

외래유전자 주입 및 핵치환된 생쥐 수정란의 초급속 동결

강만중 · 한용만 · 이철상 · 김선정 · 유대열 · 신상태* · 이경광

한국과학기술연구원 유전공학연구소

Ultrarapid Freezing of DNA-Injected and Nuclear-transplanted Mouse Embryos

Kang, M.J., Y.M. Han, C.S. Lee, S.J. Kim, D.Y. Yu, S.T. Shin* and K. K. Lee

Genetic Engineering Research Institute, KIST

SUMMARY

We determined whether the ultrarapid freezing method is applicable to micromanipulated mouse embryos. One-cell mouse embryos were microinjected with MThGH gene. Nuclei from one-cell embryos of F_1 (C57BL \times CBA) mice were transplanted into enucleated one-cell embryos of ICR mice. The injected and nucleated embryos that developed to 2-cell stage were cryopreserved by ultrarapid freezing. The embryos equilibrated in freezing medium(3 M DMSO + 0.25 M sucrose + 2% FBS in PBS) were directly immersed into liquid nitrogen and then thawed in 37°C water. Developmental rates of the microinjected and nuclear-transplanted embryos to blastocyst stage after ultrarapidly freezing and thawing were 31% and 55%, respectively. The frozen-thawed embryos were transferred to pseudopregnant recipients, which then gave birth to 17 offsprings. Twelve(14% of the transferred embryos) and five(20%) offsprings were derived from microinjected and nuclear-transplanted embryos, respectively. The results indicate that the DNA injected and nuclear-transplanted mouse embryos are cryopreservable at 2-cell stage by ultrarapid freezing method.

I. 서 론

포유동물 수정란의 완만동결보존에 관한 연구는 1972년 Whittingham이 생쥐 수정란에서 최초로 성공한 이래 급속히 발달되어 왔으며, 특히 소(Wilmut와 Rowson, 1973)의 경우는 이미 산업적으로 이용되고 있다. 그러나 완만동결방법은 실험조작에 있어 고가의 장비와 많은 시간이 소요된다는 점 등의 문제

점이 있다. 이러한 문제점을 해결하여 보다 간편하고 실용적인 동결방법을 개발할 목적에서 Wood와 Farrant(1980)는 생쥐 수정란을 대상으로 급속동결을 시도하였으며, 최근에는 초자화(vitrification)동결법(Roll과 Fahy, 1985 ; Valdez 등, 1990 ; Kobayashi 등, 1990)과 초급속동결법(Takahashi와 Kanagawa, 1985 ; Szell과 Shelton, 1986 a, b, 1987 ; Willton 등, 1989 ; Shaw 등, 1991) 등의 연구가 활발하게 진행되고 있다. 한편 국내에서는 1980

* 본 연구는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업 (BSN 80710-534-4)의 연구결과입니다.

* 충남대학교 수의과대학 (College of Veterinary Medicine, Chungnam National University)

년대 초부터 완만동결 방법에 의하여 토끼(김 등, 1983), 생쥐(윤과 정, 1984), 소(노 등, 1988) 등에서 연구가 진행되었으며, 최근에는 생쥐수정란의 초급속 동결 방법(강 등, 1989, 1990)에 관한 연구결과가 보고되었다.

그러나 이러한 수정란 동결방법을 미세조작된 수정란(수정란 분리, 핵 및 할구치환, 외래유전자 주입)에 적용할 경우에는 미세조작에 따른 수정란의 물리적 손상과 장시간 체외배양 등의 영향 때문에 동결보존에 어려움이 있다. 따라서 미세조작된 수정란의 동결보존에 관한 연구는 주로 양분된 수정란(bisected embryo)을 한천으로 봉입한 다음 완만동결방법에 의하여 수행되었다(Lenh-Jenson과 Willadsen, 1983 ; Tsuoda 등, 1987). 그러나, 핵치환된 수정란 및 외래유전자가 주입된 수정란의 동결보존에 관한 연구 보고는 거의 전무한 실정으로, Petters 등(1987)이 외래유전자가 주입된 234개의 수정란을 완만동결방법에 의하여 동결·융해한 후 가친의 자궁에 이식하여 1마리의 형질전환 생쥐를 생산하였다는 단 한편의 보고가 있을 뿐이다.

