

Vitrification 동결보존이 토끼 핵이식 수정란의 생존성에 미치는 영향[†]

박충생 · 전병균 · 강태영* · 이효종* · 최상용*

경상대학교 농과대학 축산학과

Effect of Cryopreservation by Vitrification on Viability of Nuclear Transplant Rabbit Embryos

Park, C. S., B. G. Jeon, T. Y. Kang*, H. J. Lee* and S. Y. Choe*

Department of Animal Science, College of Agriculture,

Gyeongsang National University

SUMMARY

For a large scale production of genetically identical or cloned animals, the effect of cryopreservation by vitrification on the post-thaw viability of nuclear transplant rabbit embryos were investigated. The embryos of 16-cell stage were collected from the mated does at 48 hours post-hCG injection, and they were synchronized to G₁ phase of 32-cell stage. The separated G₁ phase blastomeres of 32-cell stage were injected into enucleated recipient cytoplasm by micromanipulation. After culture until 20h post-hCG injection, the nuclear transplant oocytes were electrofused and activated by electrical stimulation. After *in vitro* culture for 48h, the nuclear transplant embryos developed to morula stage were cryopreserved with EFS solution by vitrification method. The frozen nuclear transplant embryos were thawed and cultured for 72h and the nuclear transplant embryos developed to blastocyst stage stained with Hoechst 33342 dye for counting the number of blastomeres under a fluorescence microscopy.

The *in vitro* development to blastocyst of intact-fresh and intact-frozen 16-cell embryos was found to be 96.9 and 63.9%, respectively. The *in vitro* development to blastocyst of nuclear transplant and frozen-thawed nuclear transplant embryos was found to be 74.5 and 42.9%, respectively. Also, their mean blastomere numbers and mean cell cycles /day was 153 and 105, 145 and 1.34, respectively. From the above results it was concluded that the present cryopreservation by vitrification of nuclear transplant rabbit embryos might be useful though was decreased significantly.

I. 서 론

핵이식에 의한 복제수정란의 대량 생산을 위해서는
대량의 수핵난자 및 효율적인 공핵란을 필요로 한다.
수핵난자는 체외성숙된 난자를 수핵란으로 이용할 수

[†] 본 연구는 한국과학재단에서 1992~1995년도에 지원한 특정기초 연구사업비로 수행되었음(KOSEF:92-24-00-10).

* 경상대학교 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University).

있으며 할구의 공급원이 되는 공핵란을 동결보존의 방법으로 장기보존하여 이용할 수 있다. 토끼에서 박 등 (1995)은 체외성숙된 난자를 수핵란으로 사용하였고 이를 이식하여 산자도 생산하였다. 또한 체외성숙 난자와 동결보존된 공핵란을 이용하여 복제 수정란 생산의 가능성을 보여 주었다. 국외에서는 소에서 공핵란의 공급원으로 동결보존된 수정란을 이용하여 핵이식 수정란을 작출하였다(Westhusin 등, 1991 ; Ushijima와 Eyo, 1992).

그러나 수핵난자와 공핵란을 동시에 공급하여 복제 수정란을 생산하여도 이를 적기에 수란축에 이식하는 것이 어려울 때가 있다. 그러므로 복제 수정란을 산업적으로 이용하기 위해서는 수정란 이식 기술의 개발뿐만 아니라 이러한 복제수정란을 동결보존하는 기술이 확립되어야 한다.

수정란을 동결하는 방법으로는 완만동결법과 급속동결법이 있는데 완만동결법은 절차상의 번거로움 등의 문제점으로 요즘에는 동결과정이 아주 간편하며 시간도 짧고 고가의 동결기구 등이 필요치 않으면서도 동결, 용해 후 생존성이 높은 vitrification 방법이 개발되었다. Vitrification 방법은 수정란을 고농도의 동결보호제에 부유시켜 세포내, 외의 수분을 빙정화시키지 않고 과냉각 상태로 유지하여 투명한 유리와 같이 변화게 한다. 이 방법은 Rall과 Fahy(1985)에 의하여 처음으로 응용되었다.

