

## 침투성 및 비침투성 동결보호제를 이용한 생쥐 수정란의 급속동결에 따른 생존성에 관한 연구

김태영 · 남상규 · 석호봉  
단국대학교 축산학과

### Effects on Viability of Different Cryoprotectants Treated Mouse Embryos after Quick Freezing

T. Y. Kim, S. G. Nam and H. B. Seok

*Department of Animal Science, Dankook University*

#### SUMMARY

In order to improve the cryopreservatory techniques of livestock embryos, the quick freezing method which is directly plunged in liquid nitrogen via prefreezing procedure without freezing machine was carried out for mouse embryos treated with permeable and nonpermeable cryoprotectants. The viability of frozen-thawed embryos were evaluated by FDA vital dye test.

The results obtained was summarized as follows:

1. A total of 720 embryos were recovered from frozen embryos for viability test. Evaluation of the fluorescein diacetate(FDA) vital dye test with mice embryos were resulted of 2.3 total mean score - evaluated in orderly higher mean grade of P3 453 (63%), P2 133(18%), P1 51(7%) and P0 83(12%).
2. An all-round evaluation of these combination, the highest viability was showed in 3M ethylene glycol + 0.25M trehalose treated with the copper prefreezing.
3. Effects of permeable and nonpermeable cryoprotectants combination were evaluated by means FDA score. 3M ethylene glycol + 0.25M trehalose showed the highest survival rates of 2.8 mean FDA score.
4. Effects of permeable cryoprotectants were evaluated by mean FDA score but the results were not significantly different each other.
5. In evaluation of the nonpermeable cryoprotectants, 0.25M trehalose obtained higher mean FDA score than of 0.25M sucrose and it was significantly different ( $P < 0.05$ ).
6. There was no significantly difference between copper and stainless-steel in pre-freezing procedures.

#### 서 론

단순하고 값싼 동결기술의 개발은 야외에서 수정란을 동결하는데 보다 편리함을 증진시킬 수 있다.

현재 동결기기를 이용하지 않는 간편한 동결방법으로 3가지가 알려져 있다. 생쥐 수정란을 재료로 동결보존 기술을 개선하는 노력으로 수정란을 액체 질소에 곧바로 침적하는 초급속 동결처리법(ultrarapid freezing)과 직접 침적하기 전에 액체질소

증기에 전처리하는 급속동결처리법(rapid freezing 또는 quick freezing) 및 무빙편 동결처리법(ice-free cryopreservation 또는 vitrification)이 있다. 이 중에서 야외에서 성공율이 높으며 독성이 적으며 처리하기가 간편한 급속동결처리법이 많이 이용되고 있다.

Morula와 blastocyst기 수정란을 이용한 급속동결방법으로 침투성 보호제인 glycerol, DMSO (Trounson 등, 1987; Trounson 등, 1988), ethylene glycol(Abas Mazni 등, 1989; Abas Mazni 등, 1990), propylene glycol(Sathananthan 등, 1988)과 비침투성 보호제인 sucrose(Takeda 등, 1984; Biery 등, 1986; Williams와 Johnson, 1986; Szell과 Shelton, 1986; Szell과 Shelton, 1987), trehalose(Krag 등, 1985), lactose, raffinose, glucose, xylose(Takahashi와 Kanagawa, 1985; Takahashi와 Kanagawa, 1990)의 조합을 이용하고 있다.

이와 같이 각동결보호제의 일부조합만 비교한 논문은 많이 발표되었으나, 침투성과 비침투성 동결보호제의 상호간의 조합을 서로 비교하고 효율성을 조사한 논문은 드물다.

동결수정란을 융해한 후 생존성을 검토하는 방법은 배양법과 약품처리에 의한 관찰을 주로 하고 있다. 원칙적으로 검사후 이식 성공율을 높이는 데는 배양법이 좋으나 약품처리에 의한 것도 수정란 이식후 영향을 주지 않는 반응으로 판별할 수 있다면 단시간에 식별하고 이식하여 수태율을 높일 수 있어 가장 이상적이라 생각된다.

