

## 소 수정란의 간이 동결기법 개발에 관한 연구

### I. 내동제의 종류, 농도 및 동결방법이 체외발생율에 미치는 영향<sup>+</sup>

김상근 · 남윤이 · 현병화\* · 석호봉\*\*

충남대학교 수의과대학

## Studies on the Development of Easy Cryopreservation Technique of Bovine Embryos

### I. Effects of Kinds, Concentration and Freezing Method of Cryoprotectants on *In Vitro* Developmental Rates of Embryos

Kim, S. K., Y. Y. Nam, B. H. Hyun\* and H. B. Seok\*\*

Coll. of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ.

#### SUMMARY

The studies on the carried out to investigate the effective concentration of cryoprotectant agents and sucrose by one-step straw method of bovine embryos. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing 10 IU/ml PMSG(Sigma, USA), 10 IU/ml hCG(Sigma, USA), 1 $\mu$ g/ml  $\beta$ -estradiol(Sigma, USA) and 10% FCS for 24~48 hrs in incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 $^{\circ}$ C and then matured oocytes were again cultured for 12~18 hrs with motile capacitated sperm by preincubation of heparin. The bovine embryos following dehydration by cryoprotective agents and a various concentration of sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 30 $^{\circ}$ C water. Survival and *in vitro* developmental rate was defined as developmental rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The high *in vitro* developmental rates of bovine frozen embryos after rapidly thawed in freezing medium was attained 2.0M glycerol, 2.0M DMSO, 1M or 2.0M propanediol.
2. The high *in vitro* developmental rates of bovine frozen embryos after rapidly thawed in freezing medium was obtained single cryoprotectant(6.7~17.4%) than mixed cryoprotectants (6.7~16.7%).
3. *In vitro* developmental rates of bovine embryos after rapid frozen-thawing in the freezing medium added 0.25M and 0.50M sucrose were higher cleavage rate than those of sucrose concentration of 0.75M and 1.00M.
4. The freezing methods on *in vitro* developmental rates of bovine embryos was attained slow freezing method(9.70~15.6%) higher than rapid freezing method(9.4~13.3%).

<sup>+</sup> 이 논문은 교육부지원 연구비(1996)에 의하여 수행되었음.

\* 한국과학기술원 부설 생명공학연구소(Korea Research Institute of Biosci. & Biotech.)

\*\* 단국대학교 농과대학(Coll. of Agr., Dankook University)

(Key words : Cryoprotectants, Freezing method, Rapid freezing, *In vitro* developmental rate)

## I. 서 론

수정란 이식분야에 첨단기술들을 활용하여 산업화된 기술로 발전시키기 위해서는 수정란의 대량생산 체계의 확립과 생존성이 높은 동결보존 기술의 확립이 시급히 요청되며 아울러 고가의 기자재 등 많은 경비가 소요되지 않으면서도 현장에서의 응용이 가능한 간이동결 기술의 확립이 절실히 요청된다.

포유동물의 동결에 관한 연구는 glycerol, dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 sucrose 등과 같은 내동제를 첨가하여 수정란을 급속동결하는 초자화 동결방법이 보고되고 있다. 그러나, 수정란의 동결에는 내동제의 종류와 첨가농도, 식빙방법, 동결속도 등 수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인이 대단히 많으나 이에 관한 연구보고는 드물다. 수정란의 동결은 실험동물을 대상으로 동결 보존하였으나, 최근에는 vitrification solution을 제조하여 액체질소 container의 증기로 직접 동결하거나, 고농도의 내동제를 이용하여 동결전 수정란내의 수분을 탈수시킨 상태에서 직접 액체질소 중에 침지하는 간편한 급속동결법에 관한 연구가 이루어지고 있다(Krag 등, 1985; Hsu 등, 1986; 김과 이, 1991; Takeda 등, 1984; Williams와 Johnson, 1985; Szell과 Shelton, 1987). 수정란의 동결시 sucrose의 적정농도는 Mapletoft 등(1989a)과 Trounson 등(1987)은 0.5M, Szell과 Shelton(1987), Wilton 등(1989)은 0.25M, Hernandez-Ledezma 등(1988a, b)은 0.01M, 0.25M, 0.50M, Mapletoft 등(1987)은 1.0M과 1.5M, Andrede와 Rodrigues(1987)는 1.0M이 생존율이 높았다고 보고하였다. 동결 융해시에 소요되는 시간과 경비를 절약하고 그 과정을 간편하게 하는 급속동결 기법은 수정란의 동결과 융해 처리시간을 단축하고, 처리용기로써 과거의 초자류나 ampules 대신에 plastic straw를 사용하게 되었고 급속 또는 초급속동결방법을 이용하려는 시도가 많아지고 있다. 현재의 수정란 동결방법은 programing된 자동동결기에 의하여 표준화되어 수행되고 있으나 이 방법은 고가의 기자재가 요구되어 현장에서 응용하는데는 많은 문제점을 가지고 있어

저렴하면서도 생존성이 높은 간편한 동결기법의 개발이 요청되고 있는 실정이다.

