

소 體外受精卵의 超急速凍結에 관한 研究

I. 소 體外受精卵의 緩慢 및 超急速凍結 融解후의 生存性에 관한 研究

金相根·李鳳求*·李揆丞*

忠南大學交 獸醫科大學

Studies on the Ultrarapid Freezing of *In vitro* Fertilized Bovine Embryos

I. Studies on the Survival Rates after Slow and Ultrarapid Frozen-Thawing of *In Vitro* Fertilized Bovine Embryos

Kim, S.K., B.K. Lee* and K.S. Lee*

College of Vet. Med., Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out in order to investigate the effects of concentration and equilibration time of cryoprotective agents on survival rate of slow and ultrarapidly frozen *in vitro* fertilized bovine embryos. *In vitro* fertilized bovine embryos, following dehydration by cryoprotective agents and sucrose, were slowly frozen (from 20°C to -7°C/-1°C/min., from -7°C -35°C/-0.2°C/min. from -35°C to -38°C/-0.3°C/min.) by cell freezer and directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 38°C water. Survival rate was defined by development rate to the morula and blastocyst stage after *in vitro* culture and FDA test.

The results are summarized as follows :

1. The survival rates of *in vitro* fertilized bovine embryos after slow frozen-thawing in the freezing medium of 0.25M sucrose added 2.5M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol and 2.5M glycerol+2.0M propanediol were 84.3%, 85.9%, 77.8%, 74.3%, respectively.
2. The survival rates of *in vitro* fertilized bovine embryos after slow frozen-thawing in the freezing of 0.50M sucrose added 2.5M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol and 2.5M glycerol+2.0M propanediol were 83.8%, 85.1%, 71.4%, 74.6%, respectively.
3. The survival rates of *in vitro* fertilized bovine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing of 0.25M sucrose added 2.5M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol and 2.5M glycerol+3.0M propanediol were 69.3%, 70.8%, 63.2%, 67.1%, respectively.
4. The survival rates of *in vitro* fertilized bovine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing of 0.25M sucrose added 2.5M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol and 2.5M glycerol+2.0M propanediol were 69.4%, 70.1%, 62.3%, 63.5%, respectively.
5. The survival rates of *in vitro* fertilized bovine embryos after slow and ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of sucrose added cryoprotective agents were not significant difference between 5min. and 10min. of equilibration time.

*이 論文은 1990년도 韓國科學財團 研究費의 支援에 의하여 이루어진 論文의 一部임."

* 忠南大學校 農科大學(College of Agri., Chungnam National University)

I. 緒 論

受精卵의 凍結은 주로 생쥐를 대상으로 耐凍劑를 이용하여 동결시 세포내의 脫水로부터 氷形成을 감소시킬 수 있는 緩慢凍結法으로 受精卵을 凍結 保存하였으나 (Whittingham 등, 1972; Leibo와 Mazur, 1972; Wilmut, 1972; Mazur, 1977; Miyamoto와 Ishibashi, 1979), 최근에는 glycerol 및 DMSO (dimethyl sulfoxide) 등의 동결액을 이용하여 수정란 내에 수분을 탈수시킨 상태에서 초급속으로 동결하는 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Szell과 Shelton, 1986a, b, 1987; Miyamoto 등, 1986; Chupin과 Revers, 1986; Trounson 등, 1987; Nakagata, 1989).

Williams와 Johnson(1985), Krag 등(1985) 및 Frank 등(1985)은 sucrose를 이용하여 液體窒素 container 내에서 동결하는 간편한 방법을 제시하였고, Rall과 Fahy(1985)는 高濃度 耐凍劑 保護物質 (vitrification solution)을 제조하여 액체질소 container의 증기로 직접 凍結에 성공하였으며 (松本 등, 1987; Hsu 등, 1986), Nguyen 등(1984)은 동결용액에 sucrose를 첨가하면 동결하기전 脫水되기 때문에 植水하지 않고 急速凍結하더라도 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였다.

超急速凍結法에는 동결액내에 약 50%의 耐凍劑가 첨가되기 때문에 耐凍劑의 독성을 줄이기 위해 5°C에서 조작을 해야 하는 vitrification 방법과 세포내외를 보호하는 두가지 耐凍劑를 동결전 세포 내부의 수분을 탈수시키는 방법이 있다. 그러나 이러한 急速凍結法은 冷却, 凍結溫度의 조절, 단계적인 凍結保護劑의 첨가 및 제거를 필요로 하는 緩慢凍結法에 비해 간편하고 실용적이므로 凍結胚의 이용보급에 공헌할 것으로 기대되나, 이식시 수태율에 문제가 있어 소 受精卵을 이용한 急速凍結 시험은 저조한 실정이다.