광학현미경상의 수정란 감별법은 이미 소개된 바 있으나(Greve와 Lehn-Jensen, 1979), FDA를 도입한 실험에서 광학현미경상의 생존평가 오차와 큰 차이가 없으며(Hoppe와 Bavister, 1984), FDA의 처리구와 비처리구의 태아 기형 유무 검사에서도 FDA가 안전함이 여러 실험을 통해 증명(Shilling 등 1979; Linda와 Trounson, 1980)되었다.

본 실험에서는 급속동결법으로 생쥐 수정란을 침투성과 비침투성 동결보호제를 조합한 후 융해한 생쥐수정란의 형태학적 회수상태 및 FDA처리에 의한 생존성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

본 실험에서 사용된 생쥐는 한국 실험동물 연구소에서 공급받은 20g이상의 생후 4~6주령 자성 ICR과 7~8주령 이상의 동종 웅성 ICR을 사용하였고, 사료는 삼양사료에서 생산한 익스투르전 펠렛을 자유급여하였다. 조명시간은 오전 7시부터 오후 7시까지 자연채광 및 인공조명을 주어 12시간 내 12시간으로 명암주기를 조절하였다. 또한 동물 사육실 온도는 22~25℃로 유지하였다.

### 2. 과배란유기 수정란회수

과배란 유기를 위해 자성 생쥐에게 7.5IU의 PM-SG(Folligon, Intervet, Holland)를 복강주사한 후 46시간 후에 동일한 방법으로 7.5IU의 HCG(Chorulon, Intervet, Holland)를 주사하여 다배란을 유도, 웅축과 1대 1 동거시켰다. 동거후 14±2 시간 후에 자축의 질전을 관찰하여 확인된 개체를 수정란 채취용 실험동물로 이용하였다.

질전이 확인된 자축 생쥐는 HCG주사후 84±2 시간경에 경추탈구법(cervical dislocation)으로 도살한 후, 자궁각을 회수하여 1ml 주사기의 26게이지의 주사바늘을 이용 자궁각 선단을 절개후 관류하였다.

### 3. 수정란 채란과 선별작업

수정란은 가능한 상실배와 배반포기 stage로서 투명대, 분할구, 세포내 물질 모두가 형태학상으로 정상이며 색깔, 색조, 유연성 모두가 이상이 없는 것을 선택하였다. 즉 oil drop상의 두번의 수세과정 동안 무정란, 기형란 등을 제거하고 정상적인 형태를 갖춘 상실배와 배반포기배를 회수하였다. 회수된 난자는 7~12개씩 모아서 동결보호제를 처리하였다.

### 4. 동결보호제 처리

동결보호제는 침투성과 비침투성의 일대일 조합으로 10% DPBS를 용매로 하여 각각 3M과 0.25M로 제조하였다. 침투성 동결보호제는 glycerol, DMSO(dimethyl-sulfoxide), ethylene glycol, propylene glycol를 이용하였으며, 비침투성 동결

보호제는 sucrose, trehalose, lactose를 사용하였다. 수정란을 동결보호제에 옮긴 다음 5분간의 평형을 마친 후 0.25ml French 스트로우(I.M.V. L'Aigle, France)에 10개 내외의 수정란을 스트로우 중앙 부위에 오도록 유입시키는 순서는 동결보호제, 공기층, 수정란이 함유된 동결보호제, 공기층, 동결보호제 순으로 하였고, 스트로우 powder를 이용하여 밀봉하였다.

