

소 體外受精卵의 超急速凍結에 관한 研究 II. 소 體外受精卵의 超急速凍結 融解後의 生存性에 관한 研究

金相根·李曉徽

忠南大學校 獸醫科大學

Studies of the Ultrarapid Freezing of *In Vitro* Fertilized Bovine Embryos I. Studies on the Survival Rates after Rapid Frozen-Thawing of *In Vitro* Fertilized Bovine Embryos

Kim, S.K. and M.H. Lee

College of Vet. Med., Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out in order to investigate the effects of cryoprotective concentration and equilibration time on survival rate of ultrarapidly frozen *in vitro* fertilized bovine embryos. *In vitro* fertilized bovine embryos, following dehydration by cryoprotective agents and sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 38°C water. Survival rate was defined by development rate to the morula and blastocyst stage after *in vitro* culture of by FDA test.

The results are summarized as follows :

1. The survival rates of *in vitro* fertilized bovine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 0.25M sucrose added 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M, 4.0M glycerol were 75.0%, 72.0%, 67.6%, 44.8% and 18.3% respectively.
2. The survival rates of *in vitro* fertilized bovine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 0.25M sucrose added 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M, 4.0M DMSO were 64.0%, 66.7%, 70.8%, 52.7% and 18.6, respectively.
3. The survival rates of *in vitro* fertilized bovine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 0.25M sucrose added 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M, 4.0M propanediol were 68.4%, 64.9%, 63.2%, 62.2% and 34.7%, respectively.
4. The survival rates of *in vitro* fertilized bovine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 2.50M glycerol added 0.1M, 0.25M, 0.5M, 0.75M, sucrose were 60.5%, 72.2%, 70.1% and 54.9%, respectively. The survival rate of *in vitro* fertilized embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 2.5M glycerol added 0.25M sucrose were higher than concentration of 0.10M, 0.50M and 0.75M sucrose.
5. The equilibration time on the survival rate of *in vitro* fertilized bovine embryos was attained after short period of time(2.5~5min.) in the freezing medium added 0.25M sucrose and 3.0M DMSO higher than long period of time(1~20 min.).

I. 緒 論

哺乳動物 受精卵의 凍結保存에 관한 研究는 Whittingham 등(1972)에 의해 생쥐 受精卵에서 성공한 후 토끼(Bank 와 Maurer, 1974), 羊(Willadsen 등, 1976), 소(Bilton 과 Moor, 1976; Niemann, 1985) 등의 보고가 있다.

受精卵의 凍結은 주로 실험동물을 대상으로 耐凍劑를 사용하여 동결시 세포내의 脫水로부터 水形成을 감소시킬 수 있는 緩慢凍結法으로 受精卵를 凍結 保存하였으나, 최근에는 고농도의 耐凍劑를 이용하여 동결된 受精卵내의 수분을 탈수시킨 상태에서 직접 液體窒素中에 침지하는 간편한 超急速凍結法에 관한 연구가 이루어지고 있다(Takeda 등, 1984; Williams 와 Johnson, 1985; Krag 등, 1985; Szell 과 Shelton, 1987; Leibo 와 Mazur, 1978; Wilmut, 1972).

受精卵의 凍結에 이용되는 耐凍劑에는 DMSO, glycerol, ethyleneglycol, propanediol 및 sucrose 등이 이용되고 있는데, 최근에는 glycerol을 동결용액으로 이용할 때 卵子내에 침투되지 않고 외부 세포막을 보호하는 sucrose를 첨가하여 受精卵의 높은 生存率이 보고되었으며(Krag 등, 1985; Frank 등, 1985), 또한 vitrification solution을 제조하여 액체질소 container의 증기로 직접동결하거나, 동결용액에 sucrose를 첨가하면 동결하기 전 脫水되기 때문에 植水하지 않고 急速凍結하더라도 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였다(Krag 등, 1985; Frank 등, 1985; Rall 과 Fahy, 1985; Hus 등, 1986). 그러나 超急速凍結法은 緩慢凍結法에 비해 간편하고 실용적이므로 凍結胚의 이용보급에 공헌할 것으로 기대되나, 소 受精卵를 이용한 超急速凍結 시험은 거의 찾아 볼 수 없는 실정이다.