이에, 본 연구는 소 수정란의 간이동결 기법을 개발하고자 동결시 단일 또는 복합내동제의 농도, sucrose 농도 및 동결법 등이 체외발생율에 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 난포란의 회수

도살한 소의 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 생리식염수에 침지하여 실험실로 운반한 다음, 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실험현미경(20~40×)하에서 난포란을 회수하여 배양액으로 3회 세척 후 CO<sub>2</sub> 배양기내(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5℃)에서 배양하였다.

#### 2) 배양액

체외배양을 위한 기본배양액은 10%(v/v)의 FCS와 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 µg/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Whittaker, M.A., USA) 배양액을 이용하였으며, 사용전 0.2 µm millipore filter로 여과 멸균 후 사용하였다. 기본배양액에 10 IU/ml의 PMSG (Sigma, USA), 10 IU/ml의 hCG(Sigma, USA), 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA)을 첨가하여 배양하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 난포란의 체외성숙 및 체외수정

난포란의 체외성숙은 배양액 50 µl의 drop을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간 전에 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 5~6시간 평형시킨 후 drop당 5개의 난포란을 침지하여 24시간 성숙배양하였다. 체외수정은 주위의 난구세포를 pipetting에 의하여 일부 제거한 다음 mineral oil로 피복한 45 µl의

drop에 5개의 난포란을 주입한 후, 수정용 TCF액 1 ml에 정액 0.2 ml를 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 swim-up 처리 후, 상층액을 1,000 rpm으로 10분간 2회 원심분리하여 세척하고 정자 pellets를 동량의 100 μg/ml의 heparin(Sigma, USA)이 첨가된 BO액으로 희석하여 15분간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정능획득을 유지시킨 정자부유액 2 μl(1.5×10<sup>6</sup> cells/ml)로 매정하였다.

### 2) 수정란의 동결

수정란의 동결은 1~18 cell의 초기배를 이용하여 glycerol, DMSO 및 propanediol 등의 내동제를 각각 1.5M, 2.0M + 0.25M sucrose + 10% FCS + PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 각각 5분간 평형시킨 후 1 cm 높이의 부표위에 straw를 놓아 5분간 예냉시킨 다음 액체질소에 곧바로 침지함으로써 급속동결을 실시하였다.

### 3) 체외발생 및 생존성의 판정

체외발생 및 생존성의 판정은 동결한 수정란을 실온에 1분간 방치후 38℃의 온수에서 용해한 다음 신선한

PBS로 3회 세척하고 배양액에서 배양하면서 상실배 후기 및 배반포기로의 발생상태를 관찰하여 판정하거나, FDA-test에 의해 판정하였다(Schilling 등, 1982).

## III. 결과 및 고찰

### 1. 내동제의 종류에 따른 체외발생을

#### 1) 단일내동제

소 수정란의 급속동결에 있어서 내동제에 첨가된 glycerol, DMSO, propanediol의 농도에 따른 급속동결 용해후의 체외발생율은 Table 1과 같다.

1.0M, 2.0M, 3.0M, 4.0M의 glycerol, DMSO, propanediol의 내동제에 0.25M, 0.50M sucrose를 첨가하여 급속동결 용해하였을 때 체외발생율은 glycerol의 경우 9.1~15.6%와 6.7~12.9%였으며, DMSO의 경우 9.4~17.4%와 9.7~13.3%, propanediol의 경우 9.1~16.1%와 7.1~13.3%로서 미동결 대조군의 26.7%와 23.3%에 비해 낮은 성적이었다. 또한, 각 내동제의 첨가수준은 2.0M glycerol,

**Table 1. Effects of simple cryoprotectants concentration added to freezing media on *in vitro* developmental rates of rapidly frozen bovine embryos**