### 5. 동 결

동결은 Mazni 등(1989)과 Rayos 등(1994)의 방법을 참고하였다. 즉 뚜껑이 있는 액체질소의 용기에 0.8 × 0.8mm mesh의 금속세망으로 덮은 직사각형(14 × 10 × 1cm) styroform을 띄워 예비동결하였다. 사용된 금속은 동일한 규격의 stainless steel망과 구리망이다. 예비동결은 스트로우를 금속망 boat 위에 평형으로 놓고 뚜껑을 닫은 다음 2분간 정치하였다. 곧 액체질소에 침지하여 약 1~3개월간 보관하면서 난자의 생존성을 관찰하였다.

### 6. 용해 및 FDA labeling

37℃의 수조에 20초간 금속 용해하였다. 용해한 난자는 용기에 담겨 동결처리된 역순으로 5분간 평형처리한 후 10% DPBS에서 2~3차례 수세하였다.

FDA(fluorescein diacetate ; Sigma, Cat. F-1397, USA)를 acetone 1ml당 1mg을 녹여 stock solution을 만든 후, 다시 10% DPBS액으로 1:500, 000~1:600,000으로 희석하여 pH 7.0~7.4로 조절한 후 사용하였다. FDA처리액에 동결보호제가 제거된 수정란을 옮겨 3~5분 실온에서 배양을 한 후, 다시 20% DPBS에 옮겨 배양의 발색을 막으면서 관찰하였다. 형광현미경(Olympus, BX-50F, Japan)은 U. V. filter 장치로서 광원은 초고압 수은등 250UV를 부착시킨 자외선 램프를 사용하여 할구 및 세포질의 FDA 발색 유무를 관찰하였다. 그외의 과정은 Schilling 등(1982)의 방법에 준하였다.

### 7. 생존성 판정

동결 용해란의 FDA-score는 다음과 같은 기준에 의해 판정하였다.

P3: 수정란의 분할구 전체가 녹색 형광을 강하게

발산하는 것

(3 점: 거의 완전 생존, 3/3(100%))

P2: 수정란의 분할구중 2/3가 형광 혹은 P3보다 전체가 약하게 형광을 발하는 것

(2 점: 부분적인 염색이나 거의 생존 가능성, 2/3(66.7%))

P1: 수정란의 분할구중 1/3이 형광 혹은 P2보다 약하게 형광을 발산하는 것

(1 점: 부분적인 염색이나 생존 가능성이 낮은 것, 1/3(33.3%))

P0: 수정란의 분할구중 전혀 발산되지 않는 것

(0 점: 거의 생존 가능성이 없음, 0/3(0%))

평균 FDA 점수는 다음식에 의하여 산출되었다.

$$\text{Mean score} = [(A \times 3) + (B \times 2) + (C \times 1) + (D \times 0)] / N$$

A: No. of P3, B: No. of P2, C: No. of P1,

D: No. of P0, N: Total No. of P3~P0

### 8. 통계분석

통계분석은 컴퓨터용 통계 프로그램인 SAS를 이용하여 전체조합, 동결보호제 조합, 침투성 동결보호제, 비침투성 동결보호제 및 금속망의 처리별로 각각 mean FDA score를 작성하였고, 이 결과는 DUNCAN/LSD법에 의해 처리구간의 유의적 차이를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

동결수정란을 용해처리한 후 회수한 수정란은 총 720개이며 각 수정란의 FDA 형광 발생 정도에서 P3는 453개(63%), P2는 133개(18%), P1는 51개(7%), P0는 83개(12%)였으며 total mean score는 2.3을 나타내었다.

금속망 이용과 침투성 및 비침투성 동결보호제의 처리 효과는 Table 1에 전체적으로 나타나 있다. Mean FDA score의 계산으로 구리망을 이용한 3M ethylene glycol + 0.25M trehalose(100%)와 stainless steel망의 3M DMSO + 0.25M trehalose가 3.0과 2.9로서 가장 높은 생존성을 보이는 반면, stainless steel망을 이용한 3M DMSO + 0.25M

Table 1. Effects of various permeable & nonpermeable cryoprotectants on stainless steed and coppered materials at quick freezing