본 연구에서는 미세조작된 수정란의 동결보존에 있어 실험조작이 더욱 간편하고 안정된 생존율을 얻을 수 있는 새로운 방법을 확립하고자, 2세포기 생쥐 수정란의 초급속 동결(강 등, 1990)에서 얻은 성적을 기초로 사람 성장호르몬 유전자(MThGH gene)가 주입된 수정란과 핵치환된 수정란의 동결보존 가능성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 다배란 유기 및 수정란 준비

공시동물은 유전공학연구소 실험동물실로부터 분양 받은 교잡종(C57BL/6X CBA) 및 ICR계통의 생쥐를 사용하였다. 다배란 유기를 위하여 PMSG(제국장기, 일본)와 hCG(Sigma, USA)를 48시간 간격으로 각각 5 IU 씩 생쥐의 복강내에 주사한 다음, 동일계통의 웅성 생쥐와 1:1로 합사시켜 자연교미를 유도하였으며, 다음날 아침 질전이 확인된 개체만을 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 수정란은 hCG 주사후 18~22시간째에 난관으로부터 회수한 다음, hyaluronidase(300 unit/ml, Sigma, USA) 용액에서 3

분간 처리하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 수정란을 M2 배양액으로 수회 세척한 후 실험에 사용하였으며, 교잡종 생쥐의 수정란은 전핵의 관찰을 쉽게 하기 위해 12,000 rpm에서 3분간 원심처리하여 미세조작에 이용하였다. 또한 대조구 수정란은 24시간 동안 M16 배양액에서 체외배양한 후, 정상적인 2세포기 수정란으로 발달한 수정란을 선별하여 사용하였다.

2. 수정란 미세조작

1) 외래유전자의 주입

본 실험에 사용한 외래유전자 주입 및 DNA 분석 방법은 이 등(1989), 한 등(1990)의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 외래유전자는 생쥐의 MT-I promoter에 사람의 성장 호르몬 유전자를 연결하여 만든 pMThGH를 제한효소인 BamH I 과 BstE II 로 절단하여 linear 형태로 한 후, TE 완충액(10 mM Tris, HCl, pH 7.4, 0.1 mM EDTA)에 용해하여 미세주입에 사용하였다. 그리고 사람 성장호르몬 구조유전자내에 존재하는 Pvu II site 사이의 약 1.1 kb를 probe로 사용하였다. 외래유전자의 미세주입은 DIC system을 갖춘 inverted microscope(Nikon) 하에서 미세조작기(Leitz micromanipulator)를 사용하여 최종 농도 4 ng/μl의 외래유전자를 수정란의 웅성전핵에 주입하였다. 외래유전자가 주입된 수정란을 M16 배양액에서 24시간 배양하였으며, 정상적인 2세포기 수정란으로 발달한 수정란만을 선별하여 동결실험에 사용하였다.

형질전환 생쥐(transgenic mouse)의 여부는 DNA 분석을 통하여 판정하였다. 즉 생후 6~8주령의 생쥐 꼬리로부터 DNA를 추출한 후(Hogan 등, 1986) 제한효소인 EcoRI으로 절단하여 0.8% agarose gel에서 전기영동한 다음, hybridization (Purrello와 Balazs, 1983 ; Tsao 등, 1983)과 autoradiography 를 실시하여 분석하였다.

2) 핵치환

핵치환은 이 등(1989)의 방법에 따라 DIC system을 갖추고 있는 inverted microscope(Nikon) 하에서 미세조작기를 이용하여 ICR 계통의 수정란 핵을, 핵이 제거된 교잡종 생쥐 수정란에 이식함으로써 수행하였다. 즉, 미리 준비해 두었던 수정란을 현미경하에

서 100배로 관찰하면서 투명대 일부를 절개한 다음, 이들 수정란을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CB(cytochalasin B : Sigma)와 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Col(colcemid : Gibco)가 포함된 M16 배양액으로 옮겨 5% CO₂, 37°C 배양기에서 15~30분간 전배양을 실시하였다. 전배양된 수정란을 CB와 Col이 함유된 M2 배지방울과 불활성화한 Sendi virus(HVJ) suspension 방울을 mineral oil로 덮은 미세조작용 slide로 옮겨 200~400배로 관찰하면서 핵치환을 하였다. 핵치환이 완료된 수정란은 M16 배양액에서 24시간 배양하여 2세포기까지 발달시킨 다음 동결실험에 공시하였다.