지금까지 국내외에서 핵이식 수정란을 동결보존하여 그들의 생존성을 조사한 예는 보고된 바가 없다. 이러한 견지에서 본 실험은 토끼에서 핵이식 수정란을 동결보존하고 용해 후 핵이식수정란의 생존성을 규명하여 복제수정란의 대량 생산에 의한 이용 가능성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험에 사용된 공시동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원에축산전문대학으로부터 공급받았으며 사용 전에 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵란의 준비

토끼의 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 30 mg의 FSH(Foltropin[®], Australia)를 3일 동안 하루에 두 번씩 분할하여 근육주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(Puberogen[®], Japan) 100 IU를 정맥주사하였다. hCG 주사 후 13~15시간에 암토끼를 chloropromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복 수술하여 난관으로부터 배란되어진 성숙 난자를 10% fetal calf serum(FCS, Gibco Co., U.S.A.)이 함유된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Sigma Co., U.S.A.)으로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma Co., U.S.A.)에서 39℃, 5% CO₂ 조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μm fire-polished pipette으로 반복 pipetting하여 난구 세포를 제거하고 제 1극체가 명확하며 세포질이 균일하고 충실한 것만 수핵란으로 사용하였다.

3. 공핵란의 준비

난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 Robl 등 (1987)의 방법에 따라 실시하였고, hCG 주입 후 20시간에 전기자극으로 유도하였다. 전기자극은 이 등 (1993)의 융합 조건에 따라 1.25 kV/cm의 전압과 60 μsec의 통전시간으로 3회 통전하여 실시하였다. 세포 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100 μM CaCl₂, MgCl₂ 및 0.1%(W/V) BSA가 함유된 비전해질의 0.28 M mannitol 용액으로 사용하기 2시간 전에 만들어 25℃의 실온에서 평형시킨 후 사용하였다. 그 후 할구가 이식된 난자를 이 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소적에 옮기고 할구가 주입된 난자를 배열하여 electro cell fusion manipulator(Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 할구와 세포질의 융합 및 난자의 활성화를 유도하였다.

토끼를 전향 2)와 같이 과배란을 유기한 다음 성숙된 수토끼와 교미를 시켰다. 16-세포기에 있는 수정란은 hCG 주사 후 48시간에 채란하였고, 회수된 수정란의 일부는 체외배양 혹은 동결 보존하였고 일부는 공핵란으로 사용하기 위하여 세포주기의 조절 후 0.5%의 pronase(Sigma Co., U.S.A.)에서 8분간 배양하여 mucin coat를 제거하고 투명대를 연화시킨 다음 150 μm 정도의 pipette으로 투명대를 제거하였고, 50 μm 정도의 pipette으로 Ca²⁺ - Mg²⁺가 걸여된 PBS

에서 할구를 분리하여 사용하였다.

4. 공핵란의 세포주기 조절

할구 세포를 32-세포기의 G₁기로 세포주기를 동기화하는 방법은 Collas와 Robl(1992)의 방법을 따랐다. 간단히 요약하면, 채란된 16-세포기의 수정란을 0.5 μg/ml의 microtubules 중합 억제제인 colcemid (Gibco Co., U.S.A.) 및 10% FCS가 포함된 M-199(Earl's salt, Sigma Co., U.S.A.)에서 10시간 배양하여 16-세포기가 32-세포기로 넘어가는 세포 분열의 중기에 정지시킨 다음, DNA 합성 억제제인 0.1 μg/ml의 aphidicolin(Sigma Co., U.S.A.) 및 10% FCS를 포함한 M-199에서 1.5~2시간 동안 배양하여 세포분열 완성후 32-세포기의 G₁기의 할구를 공핵란으로 사용하였다. 또한, 미세조작도 0.1 μg/ml의 aphidicolin이 포함된 배양액에서 실시하였고, 미세조작 후 역시 할구와 세포질의 융합 때까지 0.1 μg/ml의 aphidicolin 및 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 배양하여 할구가 완전히 세포질에 융합될 때까지 할구 핵의 DNA 합성을 정지시켜 공핵란의 세포주기를 G₁기로 유지시켰다.

