10 IU의 PMSG (三共社, 日本)와 HCG (三共社, 日本)를 48時間 間隔으로 注射하고 HCG 주사 후 同系統의 雄性 mouse 를 1 : 1 로 合舍하여 自然交尾를 誘導하였다.

다음날 아침 膣栓을 確認하였으며 膣栓이 確認되지 않은 個體는 試驗에서 除外시켰다.

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 1 ml 관류액이 들어있는 注射器로 回收하였다.

이때 使用한 灌流液은 modified dulbeco's phosphate buffer (m-PBS)였고 使用前에 0.2 μm의 millipore filter 로 濾過시켜 無菌處理하였다.

回收된 受精卵은 40 ∼ 80 倍의 實體顯微鏡下에서 形態的으로 正常 卵子만을 凍結에 利用하였다.

난자 동결용 배양액으로는 PBS에 10% glyserol, 10% sucrose와 非働化된 20% donor serum을 添加한 凍結液과 10% sucrose를 添加하지 않은 one-step 方法 (Leido, 1983)으로 5分間 平衡 後 0.5 mℓ straw에 受精卵을 5~15個씩 封入하였다.

受精卵의 凍結은 液體窒素 container 內에서 實施하였으며 溫度確認은 自動細胞 凍結器(R-204, cell freezer, planer products, English)의 sensor에 耐凍劑로 채운 0.5 mℓ straw를 끼워서 使用하여 auto-recorder로 確認을 하였다. 凍結速度는 緩慢(0.3℃/min)과 急速(3~5℃/min) 凍結로 實施하였으며, 凍結後 融解는 30℃ 溫水에서 氷片이 완전히 녹을 때까지 하였다.

融解後 耐凍劑 除去는 10% sucrose를 含有하고 있는 PBS를 除去液으로 하여 내동제의 添加와 同一한 one-step 方法으로 5分間 平衡시켰다.

耐凍劑를 제거한 후 受精卵의 生死判定은 3', 6'-diacetyl fluorescene(FDA) 1 mg을 aceton 1 mℓ에 녹인 다음 이것을 PBS 液에 600,000 對 1로 稀釋(pH 7.0~7.4)한 液에 受精卵을 넣고 常溫에서 3~5分 동안 培養한 後 FDA가 함유되어 있지 않은 PBS 液에 옮겨 位相差 螢光顯微鏡(X 200)에서 다음과 같은 score로 判定하였다.

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

P-3 : 受精卵 分割球中 50~90%가 綠色螢光을 띠는 것(3點 : 60%).

P-1 : 50% 以下의 分割球가 綠色螢光을 發散하거나 또는 全般的인 分割球가 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%).

위와 같은 4段階 score로 區分하여 平均點數로 算出하였다.

結果 및 考察

凍結液과 除去液에 sucrose 添加에 따른 液體窒素 container에서 凍結 後 FDA test에 依한 mouse 受精卵의 生存率을 比較한 것은 Table 1에 나타난 바와 같다.

Table 1. Effects of freezing and removing media on mouse embryo survival evaluated by FDA-test

Treatment	Freezing medium	Removing medium	No. of embryos frozen	No. of survival embryos evaluated by FDA test				Score
				P-5 (%)	P-3 (%)	P-1 (%)	N-0 (%)	
A	PG	S	143	58 (40.6)	41 (28.7)	10 (6.9)	34 (23.8)	3.0
B	PG	PS	103	43 (41.7)	36 (35.0)	9 (8.7)	15 (14.6)	3.2
C	PGS	S	276	141 (51.1)	74 (26.8)	17 (6.2)	44 (15.9)	3.4
D	PGS	PS	389	197 (50.6)	101 (26.0)	44 (11.3)	47 (12.1)	3.4

PG : PBS + 10% glycerol PGS : PBS + 10% glycerol + 10% sucrose S : 10% sucrose
PS : PBS + 10% sucrose

凍結液에 PBS + glycerol, 除去液에는 sucrose 만을 添加시킨 A處理區(PG : S)는 P-5가 40.6%, P-3 ;28.9%, N-0 ; 23.8%, 平均 score 3.0(60%)으로 모든 처리구중 第一 低調하였고, 同一한 凍結液에서 除去液을 달리한 B處理區(PG : PS)에서는 P-5 ; 41.7%, P-3 ; 35.0%,

N-0 ; 14.6%를 나타내어 平均 score 3.2 (64 %)로서 다음 順位로 좋지 않은 生存率을 보여주었으나 有意性은 없었다.

그리고 凍結液에 sucrose를 添加한 C處理區 (PGS : S)의 生存率은 P-5 ; 51.1%, P-3 ; 26.8 %, N-0 ; 5.9%, 平均 score 3.4 (68%)였으며 D處理區 (PGS : PS)에서는 P-5 ; 50.6 (%), P-3 ; 26.0 (%), N-0 ; 12.1%를 나타내어 3.4(68 %)의 score로서 同一한 成績을 보여주고 있다 (P > 0.05).