Freezing medium(M)	Sucrose concentration(M)					
	0.25			0.50		
	Frozen	Survival(%)	No. of morula & blast.(%)	Frozen	Survival(%)	No. of morula & blast.(%)
Control			30/8(26.7)			30/7(23.3)
1.0 G*	32	9(28.1)	5(15.6)	26	8(30.8)	3(11.5)
2.0 G	31	10(32.3)	5(16.1)	31	9(29.0)	4(12.9)
3.0 G	30	9(30.0)	4(13.3)	31	9(29.0)	3( 9.7)
4.0 G	33	9(27.3)	3( 9.1)	30	5(16.7)	2( 6.7)
1.0 D	32	9(28.1)	5(15.6)	29	6(20.7)	3(10.3)
2.0 D	34	11(32.4)	6(17.4)	30	10(33.3)	4(13.3)
3.0 D	31	8(25.8)	4(12.9)	28	8(28.6)	3(10.7)
4.0 D	32	9(28.1)	3( 9.4)	31	4(12.9)	3( 9.7)
1.0 P	30	9(30.0)	4(13.3)	29	8(27.6)	4(13.3)
2.0 P	31	7(22.6)	5(16.1)	28	7(25.0)	3(10.7)
3.0 P	32	7(21.9)	5(15.6)	30	5(16.7)	2( 6.7)
4.0 P	33	5(15.2)	3( 9.1)	28	4(14.3)	2( 7.1)

\* G : glycerol, D : DMSO, P : propanediol

**Table 2. Effects of various cryoprotectants concentration added to freezing media on *in vitro* developmental rates of rapidly frozen bovine embryos**

Freezing medium(M)	Sucrose concentration(M)					
	0.25 <sup>a</sup>			0.50 <sup>b</sup>		
	Frozen	Sur.(%)	No. of morula & blast.(%)	Frozen	Sur.(%)	No. of morula & blast.(%)
Control			32 / 8(25.0)			32 / 7(21.9)
1.0G+1.0D	30	11(36.7)	5(16.7)	31	10(32.3)	5(16.1)
1.5G+1.5D	31	12(38.7)	4(12.9)	32	10(31.3)	4(12.5)
2.0G+2.0D	30	10(33.3)	4(13.3)	31	9(29.0)	3( 9.7)
1.0D+1.0P	31	11(35.5)	5(16.1)	30	10(33.3)	4(13.3)
1.5D+1.5P	32	10(31.3)	4(12.5)	31	11(35.5)	4(12.9)
2.0D+2.0P	30	10(33.3)	4(13.3)	32	9(28.1)	3( 9.4)
1.0P+1.0G	31	11(35.5)	5(16.1)	30	9(30.0)	2( 6.7)
1.5P+1.5G	30	9(30.0)	3(10.0)	30	10(33.3)	3(10.0)
2.0P+2.0G	30	10(33.3)	4(13.3)	32	10(31.3)	4(12.5)

\*a, b : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly (p<0.05).

2.0M DMSO, 2.0M propanediol과 0.25M sucrose 농도에서 가장 높은 체외발생율을 나타냈으며, 4.0M glycerol, DMSO, propanediol 농도에서 가장 낮은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 대상동물과 동결방법에 차이가 있으나, mouse 수정란에 대해 Szell과 Shelton(1987)이 5.0M glycerol에 0.5M sucrose를 첨가한 PBS를 동결액으로 직접 LN<sub>2</sub>내에 침지하여 급속동결시 95%의 생존율과, Chupin과 Reviers(1986), Williams와 Johnson(1985) 등의 급속동결시 79.6%와 84.0%의 생존율과 Trounson 등(1987)이 3.0M DMSO와 0.50M sucrose를 이용할 때 76%의 가장 우수한 발달율을 나타냈다는 보고와 비교할 때 상이하였다. 한편, Rall과 Polge(1984), Renard 등(1983), Ko와 Threlfall(1988) 및 Massip 등(1989) 등은 내동제로서의 propanediol은 독성이 적고 불정형상태에서 안정성이 높아 높은 생존율을 얻을 수 있다고 보고하였다.

## 2) 복합내동제

소 수정란의 급속동결에 있어서 0.25M sucrose에 1.0M, 1.5M 및 2.0M 농도의 glycerol, DMSO 및 propanediol을 혼합한 복합내동제를 처리하여 급속동결 융해하였을 때 체외발생율은 Table 2와 같다.