5. 핵이식을 위한 미세조작

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl(1988)과 Collas와 Robl(1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵란과 공핵란으로부터 분리된 할구 세포를 7.5 μg/ml의 세포골격 억제제인 cytochalasin B(Sigma Co., U.S.A.), 0.1 μg/ml의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution(EBSS, Sigma Co., U.S.A.)에서 미세조작 15분전에 전처리를 하였고, 미세조작을 위하여 micromanipulators(Narishige Co., Japan)를 DIC 독립현미경(Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 미세조작 또한, 7.5 μg/ml의 cytochalasin B, 0.1 μg/ml의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 EBSS에서 실시하였고, 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 non-disruptive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 M II 난자를 150 μm의 미세 pipette으로 고정시키고 핵을 제거하기 위하여 30 μm의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시켜 제1극체와 그 주위에 위치하는 제2감수분열 중기의 염색체를 원형질

막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 한편, 공핵란 으로부터 분리된 할구 세포 하나를 탈핵에 사용한 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵란의 원형질 바깥 위란강에 주입하였다.

6. 세포 융합 및 난자의 활성화

핵이 주입된 난자는 Robl 등(1987)의 방법에 따라 난자의 세포질과 할구의 융합 및 난자의 활성화를 실시하였다. 전기자극은 이 등(1993)의 융합 조건에 따라 전압은 1.25 kV/cm, 통전 시간은 60 μsec 및 3회의 통전횟수를 정하였다. 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100 μM CaCl₂, MgCl₂ 및 0.1%(w/v)의 BSA가 함유된 0.28 M mannitol 용액으로 사용하기 2시간 전에 만들어 실온에서 평형시킨 후 사용하였다. 그 후 할구가 이식된 난자를 이 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소적에 옮기고 할구가 주입된 난자를 배열하여 electro cell fusion manipulator(Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 할구와 세포질의 융합 및 난자의 활성화를 유도하였다.

7. 핵이식 수정란의 체외배양

노 등(1994)의 기술에 따라 융합이 확인된 수정란은 4-well dish에 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼 난관 상피세포와 같이 39℃의 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다. 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며, 모든 기본 배양액은 12시간 전에 배양기내에서 배양을 하여 pH의 평형을 유도하였고, 미세조작 및 세포주기 조절을 위한 배양액은 사전에 미리 평형된 기본배양액에서 사용하기 바로 전에 만들어 사용하였다.

8. 핵이식 수정란의 동결보존 및 융해

이(1994)의 의견에 따라 융합 후 48시간에 상실배로 발달한 핵이식 수정란 및 hCG 주입 후 48시간째에 채란된 정상 수정란을 EFS solution(ethylene glycol 40% + ficoll 70 18% + sucrose 0.3 M + 10% FCS)을 이용하여 동결하였다. 우선 실온에서 EFS solution에 약 1~2분간 평형을 유도하여 straw 당 7~10개의 수정란을 주입하여 액체질소에 침적하였다.

동결 수정란의 용해는 고농도의 삼투압 영향을 줄이기 위하여 20℃의 water bath에서 서서히 흔들면서 약 10초간 용해하였다. 용해한 straw는 sealing powder와 cotton plug의 양쪽부분을 절단하여 0.5 M sucrose의 희석용액이 있는 petri dish에 유출시켜 희석을 시키고, 0.5 M sucrose용액으로 5분간 희석후 배양액으로 세척하여 배양하는 방법으로 실시하였다.

동결 용해 후 72시간 동안 5%, 39℃, CO₂ incubator에서 체외배양을 실시하여 배반포기까지 발달한 것을 생존한 것으로 판정하여, 생존한 수정란의 일부는 동결 용해 과정에서의 상해 여부를 판단하기 위하여 Hoechst 33342로써 핵염색을 실시하여 할구수를 비교 조사하였다.

9. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 발달율은 Chi-square test를 실시하였고, 할구수는 Student T-test를 실시하여 처리군 간의 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 정상 수정란의 동결, 용해 후 생존성

핵이식 수정란의 동결보존 후 생존율을 조사하기 앞서 hCG 주입 후 48시간째에 채란된 정상 수정란을 일부는 72시간 동안 체외배양하고 일부는 vitrification 방법으로 동결한 다음 용해하여 72시간 동안 체외배양하여 그들의 생존성을 조사하고, 동결하지 않은 수정란과 비교한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 동결하지 않은 정상 수정란은 96.9%가 배반포기 단계로 발달하였지만, 동결, 용해된 정상 수정란은 63.9%가 배반포기까지 발달하여 동결, 용해 후 생존성이 유의적($P < 0.05$)으로 저하되었다.