3. 수정란 동결

수정란 동결은 PBS 용액에 3.0 M DMSO + 0.25 M sucrose + 20% FBS가 포함된 동결액을 이용하여 아래와 같이 초급속 동결을 실시하였다. 미세조작된 수정란 또는 정상적인 2세포기 수정란을 PBS(50 μl)와, 동결보존액(25 μl)으로 각각 3회와 1회씩 세척한 다음, 동결보존액이 들어있는 0.25 ml straw에 주입하여 상온에서 2.5~3분간 평형시킨 후 곧바로 액체질소(-196°C)에 침지함으로써 초급속 동결을 실시하였다. 수정란의 용해는 straw를 액체 질소로부터 실온에서 40초간 방치한 후, 37°C 온수에서 30초간 천천히 흔들어 실시하였다. 용해 후 straw내의 내용물을 0.5 ml의 희석액(0.25 M sucrose in PBS)으로 모두 방출시킨 다음, 수정란을 새로운 0.5 ml의 희석액으로 옮겨 수정란내의 내용물을 10분간에 걸쳐 제거하였다. 내용물이 제거된 수정란은 신선한 PBS로 3회 세척하고 5분간 PBS에 방치한 다음 M16 배양액으로 옮겨 배양하였다.

4. 수정란 배양 및 이식

본 실험에 사용된 배양액은 0.4% BSA와 100 μM 의 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid : Sigma, USA)가 함유된 M16 배양액(Whittingham, 1971)을 사용하였으며, 체외배양을 위하여 petri dish(Falcon, USA)에 50 μl 의 배양액 소적을 만들어 heavy mineral oil(Sigma, USA)로 피복한 다음, 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 최소한 2시간 이상 평형시킨 후 사용하였다. 동결 용해 후 미세조작된 수정란은 상기조건에서 72시간 배양하면서 배반포기까지의 발달상태를 관찰하였다.

미세조작된 수정란의 이식은 동결 용해 후 2세포기 상태의 수정란은 가친의 난관에, 또는 체외배양한 수정란으로 배반포기까지 발달한 수정란은 자궁에 이식하였다. 그리고 외래유전자가 주입된 수정란의 이식에는 ICR생쥐를, 핵치환된 수정란의 이식에는 교잡종 생쥐를 가친으로 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *In vitro* 2세포기 수정란의 초급속 동결

미세주입된 생쥐수정란을 초급속 동결하기에 앞서 기초 실험으로서 먼저 미세조작하지 않은 *in vitro* 2세포기 수정란(1세포기에서 24시간 배양한 수정란)의 초급속 동결을 실시하였다. 3 M DMSO를 이용하였을 때, *in vitro* 2세포기 수정란을 초급속 동결·용해 후 배반포기 배까지의 체외발달을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

Table 1. Preimplantation development of 2-cell mouse embryos after ultrarapidly freezing and thawing

	No. of embryos			No. of embryos developed to blastocyst ³
	Tested	Recovered ¹	Normal at recovery ²	
Freezing	120	116(97)	110(95)	93(85)
Control	97	—	—	87(90)

percentage of embryos in parentheses

¹ No. of embryos recovered / No. of embryos tested X 100

² No. of normal embryos post-thaw / No. of embryos recovered X 100

³ No. of blastocysts / No. of normal embryos post-thaw X 100

동결된 120개의 수정란 중 116개(97%)가 융해 후 회수되었으며, 그 중 110개(95%)가 형태적으로 정상적인 수정란이었다. 이들 정상적인 수정란을 72시간 배양하였을 때 93개(85%)가 배반포기 배로 발달하였다. Critser 등(1988)은 내용제로 1.5 M DMSO를 사용하여 2세포기 수정란을 완만동결하였을 때, 융해 후 63.9%의 배발달율을 보고하였으며, 백 등(1989)은 내용제로서 DMSO를 이용할 때 71.2%, propanediol인 경우에는 67.4%의 배발달율을 얻었다고 하였다. 또한 초급속동결 방법에 있어서 Trounson 등(1987)은 3.5 M DMSO를 이용하여 75%의 발달율을 보고하였으며, Shaw 등(1991)은 4.5 M DMSO처리군에서 배발달율은 91%로서 3.0 M DMSO(85%)보다 높은 성적을 보고하였다. 그리고 이들은 모두 완만동결보다 초급속동결에서 더 좋은 성적을 얻을 수 있었다고 하였다. 또한 vitrification 방법에서는 46~89%의 배발달율을 보고하고 있다 (Kono와 Tsunoda, 1987; Friedler 등, 1987).

