

## 돼지 受精卵의 超急速 凍結 融解後의 生存性에 관한 研究

金相根·李鳳求\*

忠南大學校 獸醫科大學

### Studies on the Survival Rates after Ultrarapidly Frozen-Thawing of Porcine Embryos

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

College of Veterinary Medicine, Chungnam National Univ.

#### SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of concentration and equilibration time of cryoprotective agents on the survival rate of slowly and ultrarapidly frozen porcine embryos. The porcine embryos following dehydration by cryoprotective agents and a various concentration of sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 38°C water bath. Survival rate was defined as development rat to the morula and blastocyst stage after *in vitro* culture or by FDA test.

The results are summarized as follows :

1. The survival rates of porcine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 0.25M sucrose added 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, or 4.0M glycerol was 65.3, 61.8, 64.3, 59.4 or 39.4%, respectively. Addition of 0.25M sucrose into the freezing medium containing 2.0M glycerol showed higher survival rate than those of 2.5~4.0M glycerol.
2. The survival rates of porcine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 0.25M sucrose added 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 or 4.0M DMSO was 65.6, 67.6, 68.6, 60.6 or 23.6%, respectively. However, addition of 0.25M sucrose into the freezing medium containing 3.0 M DMSO showed higher survival rate than those of 2.0, 2.5, 3.5 or 4.0M DMSO.
3. The survival rates of porcine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 0.25M sucrose added 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 or 4.0M propanediol was 63.2, 60.3, 62.1, 52.3 or 24.3%, respectively. Addition of 0.25M sucrose into the freezing medium containing 2.0M propanediol showed higher survival rate than those of 2.5~4.0M glycerol.
4. The survival rates of porcine embryos after ultrarapid frozen-thawing the freezing medium of 2.0M glycerol added 0.10, 0.25, 0.50 or 0.75M sucrose was 61.8, 70.8, 67.6 or 52.2%, respectively. Addition of 2.0M glycerol into the freezing medium containing 0.25M sucrose showed higher survival rate than those of 0.10, 0.50 or 0.75M sucrose.
5. The higer survival rate of porcine embryos was attained at short period of equilibration time (2.5~5min.) in the freezing medium added 0.25M sucrose and 3.0M compared to those of 10 or 20min. equilibration time in the same condition.

---

\*忠南大學校 大學院(Graduate School, Chungnam Ntional Univ.)

## I. 緒 論

哺乳動物 受精卵의 凍結保存에 관한 研究는 최초로 Whittingham 등(1972)에 의해 생쥐 受精卵에서 성공한 후 토끼(Bank 와 Maurer, 1974), 羊(Willadsen 등, 1976), 돼지(Nagashima 등, 1989; 정 등, 1990), 소(Bilton과 Moor, 1976; Leibo, 1985; Chupin과 Reviere, 1986; Niemann, 1985) 등의 보고가 있다.

受精卵의 凍結는 주로 실험동물을 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를 凍結保存하였으나(Leibo와 Mazur, 1972; Wilmut, 1972; Mazur, 1977; Miyamoto 등, 1986), 최근에는 glycerol 및 DMSO(dimethyl sulfoxide) 등의 동결액을 이용하여 受精卵내에 수분을 탈수시킨 상태에서 超急速으로 동결하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Szell과 Shelton, 1986a, b; Nakagata, 1989).

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 세포 내외를 보호하는 두가지 耐凍劑에 의해 동결전 세포 내부의 수분을 탈수시키는 방법이 있다. 이러한 급속동결법은 냉각, 凍結溫도의 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 이용 보급에 공헌할 것이 기대되나, 생존율이 극히 저조하여 돼지 受精卵를 이용한 急速凍結 시험은 거의 없는 실정이다.

이에, 본 研究는 돼지 受精卵의 超急速 凍結技術을 확립하고자 초급속 동결에 있어서 耐凍劑의 種類와 濃度, sucrose의 添加效果 및 平衡時間에 따른 동결 용해후의 生存率을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材 料

#### 1) 卵胞卵의 回收와 培養

屠殺直後의 雌豚으로부터 卵巢를 적출하여, 100IU/ml의 penicillin G와 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 生理食鹽水에 浸漬하여 실험실로 옮겨 난소 표면의 습기를 제거한 다음 주사기로 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40 $\times$ )하에서 卵胞卵을 회수하였다.