P-5 (FDA-test 評價)에서 가장 높은 生存率을 보여준 것은 C와 D處理區(51.1, 50.6%)였고 낮은 生存率은 A處理區 40.6%이며 대체로 100% 生存率(P-5)은 全般的으로 낮은 數値였다.

그리고 完全히 죽은 것으로 認定된 N-0 역시 凍結液에 sucrose를 添加하지 않은 A處理區로서 凍結液과 除去液에 모두 sucrose가 添加된 D處理區가 가장 낮은 數値(12.1%)을 보여주고 있다.

그러므로 受精卵 凍結液에 sucrose를 添加하여 predehydration 시킨 것이 實施하지 아니한 것보다 良好하였고(P < 0.05), glycerol 除去液에서도 sucrose 單用使用한 것보다 PS 液 (PBS + sucrose) 으로 平衡하였을 때 가장 좋은 것으로 나타났다.

前述한 成績의 結果는 Leibo (1984)가 bovine 受精卵을 利用하여 sucrose로 glycerol을 除去할 때 64%의 生存率과 Merry 等 (1983)이 1.0 M glycerol을 凍結液으로 使用, 1.0 M sucrose로 除去했을 때 60.5%의 生存率, 그리고 Chupin과 Procureor (1984)는 sucrose를 包含하고 있는 PBS를 除去液으로 하여 glycerol을 除去하였을 때 bovine embryo에서 60.7 ~ 74%의 生存率, Kasai 等이 보고한 64 ~ 70% 等과 이 실험의 P-5의 生存率만을 比較할 때는 50% 前後로 낮은 數値였으나 平均 score로 볼 때 類似한 生存率을 보여주고 있었다.

Schilling 等 (1978, 1979)에 依하면 FDA-test 에서 3 ~ 4 等級 (Brilliant, partly, week, negative) 으로 分類했을 때 Brilliant 에서 85~90%, partly : 16 ~ 21%, weak : 20%의 受精卵이 CO_2 배양기에 培養했을 때 發育을 하였다고 보고하였기 때문에 本 成績에서도 P-3와 P-1에 있어서도 충분히 發育할 可能性이 있는 것으로 볼 때 上記 연구자와 거의 一致하는 傾向을 나타내었다.

그러나 Széll 과 Shelton (1987)은 PBS에 5.0 M glycerol, 0.5 M sucrose를 添加하고 있는 凍結液을 高濃度로 하여 LN_2 vapour로 直接 急速凍結後 0.5 M sucrose로 平衡하였을 때 mouse 受精卵에서 92 ~ 95%의 生存率을 報告하고 있으며, 凍結前 細胞內部의 自由水의 脫水가 卵子의 生存에 큰 影響을 미친다고 하였다. 그리고 凍結液과 耐凍劑 除去液에 모두 sucrose를 添加하였을 때 Williams 와 Johnson (1985, 86)이 70~86% 生存率을, Chupin 과 Reviers (1986)에 의한 57.5 ~ 96.4%의 報告 等은 本 成績에 比하여 優秀하였다.

結果的으로 耐凍劑의 除去液에만 sucrose를 添加시킨 것보다는 凍結液이나 耐凍劑 除去液에 10 % sucrose를 添加하면 滲透壓에 의한 충격 防止와 細胞膜을 保護하여 mouse 受精卵의 生存率을 向上시킬 수 있다고 생각한다.

Table 2는 glycerol을 凍結液으로 使用할 때 凍結液과 除去液에 sucrose 添加如否에 따른 卵子 發育段階別 mouse 受精卵의 生存率의 결과이다.

凍結液을 PBS에 glycerol만을 첨가하고 耐凍劑의 除去液에 sucrose를 添加했을 때 桑實胚期가 平均 score 3.4 (68%), 胞胚期가 2.9(58%)로 桑實胚期가 優秀하였다 (P < 0.01).

그리고 sucrose를 添加한 PBS로 glycerol을 除去하였을 때는 桑實胚期가 4.2 (84%)의 score로 實驗成績中 가장 優秀하였고, 胞胚期는 2.7 (54%)로 가장 低調하였다.

한편 PBS에 glycerol과 sucrose를 含有한 凍結液으로 凍結한 後, glycerol 除去를 sucrose로 實施하였을 때 胞胚期가 3.7 (74%)의 score 의 桑實胚期의 3.4 (68%)보다 조금 優秀하였으며 sucrose를 含有하고 있는 PBS를 除去液으로 利用하였을 때는 桑實胚期가 3.9 (78%)이며 胞胚期는 3.6 (72%)의 score를 보여주고 있다.