1.0M glycerol + 1.0M DMSO, 1.5M glycerol

+ 1.5M DMSO, 2.0M glycerol + 2.0M DMSO에 0.25M과 0.50M sucrose를 각각 첨가하여 처리후 급속동결 융해하였을 때 체외발생율은 12.9~16.7%와 9.7~16.1%였으며, 1.0M DMSO + 1.0M propanediol, 1.5M DMSO + 1.5M propanediol, 2.0M DMSO + 2.0M propanediol과, 1.0M propanediol + 1.0M glycerol, 1.5M propanediol + 1.5M glycerol 및 2.0M propanediol + 2.0M glycerol에 0.25M 및 0.50M sucrose를 첨가하여 급속동결 융해하였을 때 체외발생율은 각각 12.5~16.1%와 9.4~13.3% 및 10.0~16.1%와 6.7~12.5%의 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 동결방법에 차이가 있으나, mouse 배를 이용한 Szell과 Shelton(1987)의 95%의 생존율과 Chupin과 Reviers(1986), Williams와 Johnson(1985) 등의 79.6%와 84.0%의 생존율과 Trounson 등(1987)의 76.0%에 비해서는 낮은 성적이었으나 Kasai 등(1980)의 20~39%에 비해서는 다소 높은 성적이었다. Tsunoda 등(1982) 및 Niemann(1985) 등은 명확한 분할구 상태를 나타내는 것이 생존율이 높다고 보고하였다.

## 2. Sucrose의 농도에 따른 체외발생율

소 수정란의 급속동결에 있어서 각 내동제에 첨가된 sucrose의 농도에 따른 동결 융해 후의 체외발생율은

**Table 3. Effects of sucrose concentration added to freezing media on *in vitro* developmental rates of rapidly frozen bovine embryos**

Freezing medium(M)	Sucrose dilution(M)							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	Froz. Sur.	No. of m. & b.(%)	Froz. Sur.	No. of m. & b.(%)	Froz. Sur.	No. of m. & b.(%)	Froz. Sur.	No. of m. & b.(%)
Control	30 / 8(26.7) <sup>a</sup>		30 / 8(26.7) <sup>a</sup>		30 / 7(23.3)		30 / (23.3)	
1.5 G	37 18	5(13.5) <sup>b</sup>	32 15	5(15.6) <sup>b</sup>	32 18	5(15.6)	35 19	6(17.1)
2.0 G	35 15	6(17.1) <sup>b</sup>	30 18	6(20.0)	30 17	4(13.3)	32 17	5(15.6)
1.5 D	36 17	8(22.2)	32 18	5(15.6)	26 15	3(11.5)	30 15	4(13.3)
2.0 D	41 19	7(17.1)	29 17	4(13.8)	29 17	5(19.2)	32 17	5(15.6)
1.5 P	39 17	6(15.4)	30 19	4(13.3)	32 15	4(12.5)	29 15	3(10.3)
2.0 P	35 15	5(14.3)	29 16	3(10.3)	33 13	3( 9.1)	35 16	3( 8.6)

\*a, b : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly (p<0.05).

Table 3과 같다.

1.5M, 2.0M glycerol, 1.5M, 2.0M DMSO 및 1.5M, 2.0M propanediol에 0.25M, 0.50M, 0.75M 1.00M sucrose를 첨가하여 처리한 후 급속동결 융해하였을 때 체외발생율은 13.5~22.2%, 10.3~20.0%, 9.1~19.2% 및 8.6~17.1%로서 0.25M sucrose의 농도에서 가장 높은 체외발생율을 나타냈으나 0.75M 및 1.00M sucrose에서는 비교적 낮은 체외발생율을 나타냈다.

내동제에 첨가된 sucrose의 적정농도에 대해 Mapletoft 등(1989a,b) 및 Trounson 등(1987)은 0.5M 이, Mapletoft 등(1987)은 1.0M과 1.5M이, Andrede와 Rodrigues(1987)는 1.0M이라는 보고와

는 차이가 있었으나, Szell과 Shelton(1987) 및 Wilton 등(1989)의 0.25M과는 일치하였다. Wood와 Farrant(1980) 및 Szell과 Shelton(1986a, b)은 sucrose를 내동제에 첨가할 경우 세포내의 자유수를 탈수시킴으로서 외부 세포막을 보호하여 초급속동결이 가능하다고 하였으며, Renard 등(1983) 및 Leibo 등(1984) 등은 sucrose를 내동제 제거에 이용하면 삼투압 차에 의해 순간적 제거가 가능하므로 1단계 straw 법이 가능하다고 하였다.