### 2. 方 法

#### 1) 卵胞卵의 體外培養

회수한 卵胞卵을 배양액으로 3회 세척후 10%(v/v)의 FCS와 1 $\mu$ g/ml의 FSH(Sigma, USA), 2IU/ml의 HCG, 1 $\mu$ g/ml의  $\beta$ -estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate가 添加된 TCM-199(Whittaker, M.A., Bioproducts Co. USA) 培養液으로 배양하였으며, 사용전 0.2 $\mu$ m millipore filter로 濾過하여 滅菌후 사용하였다.

#### 2) 卵胞卵의 體外成熟 및 受精

卵胞卵의 體外成熟은 배양액 50 $\mu$ l 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간전에 CO<sub>2</sub> 培養器내(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5°C)에서 5~6시간 平衡시킨 후 5개의 卵胞卵을 주입하여 24~32시간 배양하였다.

體外受精은 성숙배양 卵胞卵을 배양액으로 3회 세척한 후, 45 $\mu$ l의 受精用 培養液 小滴에 5개의 卵胞卵과 雄豚의 精巢上體를 細切하여 얻은 精子浮遊液 0.01ml와 BO액 2ml을 시험관에서 잘 혼합하여 培養器에서 1시간 swim up시킨 다음 약 0.5ml의 上層液을 2,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 精子 pellets을 동량의 heparin 용액(100 $\mu$ g/ml)과 함께 혼합하여 CO<sub>2</sub> 培養器에서 受精能獲得을 유도시킨 精子浮遊液 2 $\mu$ l(1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml)를 주입하여 媒精시킨 후 受精으로 判定된 胚를 이용하였다(Shea 등, 1976; Ball 등, 1983).

#### 3) 超急速 凍結

돼지 受精卵의 超急速凍結는 glycerol, DMSO 및 propanediol 등의 耐凍劑를 각각 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0M+0.25M sucrose+20% FCS+PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 각각 5분간 平衡시킨 후 1cm 높이의 부포위에 straw를 놓아 5분간 豫冷시킨 다음 液體室素에 곧바로 浸漬함으로써 超急速凍結를 실시

하였으며, 내동제의 평형시간에 따른 생존률 시험은 3.0M DMSO+0.25M sucrose 동결액으로 각각 2.5, 5.0, 10, 20분간 평형시킨 후凍結하였다.

#### 4) 生存性 檢査

凍結후 3~6개월간 보존된 受精卵의 融解는 straw 를 실온에 30초간 방치한 다음 38°C의 溫水에서 용해후 耐凍劑를 제거하기 위하여 거꾸로 흔들어 10분간 방치한 후 신선한 PBS로 3회 세척한 다음 TCM-199 培養液으로 배양하면서 桑實胚 또는 胚盤胞로의 발생상태를 관찰하거나, fluorescence diacetate(FDA) 1mg 을 acetone 1ml에 용해한 다음 PBS액에 600,000:1의 비율로 희석한 (pH 7.0~7.4)액에 受精卵을 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 판정하였다(Schilling 등, 1982).

### III. 結果 및 考察

#### 1. 凍結液에 첨가된 glycerol의 濃度에 따른 超急速 凍結 融解後의 生存率

돼지 受精卵의 超急速 凍結에 있어서 동결액에 첨가된 glycerol의 농도에 따른 超急速 凍結融解後의 生存率은 Table 1과 같다.