Prefreezing metals	Treatment		No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test				Mean FDA score
	Permeable cryoprotectants	Nonpermeable cryoprotectants			P3	P2	P1	P0	
Stainless steel	3M Glycerol	0.25M Sucrose	14	13	9	3	1	0	2.6
	3M Glycerol	0.25M Trehalose	16	16	12	3	1	0	2.7
	3M Glycerol	0.25M Lactose	68	65	43	14	2	6	2.4
	3M DMSO	0.25M Sucrose	19	19	2	6	3	8	1.1
	3M DMSO	0.25M Trehalose	22	22	20	1	1	0	2.9
	3M DMSO	0.25M Lactose	68	64	50	9	3	2	2.7
	3M Ethylene glycol	0.25M Sucrose	18	18	8	3	2	5	1.8
	3M Ethylene glycol	0.25M Trehalose	23	22	16	3	1	2	2.5
	3M Ethylene glycol	0.25M Lactose	68	65	37	15	3	10	2.2
	3M Propylene glycol	0.25M Sucrose	18	17	6	5	1	5	1.7
	3M Propylene glycol	0.25M Trehalose	18	18	14	2	0	2	2.6
	3M Propylene glycol	0.25M Lactose	68	65	35	14	10	6	2.2
Copper	3M Glycerol	0.25M Sucrose	33	30	18	5	4	3	2.3
	3M Glycerol	0.25M Trehalose	48	44	34	4	0	6	2.5
	3M Glycerol	0.25M Lactose	29	29	13	7	1	8	1.9
	3M DMSO	0.25M Sucrose	34	32	20	5	3	4	2.3
	3M DMSO	0.25M Trehalose	19	19	14	3	0	2	2.5
	3M DMSO	0.25M Lactose	27	24	16	5	2	1	2.5
	3M Ethylene glycol	0.25M Sucrose	24	20	13	3	2	2	2.4
	3M Ethylene glycol	0.25M Trehalose	19	19	19	0	0	0	3.0
	3M Ethylene glycol	0.25M Lactose	26	25	12	5	1	7	1.9
	3M Propylene glycol	0.25M Sucrose	24	24	13	4	3	4	2.1
	3M Propylene glycol	0.25M Trehalose	36	33	21	6	6	0	2.5
	3M Propylene glycol	0.25M Lactose	23	17	8	8	1	0	2.4
Total			762	720	453	133	51	83	2.3

sucrose는 mean score 1.1로 가장 낮은 생존성을 각각 나타내었다.

침투성 동결보호제와 비침투성 동결보호제의 조합간의 생존성 비교는 Table 2와 같다. 3M ethylene glycol + 0.25M trehalose(mean score 2.8)와 3M DMSO + 0.25M trehalose(mean score 2.7)가 가장 높은 mean FDA score를 나타내고 있고, 3M DMSO + 0.25M sucrose(mean score 1.7)와 3M propylene glycol + 0.25M sucrose(mean score 1.9)는 각각 가장 낮은 생존성을 냈다. Smorag 등(1990)에 의하면 평형시 sucrose보다 trehalose가 세포벽 안정성 증진에 더욱 효과적임을 보고하였고, 본 실험의 결과도 마찬가지로 glycerol과 trehalose의 조합이 glycerol과 sucrose 조합보다 급속동결 생쥐 상실배에 효과적이었다. 이는 또한 Kim 등(1986)의 보고와도 일치함을 보인다. 그러나 Mazni 등(1990)과 Rayos 등(1992)은 본 실험과 같은 방법으로 평형시간 5분에 3M의 침투성 동결

보호제와 0.25M의 비침투성 동결 보호제를 사용하였을 경우 생쥐 상실배에서 ethylene glycol과 sucrose조합 그리고 lactose가 높은 성적을 내었다.

침투성 동결보호제간의 성적은 Table 3에 나타나 있듯이 3M glycerol이 가장 우수하게 나타났지만 다른 처리구와 통계적 유의성은 없었고 가장 낮게 나타난 3M propylene glycol도 mean score 수치상 유의적으로 낮지 않음을 알 수 있었다.