2. 핵이식 수정란의 동결, 용해 후의 생존성

핵이식 수정란을 세포 융합 후 48시간 동안 체외 배양하여 상실기 단계로 발달한 것을 일부는 72시간 동안 체외배양하고 일부는 vitrification 방법으로 동결한 다음 용해하여 72시간 동안 체외배양하여 그들의 생존성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 동결하지 않은 핵이식 수정란은 배반포로의 발달율이 74.5%이었던

Table 1. Comparative viability of intact rabbit embryos following cryopreservation and thawing by vitrification method

Type of embryos	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to	
		Blastocyst	Degenerated
Intact-fresh	96	93(96.9) ^a	3(3.1)
Intact-frozen	83	53(63.9) ^b	30(36.1)

^a The values with different superscripts in the column are significantly different($P < 0.05$).

^b All of the embryos were cultured *in vitro* for 72h after thawing.

Table 2. Comparative viability of nuclear transplant(NT) rabbit embryo following cryopreservation and thawing by vitrification method

Type of embryos	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to	
		Blastocyst	Degenerated
Fresh-NT	55	41(74.5) ^a	14(25.5)
Frozen-NT	92	38(41.3) ^b	54(58.7)

^a The values with different superscripts in the column are significantly different($P < 0.05$).

^b All of the embryos were cultured *in vitro* for 72h after thawing.

으나 동결, 용해 핵이식 수정란은 42.9%가 배반포로 발달하여 역시 동결, 용해 후 핵이식 수정란에서 유의적($P < 0.05$)으로 발달율이 떨어졌다.

3. 동결, 용해한 핵이식 수정란의 평균 할구수

핵이식 수정란의 동결 과정이 수정란 할구수에 미치는 손상 여부를 확인하기 위하여 동결, 용해 후 배반포로 발달한 것을 Hoechst 33342로 염색하여 할구수를 헤아린 결과는 Table 3과 같다. 동결하지 않은 핵이식 수정란의 할구수는 평균 153개이었고 이들의 하루 평균(24시간) 세포주기는 1.45회이었다. 그러나 핵이식 수정란의 할구수는 평균 105개이었고 하루 평균 세포주기는 1.34회로 핵이식 수정란의 할구수는 유의적으로 할구수가 적어 동결, 용해의 과정에서 손상이 일어났음을 알 수 있었다.

Table 3. Mean number of blastomeres and daily cell cycle of nuclear transplant(NT) embryos following cryopreservation and thawing by vitrification method

Type of embryos	No. of embryos stained	No. of blasomeres*	Cycle no. of embryo /day
Fresh-NT	10	153 ± 17.1 ^a	1.45 ± 0.82 ^a
Frozen-NT	10	105.2 ± 20.8 ^b	1.34 ± 0.88 ^b

* Mean ± SEM.

^{a,b} The values with different superscripts in the column are significantly different ($P < 0.05$).

이(1994)는 상실기 정상 수정란의 동결, 융해 후 생존율은 85%이었음을 보고하였고, Kasai 등(1992)은 80%의 생존율을 보고하였으나, 본 실험에서는 정상 수정란의 생존율이 63.9%로 다소 저조하였다. 또한 핵이식 수정란을 동결한 것과 동결하지 않은 것을 비교하여 보면, 동결한 것에서 배반포로의 발달율이 저조하였으며 할구수에서도 유의적인 차이를 나타내었다. 이러한 수정란의 급속 동결시 수정란 및 세포 사멸의 주원인은 동결보호제의 화학적 독성, 평형 시간 및 세포의 삼투적 위축, 세포 내부의 빙정 형성에 있으며, 세포내, 외부에서 생성되는 빙정은 세포에 물리적 압력을 가함으로써 세포질의 파괴를 일으키고 수정란의