이에 本研究은 소 受精卵을 緩慢 및 超急速凍結法 融解후 生存性에 미치는 영향을 구명하고자, 각종 내동제와 sucrose에 의해 평형시킨 후 cell freezer에 의한 緩慢凍結法과 동결액에 5분간 평형시킨 다음 液體窒素에 浸漬하는 超急速凍結法에 의해 동결용해후 각 耐凍劑에 따른 생존율을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 體外受精卵의 준비

屠殺韓牛로부터 적출한 난소 난포내 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20-40×)하에서 卵胞卵을 회수하여 배양액으로 3회 세척한 다음, 10% (v/v)의 FCS와 1 μ g/ml FSH(Sigma, USA), 2 IU/ml의 HCG, 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가하여 여과 멸균한 배양액 TCM-199(Whittaker, M.A., Bio. Co., USA) 50 μ l 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간전에 CO₂培養器내 (5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 5~6시간 平衡시킨 후 小滴當 5개의 卵胞卵을 주입하여 24시간 성숙배양하였다.

體外受精은 성숙배양시킨 卵胞卵을 배양액으로 3회 세척후 mineral oil로 피복한 45 μ l의 수정용 배양액 小滴에 5개의 卵胞卵을 주입한 후, 凍結精液을 38°C의 恒溫水槽에 약 1분간 融解하여, BO액 1ml에 용해한 精液 0.2ml를 시험관내에서 혼합하여 CO₂培養器에서 swim-up 처리후, 上層液을 수정용 배양액으로 500 rpm, 10분간 2회 遠心分離하여 세척하고 精子塊를 同量의 100 μ g/ml의 heparin(Sigma, USA)과 희석하여 15분간 CO₂배양기에서 受精能獲得을 유지시킨 精子浮游液 2 μ l(1.5 \times 10⁶/ml)로 媒精하여 수정으로 판정된 胚를 이용하였다 (Shea 등, 1976; Ball 등, 1983)

2) 緩慢凍結

소 體外受精卵의 緩慢凍結은 自動細胞凍結器(R-204, Cell Freezer, Planer Products, England)의 sensor에 내동제와 평형시킨 후 受精卵을 주입한 straw를 끼워서 동결하면서 autorecorder로 확인하였다. 凍結溫度는 실온에서 -7°C까지는 -1°C/min., -7°C에서 -38°C까지는 -0.2°C/min., -35°C에서 -38°C까지는 -0.3°C/min.으로 동결후 LN₂ container에 침치하였다.

3) 超急速凍結

소 體外受精卵의 超急速凍結은 2.5M glycerol, 3.0 M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol+ 2.0M propanediol액에 각각 0.25M sucrose 또는

0.50M sucrose+20% FCS+PBS의 동결액으로 각각 5분간 평형시킨 후 액체질소가 들어있는 용기의 1cm 높이의 부포위에 straw를 놓아 5분간豫冷시킨 다음 液體窒素에 곧 바로 浸漬함으로써 超急速凍結을 실시하였으며, 平衡時間에 따른 생존율 시험은 5.0, 10분간 평형시킨 후 실시하였다.

4) 生存性 檢査

동결후 1개월간 보존된 受精卵의 融解는 straw를 실온에 30초간 방치후 38°C의 溫水에서 溶해후 耐凍劑를 제거하기 위하여 거꾸로 흔들어 10분간 방치한 후 신선한 PBS로 3회 세척한 다음 TCM-199 배양액에서 72시간 배양하면서 發生狀態를 관찰하거나, fluorescence diacetate(FDA) 1mg을 acetone 1ml에 용해한 다음 PBS액에 600,000:1의 비율로 희석한 (pH 7.0~7.4)액에 受精卵를 넣고 常溫에서 3~5분간 배양한 후 FDA가 함유되어 있지 않은 PBS액에 옮겨 位相差顯微鏡하에서(×200) 生死與否를 判定하였다 (Schilling 등, 1982).

III. 結果 및 考察

1. 소 體外受精卵의 緩慢凍結 融解後의 生存率

1) 0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 緩慢凍結 融解後의 生存率

소 體外受精卵의 緩慢凍結에 있어서 0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 溶해 후의 生存率은 Table 1과 같다.