동결액에 첨가된 glycerol 농도에 따른 凍結融解後의 生存率은 0.25M sucrose에 glycerol 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0M을 첨가한 경우 각각 65.3, 61.8, 64.3, 59.4 및 39.4%로서 2.0M glycerol 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈으며, 4.0M glycerol에서 가

장 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 對象動物과 凍結方法에 차이가 있으나, mouse 受精卵에서 Szell과 Shelton(1987)의 95%의 생존율과, Chupin과 Reviere(1986), Williams와 Johnson(1985) 등의 急速凍結시 79.6%와 84.0%의 生存率에 비해서는 낮은 성적이었다. 한편, glycerol을 동결용액으로 이용할 때 卵子내에 침투되지 않으며, 外部細胞膜을 보호하는 sucrose를 첨가하여 동결 용해시 높은 生存率이 보고되었다(Miyamoto 등, 1986; Kasai 등, 1980).

#### 2. 凍結液에 첨가된 DMSO의 濃度에 따른 超急速 凍結 融解後의 生存率

돼지 受精卵의 超急速 凍結에 있어서 동결액에 첨가된 DMSO의 농도에 따른 超急速 凍結融解後의 生存率은 Table 2와 같다.

0.25M sucrose에 DMSO 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 및 4.0M의 첨가에 따른 受精卵의 超急速 凍結融解後의 生存率은 각각 65.6, 67.6, 68.6, 60.6 및 23.6%로서 3.0M DMSO 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈으며, 4.0M DMSO 농도에서 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 Trounson 등(1987)이 mouse 胚에서 3.0M DMSO와 0.50M sucrose를 이용할 때 76.0%의 가장 우수한 발달율을 나타냈다는 보고와 비교할 때 낮은 결과였으며, 또한 0.25M sucrose에서는 농도별 차이가 없었다고 한 보고와는 상이한 결과였다.

Table 1. Effect of glycerol concentration and 0.25M sucrose in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos

Concentration of glycerol	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered (%)*	No. of embryos survived (%)**
2.0M	72	68(94.4)	47(65.3)
2.5M	68	63(92.6)	42(61.8)
3.0M	70	65(92.9)	45(64.3)
3.5M	64	61(95.3)	38(59.4)
4.0M	66	62(93.9)	26(39.4)

\* : No. of embryos recovered/No. of embryos frozen

\*\* : No. of morula or blastocyst/No. of embryos frozen

**Table 2. Effect of DMSO concentration and 0.25M sucrose in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos**

Concentration of DMSO	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered (%) *	No. of embryos survived (%) **
2.0M	64	61 (95.3)	42 (65.6)
2.5M	68	63 (92.6)	46 (67.6)
3.0M	70	67 (95.7)	48 (68.6)
3.5M	66	62 (93.9)	40 (60.6)
4.0M	72	67 (93.1)	17 (23.6)

\* : No. of embryos recovered/No. of embryos frozen

\*\* : No. of morula or blastocyst/No. of embryos frozen

**3. 凍結液에 첨가된 propanediol의 농도에 따른 초急速凍結融解後의生存率**

돼지 受精卵의 초急速凍結에 있어서 동결액에 첨가된 propanediol의 농도에 따른 초急速凍結融解後의生存率은 Table 3과 같다.

0.25M sucrose에 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 및 4.0M의 propanediol 첨가에 따른 초急速凍結融解後의生存率은 각각 63.2, 60.3, 62.1, 52.3 및 24.3%로서 2.0M propanediol의 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈으며, 4.0M propanediol의 농도에서 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 mouse 胚를 이용하여 1.50M propanediol+0.25M sucrose액으로 급속동결 응해시 63.2%의 생존율을 나타냈다는 석 등(1990)의 보고와 비교할 때 농도 차이는 있지만 거의 유사한 결과였다. 특히 최근에는 毒性이 적고 不定形狀態에서 안정성

이 높은 propanediol을 耐凍劑로 이용하여 glycerol과 유사한 높은 생존율을 보고하고 있다(Massip 등, 1984; Rall과 Polge, 1984; Ko와 Threlfall, 1988).

**4. 凍結液에 첨가된 sucrose의 농도에 따른 초急速凍結融解後의生存率**

돼지 受精卵의 초急速凍結에 있어서 동결액에 첨가된 sucrose의 농도에 따른 초急速凍結融解後의生存率은 Table 4와 같다.