비침투성 동결보호제별 효과는 Table 4에 나타나 있듯이 mean FDA score에서 유의적 차이를 보였다. 0.25M trehalose 처리군이 mean score 2.6을 나타내 0.25M sucrose 처리군의 mean score 2.0에 비해 0.6의 차이를 나타내었고, 이는 최소유의차 검정에서 처리구 간에 유의적 차이가 있음이 밝혀졌다. Rayos 등(1994)의 연구에 의하면 난자의 동결 시에는 trehalose와 sucrose의 차이가 없음을 보고하고, 이 원인은 trehalose의 세포벽 안정화 효과가 종간 또는 수정란의 발달단계간 다르게 작용하는데

Table 2. Effects of permeable and nonpermeable cryoprotectants combination

Treatment		No. of embryos						Mean FDA score**
Permeable cryoprotectants	Nonpermeable cryoprotectants	No. of embryos cryoprotect	No. of embryos recovered	evaluated by FDA test				
				P3*	P2	P1	P0	
3M Glycerol	0.25M Sucrose	47	43	27	8	5	3	2.4
	0.25M Trehalose	64	60	46	7	1	6	2.6
	0.25M Lactose	97	94	56	21	3	14	2.2
3M DMSO	0.25M Sucrose	53	51	22	11	6	12	1.7
	0.25M Trehalose	41	41	34	4	1	2	2.7
	0.25M Lactose	95	88	66	14	5	3	2.6
3M Ethylene glycol	0.25M Sucrose	42	38	21	6	4	7	2.1
	0.25M Trehalose	42	41	35	3	1	2	2.8
	0.25M Lactose	94	90	49	20	4	17	2.1
3M Propylene glycol	0.25M Sucrose	42	41	19	9	4	9	1.9
	0.25M Trehalose	54	51	35	8	6	2	2.5
	0.25M Lactose	91	82	43	22	11	6	2.3
Total		762	720	453	133	51	83	2.3

\* 1) P3 : 100% fluorescence dye in blastomere(cell mass)

2) P2 : 2/3 fluorescence dye in blastomere(cell mass)

3) P1 : 1/3 fluorescence dye in blastomere(cell mass)

4) P0 : 0% fluorescence dye in blastomere(cell mass)

\*\* Mean FDA score = (P3 × 3 + P2 × 2 + P1 × 1 + P0 × 0) / Number of embryos

**Table 3. Effects of permeable cryoprotectants on the survival rate of frozen-thawed mouse embryos**

Permeable cryoprotectants	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test				Mean FDA score**
			P3*	P2	P1	P0	
3M Glycerol	208	197	129	36	9	23	2.4
3M DMSO	189	180	122	29	12	17	2.3
3M Ethylene glycol	178	169	105	29	9	26	2.3
3M Propylene glycol	187	174	97	39	21	17	2.2
Total	762	720	453	133	51	83	2.3

\* 1) P3 : 100% fluorescence dye in blastomere(cell mass) (3 point : complete survival)

2) P2 : 2/3 fluorescence dye in blastomere(cell mass) (2 point : moderate survival)

3) P1 : 1/3 fluorescence dye in blastomere(cell mass) (1 point : poor survival)

4) P0 : 0% fluorescence dye in blastomere(cell mass) (0 point : complete dead)

\*\* Mean FDA score =  $(P3 \times 3 + P2 \times 2 + P1 \times 1 + P0 \times 0) / \text{Number of embryos}$

**Table 4. Effects of nonpermeable cryoprotectants on the survival rate of frozen-thawed mouse embryos**

Nonpermeable cryoprotectants	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test				Mean FDA score**
			P3*	P2	P1	P0	
0.25M Sucrose	184	173	89	34	19	31	2.0 <sup>b***</sup>
0.25M Trehalose	201	193	150	22	9	12	2.6 <sup>a</sup>
0.25M Lactose	377	354	214	77	23	40	2.3 <sup>ab</sup>
Total	762	720	453	133	51	83	2.3