평형시 동결보호제와 세포내 수분 이동에 필요한 시간과 융해 후 세포내 동결보호제의 이동이 세포의 발달에 큰 영향을 미치게 되므로 동결, 융해 후의 생존율에 큰 영향을 미친다(Rall 등, 1984; Rall, 1987; Trounson 등, 1987; Wilton 등, 1989). 또한 Lehn-Jensen 및 Tekeli(1987)은 동결, 융해하여 체외배양하면 할구가 손상되어 생존 세포수가 감소된다고 하였다. 노동(1994)은 토끼의 정상 수정란을 1-세포기에 채란하여 교미 후 96시간까지 체외에서 공배양한 결과 할구수가 216개이었다고 하였으며, 이(1994)는 상실배 단계의 수정란을 동결, 융해 후 미소적에서 24시간 배양한 결과 배반포에서 할구수가 125개이었다고 보고하여 동결 수정란이 할구수에서 유의적으로 차이를 나타내었고, 핵이식 수정란은 정상 수정란보다 물리적, 화학적 손상에 더욱 민감하여 역시 생존율에 영향을 미친다고 사려된다.

본 실험에서 토끼에서 핵이식 수정란의 동결보존이 가능함을 입증하였다. 동결보존된 핵이식 수정란은 정상 수정란에 비하여 생존율이 저하되었고 할구수에서도 감소하였다. 앞으로 핵이식 수정란을 동결보존하여 복제동물을 생산하기 위하여는 동결, 융해 후의 생존성 향상에 관하여 더욱 연구되어야 하며 핵이식 수정란의 작출효율을 더욱 증진시키는 1) 미세조작기술의 향상, 2) 세포융합기술의 개선, 3) 복제수정란의 체외

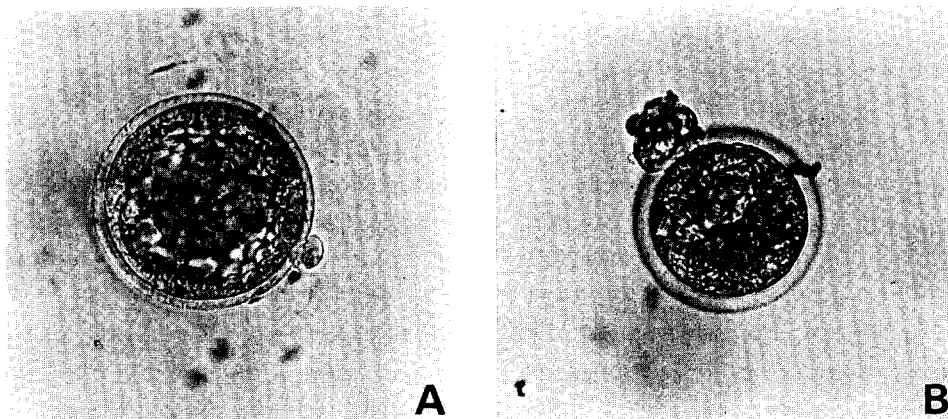


Fig. 1. Intact(A) and nuclear transplant(B) rabbit embryos developed *in vitro* to blastocyst stage after *in vitro* culture for 72h following cryopreservation and thawing by vitrification method. B shows hatching-like extrusion of partial cell mass through the zona pellucida aperture formed by previous micromanipulation($\times 100$).

배양체계의 개선, 4) 공핵수정란과 수정란자의 세포주기 조절과 핵의 완전한 reprogramming, 및 5) 복제수정란의 체내이식후 수태율 향상을 위한 핵이식수정란과 수란축 생식기관과의 동기화(synchronization) 등에 관하여 많은 검토와 연구가 수행되어야 할 것으로 본다.

IV. 적 요

본 연구에서는 토끼 핵이식 수정란의 동결보존에 관하여 연구하기 위하여 핵이식된 수정란을 vitrification 방법으로 동결, 융해 후 체외배양하여 배반포로의 발달을 및 할구수를 조사하였다. 과배란시킨 토끼의 난관으로 부터 16-세포기의 수정란을 채란하고 이들의 일부는 동결 보존하였고 일부는 할구의 세포주기를 G₁ 기로 조절한 할구세포를 분리하여 공핵란으로 사용하였다. 이들 분리된 할구세포를 탈핵된 위란막강에 미세조작으로 주입하였다. 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주입 후 20시간에 전기 융합하여 48시간 공배양하여 상실배 단계로 발달한 핵이식 수정란을 동결하였다. 동결 융해 후 72시간 동안 72시간 체외배양을 실시하여 배반포기까지 발달한 것을 생존한 것으로 판정하였으며, 생존한 수정란의 일부는 동결 융해 과정에서의 상해 여부를 판단하기 위하여 Hoechst 33342 staining dye로 핵염색을 실시하여 할구수를 비교조사하였다.