본 연구의 결과는 타 연구자의 보고보다 높은 85%의 배발달율을 보여주었으며, 이는 동결하지 않고 배양한 대조구(90%)와도 비슷한 성적이었다. 이렇게 *in vitro* 2세포기 생쥐 수정란의 결과를 바탕으로 하여 미세조작된 2세포기 생쥐 수정란의 동결보존도 상기와 같은 초급속동결법으로 실시하였다.

2. 외래유전자가 주입된 수정란의 초급속동결

Table 2에서 보는 바와 같이, 외래유전자를 주입한 수정란의 동결·융해 후 회수율과 회수된 수정란 중 정상적인 수정란의 비율은 각각 96%와 91%로 높은 성

적이었다. 또한 상실배까지의 체외발달율은 90%로 외래유전자를 주입한 후 동결을 실시하지 않은 대조구(88.2%)와 유사하였다. 그리고 배반포기 배로의 발달율은 31.2%로서 대조구의 58.8% 보다 다소 낮은 성적이었으며, 상실배에서 배반포기 배로의 발달은 동결구 및 대조구에서 모두 저조하였다. 이 등(1989)은 외래유전자가 주입된 수정란의 체외발달 성적이 다소 저조한 것은 미세주입시 세포질의 물리적 손상, 주입된 외래유전자의 양, 체외배양의 영향 등이 복합적으로 작용하기 때문이라고 하였다. Table 2에 나타난 91%의 회수율은 외래유전자가 주입된 수정란을 완만동결·융해한 후 76.5%의 회수율을 보고한 Petters 등(1987)의 결과보다 높은 성적이었다. 그들은 외래유전자를 주입한 후 3일간 배양하여 후기 8세포기 수정란을 동결에 공시하였다. 그리고 동결·융해된 179개의 수정란을 9마리의 가진에 이식하여 8마리의 산자를 얻었으며, 이들 중 1마리가 형질전환 생쥐였다고 보고하였다. 그러나 장시간의 체외배양은 동결·융해 후 배발달에 나쁜 영향을 미칠 수 있으므로(Kuzan과 Quinn, 1989), 본 연구에서와 같이 외래유전자를 주입한 다음 이들의 생존성을 용이하게 판단할 수 있고 체외배양 시간을 최대한 단축시킬 수 있는 2세포기 단계에서 동결을 실시하는 것이 바람직하다고 생각된다.

Table 3은 외래유전자를 주입한 다음, 초급속 동결·융해한 생쥐 수정란의 이식 성적을 보여주고 있다. 외래유전자가 주입된, 동결·융해한 수정란을 2세포기 단계에서 단관에 직접 이식하거나(63개의 수정란), 배반포기 배까지 체외배양시킨 후 자궁에 이식하여(23개의 수정란) 각각 6마리의 산자(총 12마리)를 얻는

Table 2. Preimplantation development of microinjected mouse embryos after ultrarapidly freezing and thawing

	No. of embryos			No. of embryos ³ developed to	
	Tested	Recovered ¹	Normal at recovery ²	Morula	Blastocyst
Freezing	89	85(96)	77(91)	69(90)	24(31)
Control	34	-	-	30(88)	20(59)

percentage of embryos in parentheses

¹ No. of embryos recovered / No. of embryos tested X 100

² No. of normal embryos post thaw / No. of embryos recovered X 100

³ No. of morula or blastocysts / No. of normal embryos post-thaw X 100

Table 3. Transfer of microinjected mouse embryos after ultrarapidly freezing and thawing

Embryo stage	Transfer site	No. of transferred	No. of pregnant /No. of recipient	Young (%) [*]	Transgenic mice
2 cell	oviduct	63	1 / 4	6(6)	2
Blastocyst	uterus	23	2 / 3	6(26)	2
Total		86	3 / 7	12(14)	4

* Young /No. of embryos transferred X 100

데, 이들 중 4마리가 형질전환 생쥐로 판명되었다. 이와 같은 결과는 외래유전자가 주입된 수정란을 초급속 동결법으로 동결 보존한 다음, 이들 수정란을 이용하여 산자를 얻을 수 있다는 사실을 입증하고 있다.