### 3. 동결방법에 따른 체외발생율

#### 1) 완만동결

**Table 4. Effect of cryoprotective agents and 0.25M, 0.50M sucrose in the freezing media on *in vitro* developmental rate of slowly frozen bovine embryos**

Freezing medium(M)	Slow freezing					
	0.25M Sucrose			0.50M Sucrose		
	Frozen	Survival(%)	No. of morula & blast.(%)	Frozen	Survival(%)	No. of morula & blast.(%)
Control	30 / 10(33.3)			29 / 8(27.6)		
1.0 D+S*	32	13(40.6)	7(21.9)	30	12(40.0)	6(20.0)
2.5 G+S	30	11(36.7)	6(20.0)	31	13(41.9)	6(19.4)
3.0 D+S	31	12(38.7)	6(17.1)	32	11(34.4)	6(18.8)
2.0 P+S	30	12(40.0)	6(20.0)	30	10(33.3)	6(20.0)
2.5 G+P+S	29	9(31.0)	5(14.7)	30	11(36.7)	4(13.3)

\*S : Sucrose

**Table 5. Effects of various cryoprotectants concentration added to freezing media on *in vitro* developmental rates of rapidly frozen bovine embryos**

Freezing medium(M)	Rapid freezing					
	0.25M Sucrose			0.50M Sucrose		
	Frozen	Survival(%)	No. of morula & blast.(%)	Frozen	Survival(%)	No. of morula & blast.(%)
Control			30 / 8(26.7)			31 / 8(25.8)
1.0 D+S	30	11(36.7)	4(13.3)	31	11(35.5)	4(12.9)
2.5 G+S	32	12(37.5)	5(15.6)	32	11(34.4)	3( 9.4)
3.0 D+S	30	10(33.3)	4(13.3)	30	12(40.0)	4(13.3)
2.0 P+S	31	10(32.3)	3( 9.7)	32	10(31.3)	3( 9.4)
2.5 G+P+S	30	12(40.0)	3(10.0)	29	9(31.0)	3(10.3)

Cell freezer에 의한 소 수정란의 완전동결에 있어서 0.25M 및 0.50M sucrose와 각 내동제의 평형에 따른 동결 용해후의 체외발생율은 Table 4와 같다.

완만동결시 0.25M, 0.50M sucrose에 1.0M, 3.0M DMSO, 2.5M glycerol, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol + propanediol을 각각 첨가하여 처리한 후 동결 용해하였을 때 체외발생율은 14.7~21.9%와 13.3~19.4%의 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 시험동물은 다르나, mouse의 상실배를 이용하여 완만동결시 71~92%의 생존율을 보고한 Miyamoto 등(1986)의 보고와, Williams와 Johnson(1985)의 생존율 72~80%와, Kasai 등(1982)의 60~74% 및 Niemann(1985)의 소 수정란의 완만동결시 상실배기에서 46.2%와 배반포기에서 54.2%의 생존율에 비해 낮은 결과이었다. 또한, murine과 mouse배에서 67~89%의 Krag 등(1985)과 Miyamoto 등(1986)의 결과와, Chupin과 Reviers(1986)의 rat에서 84~87%의 생존율과 비교할 때 상이한 결과이었다.

## 2) 급속동결 용해후의 생존율

소 수정란의 동결시 내동체에 평형시킨 다음 LN<sub>2</sub>에 침지하는 급속동결법에 의해 0.25M 및 0.50M sucrose와 각 내동제의 평형에 따른 급속동결 용해후의 체외발생율은 Table 5와 같다.

급속동결시 0.25M, 0.50M sucrose에 1.0M, 3.0M DMSO, 2.5M glycerol, 2.0M propanediol 및 2.5M glycerol + propanediol을 각각 첨가하여 처리한 후 급속동결 용해하였을 때 체외발생율은 9.70~

15.6%와 9.4~13.3%로서 완만동결법에 비해 낮은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 소 수정란의 급속동결에 관한 연구보고를 찾을 수 없어 정확하게 비교할 수는 없지만, Chupin과 Reviers(1996)의 mouse배를 이용한 급속동결시의 생존율 89.9%에 비해서는 낮은 결과이었다. 한편, Williams와 Johnson(1985), Krag 등(1985) 및 Frank 등(1985)은 mouse배에 대해 sucrose를 이용하여 액체질소 container 내에서 급속동결하는 방법을 제시하였으며, Wood와 Farrant(1980)와 Leibo(1984)는 동결용액에 sucrose를 첨가하면 동결하기전 탈수되기 때문에 식빙하지 않고 급속동결 하더라도 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였다.