hCG 주입 후 48시간째에 채란된 정상 수정란을 72시간 동안 체외배양하였을 때 96.9%가 배반포기 단계로 발달하였으나 동결, 융해한 정상 수정란을 생존율이 63.9%이었다. 역시, 세포 융합 후 48시간에 상실배 단계의 핵이식 수정란을 72시간 동안 체외배양하였을 때 74.5%가 배반포기 단계로 발달한 반면, 동결, 융해된 핵이식 수정란은 생존율이 40%를 나타내어 동결, 융해 후 수정란의 손상에 의하여 발달율이 감소함을 확인하였다. 또한 핵이식 수정란을 동결, 융해 후 할구수 및 하루 평균의 세포주기를 조사한 결과 105개의 할구 및 하루 1.34회의 세포주기를 보였는데 반하여 동결하지 않은 핵이식 수정란을 120시간 배양하였을 경우 153개이었고 하루 1.45회의 세포주기를 보여 동결, 융해 후 핵이식 수정란에서 할구세포의 물리적, 화학적인 손상에 의해 할구수가 감소함을 확인하였다.

이상의 결과로부터 토끼에서 핵이식 수정란의 동결보존이 가능하다고 사려되나, 토끼에서는 핵이식 수정란의 동결, 융해 후의 생존성 및 체외발달 능력면에서는 차이가 있음이 확인되었다.

V. 인용문헌

1. Collas, P. and J. M. Robl. 1991. Relationship between nuclear remodelling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 45: 455-465.
2. Collas, P., C. Pinto-Correia, F. A. Ponce De Lean and J. M. Robl. 1992(b). Effect of donor cell stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:501-511.
3. Collas P., J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1992(a). Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:492-500.
4. Collas, P. and J. M. Robl. 1990. Factor affecting the efficiency of nuclear transplantation in rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 43:877-884.
5. Fischer, B., T. Jung, C. Helgele-Hartung, H. M. Beier. 1990. Development of preimplantation rabbit embryos in uterine flushing - supplemented culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 27:216-223.
6. Kasai, M. et al. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol. Reprod.* 46:1042-1046.
7. McGrath J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220:1300-1302.
8. Neiman, H. et al. 1982. Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freez-

- iong and thawing method. Theriogenology 17:102 abstr.
10. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad Jr., R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology 24:687-691.
 11. Rall, W. F. 1987. Factor affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiol. 24:387-402.
 12. Rall, W. F. and G. M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature. 313:573-575.
 13. Robl, J. M., R. Prather, F. L. Barnes, W. H. Eyestone, D. Northey, B. Gilligan and N. L. First. 1987. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenol. 24:687-691.
 14. Stice, S. L., C. L. Keefer, M. Maki-Laurila and L. Mattews. 1993. Donor blastomere cell cycle stage affects developmental competence of bovine nuclear transfer embryos. Theriogenology 39:318(abstract).
 15. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 39:657-664.
 16. TaKeli, T. O., K. Kweon and H. Kanagawa. 1987. The viability of deep-frozen aggregated mouse embryos. Jpn. J. Vet. Res. 35:283.
 17. Trouson, A. O., A. Peura and C. Kirby. 1987. Ultrarapidly freezing : A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertil. Steril. 48:843-850.
 18. Ushijima, H. and T. Eyo. 1992. Production of a calf from a nuclear transfer embryos using *in vitro* matured oocytes. J. Reprod. Dev. 38:61-65.
 19. Westhusin, M. E., J. H. Pryor and K. R. Bondioli. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed and nuclear transfer donor embryos. Mol. Reprod. Dev. 28:119-123.
 20. 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 1994. 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과. 한국가축번식학회지 18:39-46.
 21. 박충생, 전병균, 이경미, 윤희준, 이효종, 최상용, 박충생. 1995. 토끼의 체외배양 난자를 이용한 핵이식으로 복제수정란 및 복제산자의 생산. 한국수정란이식학회지 10:65-72.
 22. 이영락. 1994. Vitrification 방법에 의한 토끼 수정란의 동결보존시 발달단계와 평형시간이 생존성에 미치는 영향. 경상대학교 석사학위논문