이러한 實驗의 結果를 綜合하여 보면 대체로 桑實胚期가 胞胚期보다 優秀하였음을 보여주고 있다

(P < 0.01).

Mouse 受精卵에서 Miyamoto 等 (1986)은 桑實胚期에서 71～92%와 胞胚期의 27～61%, William 과 Johnson (1986)이 凍結液과 除去液에 모두 sucrose를 添加하여 桑實胚期에서 80%, 胞胚期에서 72%의 生存率을 보고하고 있으며 本 硏究의 결과와 거의 一致하였다. 또 bovine 受精卵에서 Niemann (1985)은 glycerol 만을 凍結液으로 使用하고 sucrose로 除去할 때 桑實胚期에서 46.2%로서 胞胚期의 54.2%보다 낮았고, Farrand 等 (1985)도 桑實胚期의 受胎率이 胞胚期보다 低調하였으므로 本 成績과 相反되었다. 그러나 William (1985), Leibo (1985), Kennedy 等 (1983)은 桑實胚期가 胞胚期보다 良好하였다고 報告하였다.

그리고 Kasai 等 (1982)은 緩慢凍結하여 sucrose로 凍結液을 除去하였을 때 64～70%의 生存率과도 같은 傾向을 보이고 있다. 한편 最近에 Széll 과 Shelton (1987)에 依하면 mouse의 8～16 細胞期에서 고농도의 5.0M glycerol 凍結液에 0.5M sucrose를 添加하였을 때 95%의 높은 生存率을 報告하고 있다.

이러한 것으로 볼 때 卵子 凍結液, 除去液, 處理過程, 凍結方法, 凍結前 卵子狀態 등에 따라 生存率의 變化를 갖게 되므로 卵子 發育段階에 미치는 여러가지 要因에 對한 硏究가 더 遂行되어야 할 것으로 思料된다.

Table 2. Effects of cryoprotectants by liquid nitrogen vapour on morula and blastocyst stages of mouse embryo survival evaluated by FDA-test

Freezing medium	Removing medium	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 (%)	
PG	S	24	65	13 (54.2)	5 (20.8)	1 (4.2)	5 (20.8)	3.4	22 (33.8)	24 (36.9)	7 (10.8)	12 (18.5)	2.9
PG	PS	33	42	22 (66.7)	9 (27.3)	0 (0)	2 (6.0)	4.2	10 (23.8)	18 (42.9)	8 (19.0)	6 (14.3)	2.7
PGS	S	122	138	61 (50.0)	32 (26.2)	11 (9.0)	18 (14.8)	3.4	73 (52.9)	42 (30.4)	21 (15.2)	2 (1.4)	3.7
PGS	PS	138	187	84 (60.9)	34 (24.6)	13 (9.4)	7 (5.1)	3.9	91 (48.7)	62 (33.2)	30 (16.0)	4 (2.1)	3.6

PPG : PBS + 10% glycerol, PGS : PBS + 10% glycerol 10% sucrose, S : 10% sucrose
PS : PBS + 10% sucrose.

摘 要

本 試驗은 牛 受精卵 凍結過程의 簡易化 可能性 如否를 究明하기 爲하여 8週 以上의 ICR mouse 를 使用하여 遂行되었다.

Glycerol 添加液과 除去液에 10% sucrose의 添加如否에 따라 液體窒素 container에서 凍結한 mouse 受精卵의 生存率을 FDA-test로 相互 比較한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 液體窒素 container에서 凍結시킬 때 glycerol 添加液에 sucrose를 添加했을 때와 添加하지 않았을 때 FDA-test에 依한 平均 score는 各各 3.4와 3.0으로 sucrose를 添加한 것이 良好하였다 (P < 0.05).

2. Glycerol 除去液으로 10% sucrose 單用區는 平均 score 3.2로 PBS + 10% sucrose의 3.3과 差가 없었다.

3. 液體窒素 container에서 凍結할 때 桑實胚期의 卵子가 胞胚期의 卵子보다 有意性 (P < 0.01) 있게 生存率이 높았다 (3.6 : 3.1).

4. 結論的으로, glycerol 凍結液에는 10%

sucrose 添加, glycerol 除去液에는 PBS에 sucrose 添加하는 것이 有効하다고 생각된다.