\* 1) P3 : 100% fluorescence dye in blastomere(cell mass)

2) P2 : 2/3 fluorescence dye in blastomere(cell mass)

3) P1 : 1/3 fluorescence dye in blastomere(cell mass)

4) P0 : 0% fluorescence dye in blastomere(cell mass)

\*\* Mean FDA score =  $(P3 \times 3 + P2 \times 2 + P1 \times 1 + P0 \times 0) / \text{Number of embryos}$

\*\*\* <sup>a, b</sup> Mean with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 5. Effects of metal materials on the survival rate of frozen-thawed mouse embryos**

Metal materials for freezing	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test				Mean FDA score**
			P3*	P2	P1	P0	
Stainless steel	420	404	252	78	28	46	2.3
Copper	342	316	201	55	23	37	2.3
Total	762	720	453	133	51	83	2.3

\* 1) P3 : 100% fluorescence dye in blastomere(cell mass) (3 point : complete survival)

2) P2 : 2/3 fluorescence dye in blastomere(cell mass) (2 point : moderate survival)

3) P1 : 1/3 fluorescence dye in blastomere(cell mass) (1 point : poor survival)

4) P0 : 0% fluorescence dye in blastomere(cell mass) (0 point : complete dead)

\*\* Mean FDA score =  $(P3 \times 3 + P2 \times 2 + P1 \times 1 + P0 \times 0) / \text{Number of embryos}$

이유를 두고 있다고 하였다. 세포벽의 손상은 삼투압의 결과인데 이는 탈수작용이 일어나는 동안 세포벽의 지나친 팽창(Steponkus와 Weist, 1979)과 세포내 물의 대량이동으로 인한 세포벽 결합의 파괴(Muldrew와 McGann, 1990) 때문으로 추측된다.

예비동결시 쓰였던 금속세망은 mean FDA score에서  $10^{-2}$  수준에서 구리망이 스텐레스 스틸망에 비해 경미한 차이를 보이며 높았으나, Table 5에서와 같이  $10^{-1}$  수준에서는 아무런 차이를 볼 수가 없었고 통계적 유의차도 관찰되지 않았다.

금속망의 동결시 효과는 stainless steel보다 열전도도가 빠른 구리에서 큰 효과를 볼 것이라 예측하였으나 mean FDA score  $10^{-2}$  정도에서 미비한 차이를 보이며 구리가 조금 높았다.

## 적 요

가축 수정란의 동결보존 기술을 개선하고자 수정란 동결 기기를 사용하지 않고 액체질소에 예비동결을 거쳐 침적하는 금속동결법으로 생쥐수정란을 straw에서 침투성 동결보호제인 glycerol, DMSO, ethylene glycol, propylene glycol과 비침투성 동결보호제인 sucrose, trehalose, lactose 액과 함께 동결한 후 용해한 생쥐수정란의 형태학적 회수상태 및 FDA처리에 의한 수정란의 생존성을 검토하였다. 또한 예비동결시 액체질소위에 띄운 금속망 재료를 달리 하였을 때의 생존성도 비교하였다.

1. 동결후 생존성 검사를 위해 회수된 수정란은 총 720개였으며 수정란의 FDA형광측정은 형광 순위로 P3 453개(63%), P2 133개(18%), P1 51개(7%), P0 83개 (12%)로서 total mean score는 2.3을 나타내었다.
2. 금속망 이용과 침투성 및 비침투성 동결보호제 처리효과는 구리망에서 3M ethylene glycol + 0.25M trehalose 처리구에서 mean FDA score 3.0(100%)의 가장 높은 생존성을 보였다.
3. 침투성 동결보호제와 비침투성 동결보호제의 조합간의 비교는 3M ethylene glycol + 0.25M trehalose가 mean FDA score 2.8로 가장

우수한 성적을 나타내었다.