3. 핵치환된 생쥐 수정란의 초급속동결

Table 4는 핵치환된 수정란의 동결·융해 후 체외 발달 및 이식결과를 나타내고 있다. 핵치환된 수정란 53개를 초급속 동결·융해하여, 52개의 수정란이 회수되었으며(98%), 이들 중 49개(94%)가 형태적으로 정상적인 2세포기 수정란이었다. 그리고 정상적으로 회수된 수정란을 약 72시간 동안 체외배양하였을 때 약 55%가 배반포기 배로 발달하였다. 이러한 성적은 핵치환 후 동결하지 않고 배양한 대조구의 68%보다 다소 낮은 성적이었으나, 핵치환된 수정란을 동결하지 않고 체외배양하였을 때 약 60%의 체외발달율을 얻었다는 보고(Tsunoda 등, 1986 ; 이 등, 1989)와는 큰 차이가 없었다.

동결·융해 후 체외에서 배반포기배까지 발달한 25개의 핵치환된 수정란을 가친의 자궁에 이식한 결과, 5마리의 산자가 태어났는데, 이들은 모두 핵치환된 수정란으로부터 유래한 생쥐임이 확인되었다. 이러한 결

과는 핵치환된 수정란도 2세포기에서 초급속동결 보존하여 개체로 발생시킬 수 있음을 입증하고 있다.

IV. 적 요

본 실험은 미세조작된 생쥐 수정란에 있어서 초급속 동결법에 의한 동결이 가능한지를 검토하기 위하여 수행하였다. hCG 주사 후 19~22시간째에 회수된 1세포기 수정란에 외래유전자로서 MThGH 재조합 유전자를 미세주입하였다. 또한 F₁ 생쥐의 1세포기 핵을 핵이 제거된 ICR 생쥐 1세포기 수정란에 이식하였다. 이들 미세조작된 수정란은 2세포기까지 발달시킨 다음 초급속동결을 실시하였다. 동결액으로는 PBS에 3M DMSO + 0.25M sucrose + 2% FBS가 함유된 용액을 사용하였다. 이 동결액에 미세조작된 수정란을 넣어 약 3분간 평형시킨 후 곧바로 액체질소에 침지하여 동결보존하였으며, 동결 수정란의 융해는 37℃ 온수에서 straws를 약 30초간 흔들어서 실시하였다. 미세주입된 수정란 및 핵치환된 수정란을 72시간동안 체외에서 배양하였을 때, 각각 31%와 55%가 배반포기 배까지 발달하였다. 그리고 이들 수정란을 가친의 자궁에 이식하여 17마리의 산자를 얻었는데, 그 중 12마리

Table 4. Viability of nuclear-transplanted mouse embryos after ultrarapidly freezing and thawing

	NT	Recovered ¹	Normal at recovery ²	No. of blastocysts ³	No. of transferred	Young (%) ⁴
Freezing	53	52(98)	49(94)	27(55)	25	5(20)
Control	50	—	—	34(68)	—	—

NT : nuclear-transplanted

percentage of embryos in parentheses

¹ No. of embryos recovered / No. of frozen embryos X 100

² No. of normal embryos / No. of embryos recovered X 100

³ No. of blastocyst /No. of normal embryos post-thawing X 100

⁴ Young /No. of embryos transferred X 100

는 미세주입된 수정란으로부터 유래되었고, 5마리는 핵치환된 수정란으로부터 발달된 것임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 외래 유전자의 주입 또는 핵치환 등과 같이 미세조작된 생쥐 수정란을 2세포기 단계에서 초급속 동결법으로 동결보존할 수 있음을 보여주고 있다.