引用文獻

1. Bielanski, A.V. Schneider, V.P.Pawlyshyn, and R.J. Mapletoft. 1986. Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos in vitro ;The effect of freezing container and method of removing oryoprotectant. Theriogenology, 25 : 429～437.
2. Bilton, R.J. and N.W. Moor. 1976. Effect of ice seeding and of freezing and thawing rate on the development of sheep embryos stored at -196℃. Theriogenology, 6 : 635-(abstr).
3. Biltonn, R.J. and N.W. Moor. 1977. Successful transfort of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. J. Reprod. Fert., 50 : 363～364.
4. Bouyssou, B. and D. Chupin. 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethyl sulfoxide (DMSO) or glycerol. Theriogenology, 17 : 159～166.
5. Chupin, D. and R. Procureor. 1984. Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts ; Effect of number of steps and of total duration. Theriogenology, 21 : 230 Abstr.
6. Chupin, D. and M.M. De reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. Theriogenology, 26 : 157～166.
7. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert., 59 : 51～56.
8. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1982. Survival of rat embryos after freezing. J. Reprod. Fert., 66 : 367～370.
9. Leibo, S. P. 1983. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. Cyro-Letters., 4 : 387～400.
10. Leibo, S. P. 1984. A one-step method for direst nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, 21 : 767～790.
11. Leibo, S. P. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos ; An update. Theriogenology, 23 : 201.
12. Leibo, S. P. and P. Mazur. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. In : Daniel, J. O. Jr. (ed). Methods in Mammalian Reproduction. Academic Press New York ; 179～197.
13. Leibo, S. P., P. Mazur, and S. C. Jackowski. 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exptl. Cell. Res., 89 : 79～88.
14. Merry, D. A., R. L. Allen, K. Krag and R. W. Wright, Jr 1983. Sucrose dilution of frozen mouse embryos : Interaction of glycerol and sucrose concentrations. Theriogenology, 20 : 325～332.
15. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of etylen glycol. J. Reprod. Fert., 50 : 373～375.
16. Miyamoto, H. and T. Tshibashi. 1978. The protective action of glycerols against freezing damage of mouse and embryos. J. Reprod. Fert., 54 : 427～432.
17. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1979. Effects of low temperatures on survival of frozen-thawed mouse embryos. Experientia, 35 ; Birkhauser Verlag, Basel (Schweiz). 1505～1506.
18. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Survival of mouse embryos frozenthawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. J. Exptl. Zool., 220 : 123～127.

19. Miyamoto, H., Y. Miyamoto and T. Ishibashi. 1986. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. Japan. J. Zootech., 57 : 250 ~ 256.

20. Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos ; Effects of a one-step addition or 1.4 M glycerol. Theriogenology, 23 : 369 ~ 379.

21. Parkening, T. A., Y. Tsunoda. and M.C. Chang. 1976. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. J. Exp. Zool., 197 : 369 ~ 374.

22. Rall, W. F. and C. Polge. 1984. Effect of warm rate on mouse embryos frozen thawed in glycerol. J. Reprod. Fert., 70 : 185 ~ 292.

23. Renard, J. P., Heyman, Y. and De Mesnil Du Buisson, F. 1977. Unilateral and bilateral cervical transfer of bovin embryos at the blastocyst stage. Theriogenology, 7 : 189 ~ 191.

24. Renard, 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.

25. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986 b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78; 699 ~ 703.

26. Szell, A. and J. N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol sucrose solutions on Day-3 mouse embryos. J. Reprod. Fert., 80 : 309 ~ 316.

27. Whittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196℃ and -296℃. Science, 178 : 411 ~ 414.

28. Whittingham, D. G. 1975. Survival of rats embryos after freezing and thawing. J. Reprod. Fert., 43 : 575 ~ 578.

29. Whittingham, D. G. and C. E. Adams. 1976. Low temperature preservation of rabbit embryos. J. Reprod. Fert., 47 : 269 ~ 274.

30. Whittingham, D. G., M. Wood, J. Farrant, H. Lee and J. A. Ealsey. 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196℃. J. Reprod. Fert., 56: 11 ~ 21.

31. Williams, T. J. and S. E. Johnson. 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. Theriogenology, 23: 235.

32. Williams, T. J. and S. E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. Theriogenology, 26 : 125 ~ 133.

33. Wilmut, U. 1972. The effects of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing, Life Sci., 11: 1071 ~ 1079.

34. Wood, M. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. Cryobiology, 17: 178 ~ 180.

35. 鈴木達行, 鈴木軸彦, 下平乙夫, 藤山雅照, 1984. ウシ受精卵の自動灌流器具について. 家畜繁殖誌 30 : 194 ~ 197.

36. 豊田裕, 竹島勉. 1978. 體外受精由來マウス胚の凍結保存. 家畜繁殖誌 24 : 34 ~ 35.

37. 浦野造司, 高橋芳幸, 金川弘司. 1986. 凍結融解後のマウス胚生存性に及ぼす各種凍結保護劑の効果. 家畜繁殖誌 32 : 130 ~ 132.

38. 角田幸生, 相馬正, 杉泊佶. 1978. 家畜受精卵の長期保存. 家畜繁殖誌 24 : 157 ~ 160.