4. 침투성 동결보호제별 효과는 각 처리구 간의 mean FDA score에서 유의적 차이를 보이지 않았다.
5. 비침투성 동결보호제별 효과에서는 0.25M trehalose 처리가 0.25M sucrose 처리에 비하여 mean FDA score에서 각각 유의적 차이 ( $P < 0.05$ )를 보이며 높은 score(2.6)을 나타내었다.
6. 예비동결에 사용한 금속망 처리효과에서는 구리망과 스텐레스 스틸망 간의 통계적 유의차가 인정되지 않았다.

## 참고문헌

- Abas Mazni O, Takahashi Y, Valdez CA, Hishinuma M and Kanagawa H. 1989. Effects of various cryoprotectants on the survival of mouse embryos cryopreserved by the quick freezing method. *Jpn. J. Vet. Res.*, 37: 29-40.
- Abas Mazni O, Valdez CA, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1990. Quick freezing of mouse embryos using ethylene glycol with lactose or sucrose. *Anim. Reprod. Sci.*, 22:161-169.
- Biery KA, Seidel GE, Jr and Elsdon RP. 1986. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging in liquid nitrogen. *Theriogenology*, 25:140 Abstr.
- Greve T and H Lehn-Jensen. Current status of embryo-transplantation in Denmark. *Theriogenology*, 11, 99.
- Heape W. 1890. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc. Roy. Soc. London*, 48, 457.
- Hoppe RW and Bavister. 1984. Evaluation of the fluorescein diacetate(FDA) vital dye viability test with hamster and bovine embryos. *Zuchtcyg*, 14:170-172.

- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1981. Effect of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 63:175-180.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakuai T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.*, 89:91-97.
- Kim SH, Chung KM, Lee CK and Imm KS. 1986. The effect of trehalose as a nonpermeable cryoprotectant on the survival of mouse morula frozen-thawed ultrarapidly. *Korean J. Anim. Sci.*, 31:768-773.
- Kojima T, Endo K, Uzisato Y, Fujino Y, Tomizuka T and Oguri N. 1989. Study on cryopreservation of pig embryos. *Jpn. J. of Freezing Drying*, 35:97-108.
- Krag KT, Koehler IM and Wright RW. 1985. Trehalose: a nonpermeating cryoprotectant for direct freezing of early murine embryos. *Theriogenology*, 23:200 Abstr.
- Linda RM and Trounson AO. 1980. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 58:189-196.
- Mazni OA, Takahashi Y, Valdez CA, Hishinuma M and Kanakawa H. 1989. Effect of various cryoprotectants on the survival of mouse embryos cryopreserved by the quick freezing method. *Jpn. J. Vet. Res.*, 37, 29-39.
- Mazni OA, Takahashi Y, Valdez CA, Hishinuma M and Kanakawa H. 1990. Quick freezing of mouse embryos using ethylene glycol with lactose or sucrose. *Anim. Reprod. Sci.*, 22:161-169.
- Mazur P. 1970. The freezing of biological system. *Science*, N. Y., 168:939-949.
- Miyamoto H and Ishibashi T. 1978. The protective action of glycol against freezing damage of mouse and rat embryos. *J. Reprod. Fert.*, 54:427-432.
- Muldrew K and McGann LE. 1990. Mechanism of intracellular ice formation. *Biophysics Journal*, 57:525-532.
- Rall WF. 1992. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for the application to the conservation of salmonid fishes. In : J.G.Cloud and G.H.Thorgaard(Editor), *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*, Plenum Press, New York, in press.
- Rayos AA, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1992. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose. *Theriogenology*, 37:595-603.
- Rayos AA, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose of trehalose. *J. Reprod. Fert.*, 100, 123-129.
- Sathananthan AH, ng, SC, Trounson AO, Bongso A, Rathana SS, Ho J, Mak H and Lee MN. 1988. The effects of ultrarapid freezing on the meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res.*, 21: 385-401.
- Schilling E, Sacher Smidt B, Petac D and Kaschab SE. 1979. Diagnosis of the viability of early bovine embryos by fluorescence microscopy. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 19(5):1625-1629.
- Schilling E, Niemann H and Smidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer.*, 349-355.
- Seok HB, Lee KW, Shin LY, Kim HJ, Cho YY, Chee SH, Oh DK, Im KS and Elsdon RP. 1983. Influences of frozen embryos conception in cattle. I. Effects of six step equilibrium in glycerol suspending medium. *Kor. J. Anim. Sci.*, 25, 369-374.