각 耐凍劑에 대한 緩慢凍結 融解後의 生存率은 0.25M sucrose에 2.5M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol+2.0M propanediol을 첨가한 경우 각각 84.3%, 85.9%, 77.8% 및 74.3%의 生存율을 나타냈다. 한편, 3.0M DMSO+0.25M sucrose에서 가장 높은 生存율을 나타냈으나, 2.5M glycerol+2.0M propanediol+0.25M sucrose에서는 가장 낮은 生存율을 나타냈다.

이러한 결과는 시험동물은 다르나, mouse의 桑實胚를 이용하여 完만동결시 71~92%의 生存율을 보고한 Miyamoto 등(1986)의 보고에 비해서는 다소 낮은 결과였으나, Williams와 Johnson(1985)의 生存율 72~80%와, Kasai 등(1982)의 60~74% 및 Niemann(1985)의 소 수정란의 完만동결시 桑實胚期에서 46.2%와 胚盤胞期에서 54.2%의 生存율에 비해서는 높은 결과였다.

2) 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 緩慢凍結 融解後의 生存率

소 體外受精卵의 緩慢凍結에 있어서 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 溶해 후의 生存率은 Table 2와 같다.

Table 1. Effect of cryoprotective agents and 0.25M sucrose in the freezing medium on the survival rate of slowly frozen bovine embryos

Cryoprotective agents	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed (to M and B)**
2.5M G+S*	83	79(95.2)	70(84.3)
3.0M DMSO+S	78	75(96.2)	67(85.9)
2.0M P+S	72	67(93.1)	56(77.8)
2.5M G+2.0M P+S	74	71(95.9)	55(74.3)

*0.25M Sucrose, G: Glycerol, P: Propanediol

**M: Morula, B: Blastocyst

Table 2. Effect of cryoprotective agents and 0.50M sucrose in the freezing medium on the survival rate of slowly frozen bovine embryos

Cryoprotective agents	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed (to M and B)
2.5M G+S*	68	65(95.6)	57(83.8)
3.0M DMSO+S	74	71(95.9)	63(85.1)
2.0M P+S	70	66(94.3)	50(71.4)
2.5M G+2.0M P+S	67	63(94.0)	50(74.6)

*0.50M Sucrose

耐凍劑에 대한 緩慢凍結 融解후의 생존율은 0.50M sucrose 에 2.5M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol+2.0M propanediol 의 경우 각각 83.8%, 85.1%, 71.4% 및 74.6%의 생존율을 나타냈다. 한편, 3.0M DMSO+5.0M sucrose 에서 가장 높은 생존율을 나타냈으나, 2.0M propanediol+0.50M sucrose 에서는 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 시험동물은 다르나, 0.5M sucrose 를 첨가한 동결액을 이용하여 murine 과 mouse 胚에서 67~89%의 생존율을 보고한 Krag 등(1985)와 Miyamoto 등(1986)의 결과와 유사하나, Chupin 과 Reviere(1986)의 rat 에서 84~87%의 생존율에 비해서 다소 낮은 결과이었다.

한편, Niemann(1985)은 glycerol 만을 동결액으로 사용하고 sucrose 로 제거할 때 桑實胚期에서 46.2% 로써 胚盤胞期의 54.2%보다 낮았고, Renard 등(1983)은 桑實胚期의 생존율이 胚盤胞期보다 저조하였다고 하였으나 Williams 와 Johnson(1985) 및 Leibo (1985)는 桑實胚期가 胚盤胞期보다 양호하다고 보고하였다.

2. 소 體外受精卵의 超急速凍結 融解後의 生存率

1) 0.25M sucrose 와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 超急速凍結 融解後의 生存率

凍結液에 5분간 평형시킨 다음 液體窒素에 浸漬하는 超急速凍結法에 의해 0.25M sucrose 와 각 耐凍劑의 평형에 따른 超急速凍結 融解후의 生存率은 Table 3과 같다.