## IV. 적 요

본 연구는 소 수정란의 급속동결에 있어서 내동제 종류와 농도, sucrose의 농도 및 동결법이 체외발생율에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 수정란의 급속동결 용해후 생존성과 체외발생율이 가장 높은 각 내동제의 적정농도는 2.0M glycerol, 2.0M DMSO, 1.0M 또는 2.0M propanediol이었다.
2. 수정란의 단일내동체에 의한 급속동결 용해후의 체외발생율은 6.7~17.4%로서 복합내동제의 처리시 체외발생율인 6.7~16.7%와 비교할 때 큰 차이가 없었다.
3. 수정란의 급속동결에 있어서 내동체에 첨가된

sucrose의 농도에 따른 체외발생율은 0.25M sucrose 농도에서 가장 높았고, 0.75M 및 1.00M에서는 비교적 낮았다.

4. 수정란을 급속동결 용해하였을때의 체외발생율은 9.70~15.6%와 9.4~13.3%로서 완만동결법에 비해 낮은 체외발생율을 나타냈다.

## V. 인용문헌

1. Andrede, T. P. and J. L. Rodrigues. 1987. Rapid freezing of mouse embryos; In glycerol-sucrose medium. *Theriogenology*, 31:225.
2. Chupin, D. and De M. M. Reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26:157-166.
3. 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.
4. Hernandez-Ledzma, J. J., C. T. Gaskins and R. W. Wright. 1988a. Freezing of mouse embryos with cryoprotectant mixture(CPM) of glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*, 29:285.
5. Hernandez-Ledzma, J. J., J. P. Selgrath and R. W. Wright. 1988b. One step sucrose dilution of a cryoprotectant mixture(CPM) of glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*, 29:259.
6. Hsu, T. T., H. Yamakawa, H. Yamanoi and J. Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse embryos frozen by vitrification method. *Japan J. Anim. Reprod.*, 32:29-32.
7. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59:51-56.
8. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1982. Survival of rat embryos after freezing. *J. Reprod. Fert.*, 66:367-370.
9. 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.
10. Krag, K. T., I. M. Koehler and R. W. Jr. Wright. 1985. A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 23:199.
11. Leibo, S. P., P. Mazur and S. C. Jackowski. 1984. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp. Cell. Res.*, 98:79-88.
12. Mapletoft, R. J., J. S. Moker and W. C. Haggle. 1987. Comparison of two methods of removing glycerol from frozen-thawed mouse embryos with sucrose. *Theriogenology*, 27:255.
13. Mapletoft, R. J., J. Moker and A. Palasz. 1989a. Effect of thawing temperature and time to sucrose dilution on survival of mouse embryos in culture. *Theriogenology*, 31:225.
14. Mapletoft, R. J., J. Moker and A. Palasz. 1989b. The effect of sucrose concentration, temperature and time on survival of fresh mouse embryos in culture. *Theriogenology*, 31:225.
15. Massip, A., P. van der Zwalm, B. Schefen and F. Ectors. 1989. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim. Reprod. Sci.*, 19:117-129.
16. 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. Zotech.*, 57:250-256.
17. Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos: Effects of a one-step dilution or 1.4M glycerol. *Theriogenology*, 23:369-379.
18. Rall, W. F. and C. Polge. 1984. Effect of warm rate on mouse embryos frozen thawed in glycerol. *J. Reprod. Fert.*, 70:185-192.

19. Renard, J. P., Y. Heyman, P. Leymonie and J. C. Plat. 1984. Sucrose dilution; A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 19:145.
  20. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15:245-248.
  21. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986a. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
  22. 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.
  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. Takeda, T., R. P. Elsdon and G. E. Jr. Seider. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 21:266(Abstract).
  25. 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.
  26. 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.
  27. Williams, T. G. and S. E. Johnson. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23:235(Abstract).
  28. Wilton, L. T., J. M. Shaw and A. O. Trounson. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 51:513-517.
  29. Wood, M. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 17:178-180.
  30. 오원진, 오건봉, 박병권, 김상근, 이규승. 1994. 돼지 수정란의 급속동결시 내동제의 종류와 농도, 평형시간 및 용해온도에 따른 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 18(1):15-23.
  31. 김상근, 이만휘. 1991. 소 수정란의 초급속 동결 용해후의 생존성에 관한 연구. *한국가축 번식학회지*, 16(2):141-148.
- (접수일자 : 1997. 3. 15 / 채택일자 : 1997. 4. 28)