2.0M glycerol에 0.10, 0.25, 0.50 및 0.75 sucrose 농도의 첨가에 따른 초急速凍結融解後의生存率은 각각 61.8, 70.8, 67.6 및 52.2%로서 0.25M sucrose 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈으며, 0.75M sucrose에서 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 試驗動物은 다르지만, Williams와 Johnson(1985)의 70~80%와, Chupin과 Reviers

**Table 3. Effect of propanediol concentration and 0.25M sucrose in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos**

Concentration of propanediol	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered (%) *	No. of embryos survived (%) **
2.0M	68	63 (92.6)	43 (63.2)
2.5M	68	65 (95.6)	41 (60.3)
3.0M	66	61 (92.4)	41 (62.1)
3.5M	65	62 (95.4)	34 (52.3)
4.0M	70	65 (92.9)	17 (24.3)

\* : No. of embryos recovered/No. of embryos frozen

\*\* : No. of morula or blastocyst/No. of embryos frozen

**Table 4. Effect of sucrose concentration and 2.0M glycerol in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos**

Concentration of sucrose	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered (%) *	No. of embryos survived (%) **
0.10M	68	64(94.1)	42(61.8)
0.25M	65	62(95.4)	46(70.8)
0.50M	74	70(94.6)	50(67.6)
0.75M	67	63(94.0)	35(53.2)

\* : No. of embryos recovered/No. of embryos frozen

\*\* : No. of morula or blastocyst/No. of embryos frozen

(1986)의 57.5~96.4%의 생존율과는 차이가 있었다. 한편, sucrose를 첨가하면 동결전 세포내 自由水의 脫水로 急速凍結이 가능하며, 또한 滲透壓의 차이에 의해 순간적으로 제거되므로 one-step straw 법에 의한 직접 移植이 가능하다고 하였다(Merry 등, 1983; Renard 등, 1983; Wood와 Farrant, 1980; Leibo, 1985; Kasai 등, 1980;鈴木 등, 1984).

#### 5. 耐凍劑의 平衡時間에 따른 超急速凍結 融解後의 生存率

돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 耐凍劑의 平衡時間에 따른 동결 融解後의 生存率은 Table 5에서 보는 바와 같이, 3.0M DMSO+0.25M sucrose 동결액에서의 平衡시간을 2.5, 5, 7, 10, 20분으로 했을 때 동결 融解後의 生存率은 각각 69.2, 67.1, 65.7 및 27.1%로서 2.5분의 平衡시간에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, Trounson 등(1987)의 2.0M DMSO+0.25M sucrose의 동결액에서 2분 이하의

平衡시간이 가장 우수하다고 한 보고와 Boon 등(1988)의 3.5M DMSO와 0.5M sucrose를 이용하여 2세포기 受精卵를 two-step 동결시 平衡時間이 5분과 10분간에는 차이가 없었으나 20분에서는 현저하게 저조하였다고 한 결과와 거의 일치하였다.

#### IV. 摘要

본 研究는 돼지 受精卵의 超急速凍結技術을 확립하고자 초급속 동결에 있어서 耐凍劑의 種類와 濃度, sucrose의 添加效果 및 平衡時間에 따른 동결 融解後의 生存率을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.25M sucrose에 glycerol 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 및 4.0 M 농도의 첨가에 따른 凍結 融解後의 生存率은 각각 65.3, 61.8, 64.3, 59.4 및 39.4%로서 2.0M glycerol 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.
2. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.25M

**Table 5. Effect of equilibration time in the freezing medium added 3.0M DMSO and 0.25M sucrose on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos**

Equilibration time (min.)	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered (%) *	No. of embryos survived (%) **
2.5	78	73(93.6)	54(69.2)
5.0	82	77(93.9)	55(67.1)
10.0	67	61(91.0)	44(65.7)
20.0	70	64(91.4)	19(27.1)