각 耐凍劑에 대한 超急速凍結 融解후의 생존율은 0.50M sucrose 에 2.5M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol+2.0M propanediol 을 첨가한 경우 각각 72.0%, 70.8%, 63.2% 및 67.1%의 생존율을 나타냈다. 한편, 2.5M

glycerol+0.25M sucrose 에서 가장 높은 생존율을 나타냈으나, 2.0M propanediol+0.25M sucrose 에서는 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 소 體外受精卵의 超急速凍結에 관한 연구보고를 찾을 수 없어 정확하게 비교할 수는 없지만, 강 등(1990)의 mouse 胚를 이용한 급속동결시의 생존율 89.9%에 비해서는 낮은 결과이었다. 한편, Williams 와 Johnson(1985), Krag 등(1985) 및 Frank 등(1985)은 mouse 배에 대해 sucrose 를 이용하여 液體窒素 container 내에서 급속동결하는 방법을 제시하였으며, Bui-Xuan-Nguyen 등(1984)은 동결 용액에 sucrose 를 첨가하면 동결하기전 脫水되기 때문에 植氷하지 않고 超急速凍結하더라도 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였다.

2) 0.50M sucrose 와 각 耐凍劑의 平衡에 의한 超急速凍結 融解後의 生存率

소 體外受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.50M sucrose 와 각 耐凍劑의 평형에 따른 超急速凍結 融解후의 生存率은 Table 4와 같다.

각 耐凍劑의 평형에 따른 超急速凍結 融解후의 생존율은 0.50M sucrose 에 2.5M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol+2.0M propanediol 을 첨가한 경우 각각 69.4%, 70.1%, 62.3% 및 63.5%의 생존율을 나타냈다. 한편, 3.0M DMSO+0.50M sucrose 에서 가장 높은 생존율을 나타냈으나 2.0M propanediol+0.50M sucrose 에서는 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, 胚發生 段階와 凍結方法에 차이가 있으나 급속동결에 있어서 Szell 과 Shelton(1987)의 8~16세포기에서 90% 이상의 생존율에 비해 낮은 성적이나, Kasai 등(1982)의 20~39%의 생존율에 비해서는 높은 성적이었다. 한편 Tsunoda 등(1982), Rall 과 Polge(1984) 및 Niemann(1985)은 가급적

Table 3. Effect of cryoprotective agents and 0.25M sucrose in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen bovine embryos

Cryoprotective agents	No. of embryos freezed	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to M and B)
2.5M G+S*	75	69(92.0)	54(72.0)
3.0M DMSO+S	72	68(94.4)	51(70.8)
2.0M P+S	68	65(95.6)	43(63.2)
2.5M G+2.0M P+S	76	72(94.7)	51(67.1)

*0.25M Sucrose

Table 4. Effect of cryoprotective agents and 0.50M sucrose in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen bovine embryos

Cryoprotective agents	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed (to M and B)
2.5M G+S*	72	67 (93.1)	50 (69.4)
3.0M DMSO+S	67	63 (94.0)	47 (70.1)
2.0M P+S	69	65 (94.2)	43 (62.3)
2.5M G+2.0M P+S	74	69 (93.2)	47 (63.5)

*0.50M Sucrose

Table 5. Effect of equilibration time in the freezing medium on the survival rate of slow and ultrarapidly frozen bovine embryos

Equilibration time (min.)	Methods of freezing	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed (to M and B)
5.0	SF*	84	80 (95.2)	71 (84.5)
	UF**	82	78 (95.1)	58 (70.7)
10.0	SF*	79	76 (96.2)	64 (81.0)
	UF**	81	77 (95.1)	54 (66.7)

*Slow freezing

**Ultrarapid freezing

명확한 分割球 상태를 나타내는 受精卵은 동결후 생존율과 수태율이 높다고 하였다.

3. 耐凍劑의 平衡時間에 따른 緩慢 및 超急速凍結 融解後의 生存率

소 體外受精卵의 緩慢 및 超急速凍結에 있어서 耐凍劑의 平衡時間에 따른 동결 용해후의 生存率은 Table 5와 같다.

體外受精卵의 完만 및 초급속동결에 있어서 각 耐凍劑의 平衡時間을 5분, 10분으로 했을 때의 동결 용해후의 生存率은 각각 84.5%, 70.7% 및 81.0%, 66.7%로서 5분의 平衡시간이 10분 보다 약간 높은 생존율을 나타냈으나 큰 차이는 없었다.

이러한 결과는, 2세포기 수정란을 3.0M DMSO와 0.50M sucrose를 이용하여 two-step 동결시 平衡시간이 5분과 10분간에는 차이가 없었다고 한 Boon 등 (1988)의 보고와 유사한 결과였다.