V. 인용문헌

1. Critser, J. R., B. W. Arneson, D. V. Aaker, A. R. Huse-Benda and G. D. Ball. 1988. Factors affecting the cryosurvival of mouse two-cell embryos. *J. Reprod. Fert.*, 82 : 27-33.
2. Friedler, S., E. Shen and E. J. Lamb. 1987. Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification: methodologic studies. *Fert. Steril.*, 48 : 306-315.
3. Hogan, B., F. Constantini and E. Lacy. 1986. Manipulating the mouse embryos. A laboratory manual, pp.174-276. Cold Spring Harbor Lab.
4. Kobayashi, K., H. Nagashima, H. Yamakawa, Y. Kato and S. Ogawa. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. *Theriogenology*, 33 : 777-788.
5. Kono, T. and Y. Tsunoda. 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Jpn. J. Anim. Reprod*, 33 : 77-81.
6. Kuzan, F. B. and P. Quinn. 1989. Cryopreservation of mammalian embryos, in : *in vitro* fertilization and embryo transfer, New York, pp. 301-347.
7. Lehn-Jensen, H. and S. M. Willadsen. 1983. Deep-freezing of cow 'HALF' and 'QUARTER' embryos. *Theriogenology*, 19 : 49-54.
8. Petters, R. M., B. H. Johnson and W. E. Mercer. 1987. Production of transgenic mice following deoxyribonucleic acid microinjection and embryo freezing. *Theriogenology*, 27 : 507-515.
9. Purrello, M. and I. Balazs. 1983. Direct hybridization of labeled DNA to DNA in agrose gel. *Analytical Biochemistry*, 128 : 393-397.
10. Rall, W. F. and G. M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313 : 573-575.
11. Shaw, J. M., I. Kola, D. R. MacFarlane and A. O. Trounson. 1991. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen-2 cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J. Reprod. Fert.*, 91 : 9-18.
12. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986a. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapor. *J. Reprod. Fert.*, 76 : 401-408.
13. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 699-703.
14. Szell, A. and J. N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80 : 309-316.
15. Takahashi, Y. and Kanagawa. 1985. Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapor ; Effects of sugars. *Jpn. J. Vet. Res.*, 33 : 141-144.
16. Trounson, A., A. Peura, and C. Kirby. 1987. Ultrarapid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fert. Steril.*, 48 : 843-850.
17. Tsao, S. G., C. F. Brunk and R. E. Pearlman. 1983. Hybridization of nucleic acids directly in agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 131 : 365-372.
18. Tsunoda, Y., T. Tokunaga, Y. Okubo and T. Sugie. 1987. Beneficial effect of agar for the frozen storage of bisected embryos. *Theriogenology*, 28 : 317-322.

19. Tsunoda, Y., T. Yasui, K. Nakamura, T. Uchida and T. Sugie. 1986. Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. *J. Exp. Zool.*, 240 : 119-125.
20. Valdez, C. A., O. Abas Mazni, Y. Takahashi, M. Hishinuma and H. Kanagawa. 1990. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 33 : 627-636.
21. Whittingham, K. G. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, 14 : 7-21.
22. Whittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos freezing to -196°C . and -296°C . *Science*, 178 : 411-414.
23. Wilmut, I. and Rowson, L. E. A. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92 : 689-690.
24. Wilton, L. T., J. M. Shaw and A. O. Trounson. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fert. Steril.*, 51 : 513-517.
25. Wood, M. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*. 17 : 178-180.
26. 강만중, 김영훈, 문성호, 김종계. 1989. 생쥐 수정란의 급속동결에 관한 연구. 제1보 내동제 농도가 생쥐 수정란 급속동결시 생존율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 13 : 134-140.
27. 강만중, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광. 1990. 생쥐 2-세포기 수정란의 초 급속 동결. *한국가축번식학회지*, 14 : 9-16.
28. 김정익, 양부근, 남상현, 고광두. 1983. 가토의 수정란 이식에 관한 연구. II. 동결용해 난자의 발육 단계별 생존율. *한국가축번식학회보*, 7 : 19-23.
29. 노환철, 정광업, 신규용, 정병현, 백운화, 정길생. 1988. 우 동결수정란의 산업적 이용에 관한 연구. *한축지*, 30 : 151-158.
30. 백청순, 서병희, 이재현, 이경광. 1989. 생쥐 2세포 기배의 동결 보존. *대한불임학회지*, 16 : 9-14.
31. 윤문석, 정길생. 1984. 생쥐배의 동결보존. *한국가축번식학회보*, 8 : 116-121
32. 이경광, 한용만, 남궁욱, 이철상, 김용주, 김재만, 김지영, 한문희. 1989. 생쥐 에 있어서 사람성장호르몬 유전자의 발현. *한축지*, 31 : 139-147.
33. 이철상, 박흥대, 정길생, 이경광. 1989. 핵치환 생쥐의 생산. *한축지*, 31 : 69-74.
34. 한용만, 이철상, 강만중, 유대열, 이경광. 1990. Transgenic 생쥐 생산에 있어서 미세주입시기 및 외래유전자의 농도가 삽입빈도에 미치는 영향. *한축지*, 32 : 309-314.