- Seok HB, Lee KW, Oh SY, Son DS, Yun CK, Kim HJ, Cho YY, Oh DK, Chee SH, Im KS and Mahon GD. 1984. Influences of frozen embryos conception in cattle. III. Effects of surgical transfer of ova rehydrated by five step for glycerol elimination. Kor. J. Anim. Sci., 26, 429-434.
- Shea BF, Janzen RE, McAllister RJ and McDermid DP. 1983. Freezing of bovine embryos: Effect of embryo quality, time from thawing to transfer and number of frozen per vial. Theriogenology, 20, 205-212.
- Smorag Z, Heyman Y, Garnier V and Gajda B. 1990. The effect of sucrose and trehalose on the viability of one- and two-cell rabbit embryos. Theriogenology, 33:741-747.
- Steponkus PL and Wiest SC. 1979. Freeze-thaw induced lesions in the plasmamembrane low temperature stress in crop plants, pp. 221-254. Eds. J. M. Lyons., D. Graham and J. K. Raisson. Academic Press, London.
- Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner V, Bronhteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt RE, Lin TT and MacIntyre RJ. 1990. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. Nature, 345, 170-172.
- Szell A and Shelton JN. 1986. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. J. Reprod. Fertil., 78:699-703.
- Szell A and Shelton JN. 1987. Osmotic cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. J. Reprod. Fertil., 80:309-316.
- Takahashi Y and Kanagawa H. 1990. Effects of equilibration period on the viability of frozen-thawed mouse embryos after rapid freezing. Mol. Reprod. Dev., 26:105-110.
- Takeda T, Elsdon RP and Seidel GE, Jr. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. Theriogenology, 21:268 Abstr.
- Trounson AO, Pough A, Aarts MH and Fielden ED. 1980 The development of bovine embryos after freezing and international transport. 12th Annual Conf. Australian Soc. for Reproductive Biology. Univ. of New England, Armidale.
- Trounson AO, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertil. Steril., 48:843-850.
- Trounson AO, Peura A, Freeman L and Kirby C. 1988. Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and 8-cell mouse embryos. Fertil. Steril., 49:822-826.
- Whittingham DG. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature, 223:125-126
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . Science, 178:411-414.
- Willet EL, Buckner PJ and Larson GL. 1953. Three successful transplantations of fertilized bovine eggs. J. Dairy Sci., 37, 520.
- Williams TJ and Johnson SE. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. Theriogenology, 26:125-133.
- Willadsen SM. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In the freezing of mammalian embryos. Elliott, K. & Whelan, J. Eds. CIBA Foundation. Amsterdam, Excerpta Medica, pp. 175-201.
- Wilmot I and Rowson LEA. 1973. Experiments of the low temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec., 92:686-690.
- 석호봉. 1989. 가축 수정란 동결보존의 최근 이용방법. 한국수정란이식연구회지, Vol. 4. No. 1 pp.1-13.
- 석호봉, 이광원, 손동수. 1991. 수정란의 급속 동결 융해법에 관한 연구 - II. 비침투성 농결보호

제가 급속동결한 마우스 수정란의 생존성에 미치는 영향. 韓畜誌, 33(7) 495-502.