\* : No. of embryos recovered/No. of embryos frozen

\*\* : No. of morula or blastocyst/No. of embryos frozen

- sucrose에 DMSO 2.0, 2.5, 3.0, 3.5M 및 4.0 M 농도의 첨가에 따른 凍結 融解후의 生存率은 각각 65.6, 67.6, 68.6, 60.6 및 23.6%로서 3.0M DMSO 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.
3. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.25M sucrose에 propanediol 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 및 4.0M 농도의 첨가에 따른 凍結 融解후의 生存率은 각각 63.2, 60.3, 62.1, 52.3 및 24.3%로서 2.0 M propanediol의 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.
4. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 2.0M glycerol에 sucrose 0.10, 0.25, 0.50, 0.75M 농도의 첨가에 따른 凍結 融解후의 生存率은 각각 61.8, 70.8, 67.6, 52.2로서 0.25M sucrose에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.
5. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 3.0M DMSO+0.25M sucrose 동결액에서의 平衡時間에 따른 동결 용해후의 생존율은 平衡時間을 2.5, 5, 10, 20분으로 했을 때 각각 69.2, 67.1, 65.7 및 27.1%로서 2.5분의 평형시간에 가장 높은 생존율을 나타냈다.

## V. 引用文獻

- 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.
- Bank, H. and R.R. Maurer. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Expl. Cell. Res.*, 89: 188-196.
- Bilton, R.J. and N.W. Moor. 1976. Effect of ice seeding and freezing and thawing rate on the development of sheep embryos stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Theriogenology*, 6: 635 (Abstract).
- Boon, W.R., C.A. Brown, J.M. Vasquez and S.S. Shapiro. 1988. Freezing of mammalian embryo without the aid of a programable freezer. *Fertil. Steril.*, 50: 348-354.
- Chupin, D. and M.M. De Reivers. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26: 157-166.
- Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.* 59, 51-56.
- Ko, Y and W.R. Threlfall. 1988. The effects of 1,2-propanediol as a cryoprotectant on the freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 29: 987-995.
- Leibo, S.P. 1985. Field trial of one-stop diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21: 767-790.
- 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.
- Massip, A., P. Van der Zwahlen, 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: 199-204.
- Mazur, P. 1977. Slow freezing injury in mammalian cells in the freezing of mammalian embryos. *Ciba Foun. Symp. Elsevier North-Holland, Amsterdam.*, 52: 19-45.
- Merry, D.A., R.L. Allen, K.Krag and R. W. Wright. 1983. Sucrose dilution of frozen mouse embryos; Interaction of glycerol and sucrose concentration. *Theriogenology*, 20: 325-332.
- 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.
14. Nagashima, H., Y. Kato, H. Yamakawa and S. Ogawa, 1989. Low temperature sensitivity of blastocyst and blastocyst-derived cells in pigs. *Theriogenology*, 31(3) : 525-530.
  15. Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 87 : 479-483.
  16. Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos; Effects of a one-step dilution or 1.4M glycerol. *Theriogenology*, 23 : 369-379.
  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. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol sucrose solution on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 699-703.
  22. Szell, A. and J.N. Shelton. 1986a. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 699-703.
  23. Szell, A. and J.N. Shelton. 1986b. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 80 : 401-408.
  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. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science*, 178 : 411-414.
  26. Willadsen, S.M., C. Polge, L.E.A. Rawson and R.M. Moor. 1976. Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.*, 46 : 151-154.
  27. Williams, T.G. and S.E. Johnson. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23 : 235 (Abstract).
  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. Wood, M. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 17 : 178-180.
  30. 鈴木達行, 鈴木軸彦, 下平乙夫, 藤山雅照. 1984. 受精卵の自動灌流器具について. *日本家畜繁殖誌*, 30 : 194-197.
  31. 석호봉, 이광원, 전대규. 1991. 수정란의 급속동결용해법에 관한 연구. I. 마우스 동결 수정란에 대한 1단계 Straw 법이 난자 생존성에 미치는 영향. *한국축산학회지*, 33(1) : 1-12.
  32. 정진관, 장원경, 유승환, 1990. 돼지 수정란의 동결에 관한 연구. *한국축산학회지*, 32(8) : 450-458.