IV. 摘 要

본 연구는 소 體外受精卵의 超急速凍結방법의 확립과 緩慢 및 超急速凍結 融解後의 生存율에 미치는 영향을 구명하고자 각종 耐凍劑와 sucrose에 의해 平衡시간

후 cell freezer에 의한 緩慢凍結法과 液體窒素에 浸漬하는 急速凍結法에 의해 동결 용해했을 때 각 耐凍劑의 濃度 및 平衡時間에 따른 생존율을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 소 體外受精卵의 緩慢凍結에 있어서 0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 용해후의 生存率은 0.25M sucrose에 2.5M glycerol, 3.0 M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol+2.0M propanediol의 경우 각각 84.3%, 85.9%, 77.8% 및 74.3%의 생존율을 나타냈다.
2. 소 體外受精卵의 緩慢凍結에 있어서 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 용해후의 生存率은 0.50M sucrose에 2.5M glycerol, 3.0 M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol+2.0M propanediol의 경우 각각 83.8%, 85.1%, 71.4% 및 74.6%의 생존율을 나타냈다.
3. 소 體外受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 용해후의 生存率은 0.25M sucrose에 2.5M glycerol, 3.0 M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.5M

- glycerol+2.0M propanediol의 경우 각각 72.0%, 70.8%, 63.2% 및 67.1%의 생존율을 나타냈다.
4. 소 體外受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 融해후의 生存率은 0.50M sucrose에 2.5M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol+2.0M propanediol의 경우 각각 69.4%, 70.1%, 62.3% 및 63.5%의 생존율을 나타냈다.
 5. 소 體外受精卵의 緩慢 및 超急速凍結에 있어서 耐凍劑의 平衡時間에 따른 동결 融해후의 生存率은 平衡時間을 각각 5분, 10분으로 했을 때 큰 차이가 없었다.

V. 引用文獻

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28: 717-725.
2. Boon, W.R., C.A. Brown, J.M. Vasquez and S.S. Shapiro. 1988. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programable freezer. Fertil. Steril., 50: 348-354.
3. Nguyen, B.X., N.Y. Heyman and J.P. Renard. 1984. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. Theriogenology, 22: 389-400.
4. Chupin, D. and M.M. De Reviere. 1986. Quick freezing of rat embryos. Theriogenology, 26: 157-166.
5. Frank, G.C., S.L. Coley, B. Betterbed and R.D. Page. 1985. The effects of cryoprotective agents, dilution rate, freezing rates and freezing units on the survival of bovine embryos. Theriogenology, 23: 194.
6. Hsu, T.T., H. Yamakawa, H. Yamanoi and J. Ogawa, S. 1986. Survival and transfer test of mouse embryos frozen by vitrification method. Japan J. Anim. Re prod., 32: 29-32.
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. Leibo, S.P. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, 21: 797-790.
10. Leibo, S.P. and P. Mazur. 1972. Preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel, J.O. Jr. (ed). Methods in mammalian reproduction. Academic Press, New York. 179-197.
11. Mazur, P. 1977. Slow freezing injury in mammalian cells in: The freezing of mammalian embryos. Ciba Foun. Symp. Elsevier North-Holland, Amsterdam., No. 52: 19-45.
12. 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.
13. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1979. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. J. Reprod. Fert., 50: 373-375.
14. Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. J. Reprod. Fert., 87: 479-483.
15. Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos; Effects of a one-step dilution or 1.4M glycerol. Theriogenology, 23: 369-379.
16. Rall, W.F. and G.M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -

- 196°C by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.
17. Rall, W.F. and C. Polge. 1984. Effect of warm rate on mouse embryos frozen thawed in glycerol. *J. Reprod. Fert.*, 70: 185-192.
 18. 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.
 19. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15: 245-248.
 20. Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Berdin and R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. *J. Anim. Sci.*, 43: 809-815.
 21. Szell, A. and J.N. Shelton. 1986a. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 80: 401-408.
 22. Szell, A. and J.N. Shelton. 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78: 699-703.
 23. 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.
 24. Trounson, A., A. Peura and C. Kirby. 1987. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48: 843-850.
 25. Tsunoda, Y., T. Soma and T. Sugie. 1982. Effects of postovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morula. *J. Reprod. Fert.*, 65: 483-487.
 26. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science*, 178: 411-414.
 27. Williams, T.G. and S.E. Johnson. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23: 235(Abstr.).
 28. 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.
 29. 松本徹郎, 石渡學, 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稀釋の効果. *家畜繁殖誌*, 33: 200-205.
 30. 강만중, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광. 1990. 생쥐 2-세포기 수정란의 초급속동결. *한국가축번식학회지*, 14(1): 23-30.