이에, 本 研究는 소 受精卵의 超急速凍結에 있어서 적합한 최적의 조건을 확립할 목적으로 초급속동결시 耐凍劑의 種類와 濃度 및 平衡時間에 따른 동결 融해후 生存性에 미치는 영향을 究明하고자 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 卵胞卵의 回收와 培養

屠殺韓牛의 卵巢를 적출하여, 100IU/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 生理食鹽水에 浸漬하여 실험실로 옮겨 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40 \times)하에서 卵胞卵을 회수하여 배양액으로 3회 洗滌후 10%(v/v)의 FCS와 1 μ g/ml의 FSH(Sigma, USA), 2IU/ml의 HCG, 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 添加된 TCM-199(Whittaker, M.A., Bioproducts Co., USA) 培養液으로 배양하였으며, 사용전 0.2 μ m/millipore filter로 濾過 滅菌후 사용하였다.

2. 方 法

1) 卵胞卵의 體外成熟 및 受精

卵胞卵의 體外成熟은 배양액 50 μ l 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간 전에 CO₂ 培養器내(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 5~6시간 平衡시킨 후 5개의 卵胞卵을 주입하여 24시간 배양하였으며, 體外受精은 성숙배양한 卵胞卵을 수정용 배양액으로 3회 세척한 후, 45 μ l의 受精用 培養液 小滴에 5개의 卵胞卵을 주입한 후, 凍結精液을 38°C의 溫水에 약 1분간 침지하여 融解한 다음, BO액(Brackett 와 Oliphant, 1975) 1ml에 용해시킨 精液 0.2ml를 시험관내에서 혼합하여 CO₂ 培養器에서 swim-up 처리후, 上層液을 수정용 배양액으로 500 rpm, 10분간 2회 원심분리하여 세척하고 精子塊를 同量의 100 μ g/ml의 heparin(Sigma, USA)과 회석하여 15분간 CO₂ 培養器에서 受精能獲得을 유지시킨 精子浮游液 2 μ l(1.5 \times 10⁶/ml)로 媒精하여 수정을 判定된 胚를 이용하였다(Shea 등, 1976; Ball 등, 1983).

2) 超急速凍結

수정으로 判定된 소 體外受精卵의 超急速凍結은 glycerol, DMSO 및 propanediol 등의 耐凍劑를 각각 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M, 4.0+0.25M sucrose + 20% FCS + PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 각각 5분간 平衡시킨 후 1cm 높이의 부피위에 straw를 놓아 5분간 豫冷시킨 다음 液體窒素에 곧바로 浸漬함으로써 超急速凍結을 실시하였으며, 내동제의 平衡시간에 따른 생존율 시험은 3.0M DMSO + 0.25 M sucrose 동결액으로 각각 2.5, 5.0, 10, 20분간

평형시킨 후 동결하였다.

3) 生存性 検査

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 방치 한 후 신선한 PBS로 3회 세척한 다음 TCM-199 培養液으로 배양하면서 발생상태를 관찰하거나, fluores cence diacetate (FDA) 1mg을 acetone 1ml에 용 해한 다음 PBS액에 600,000:1의 비율로 희석한(pH 7.0~7.4)액에 受精卵를 넣고 常溫에서 3~5분간 배양 한 후 FDA가 함유되어 있지 않은 PBS액에 옮겨 位 相差顯微鏡하에서(×200) 生死與否를 判定하였다 (Schilling 등, 1982).

III. 結果 및 考察

1. Glycerol의 濃度에 따른 體外受精卵의 超急速凍結 融解後의 生存率

소 體外受精卵의 초급속동결에 있어서 동결액에 첨가 된 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 후 의 生存率은 0.25M sucrose에 glycerol 2.0M, 2.5 M, 3.0M, 3.5M, 4.0M의 농도를 첨가한 경우 凍結 融解後의 體外受精卵의 生存率은 각각 75.0%, 72. 0%, 67.%, 44.8%로서 2.0M glycerol 농도에서 가 장 높은 생존율을 나타냈으며, 4.0M glycerol에서 가 장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 對象動物과 凍結方法에 차이가 있 으나, mouse 受精卵에 대해 Szell과 Shelton(1987)이 5.0M glycerol에 0.5M sucrose를 첨가한 PBS를 동결액으로 직접 液體室素내에 침지하는 急速凍結시 95%의 생존율과, Chupin과 Riviers(1986), Wil liams와 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 침투되 지 않으며, 外部細胞膜을 보호하는 sucrose를 첨가하 여 동결용해시 높은 生存率이 보고되었다(Kasai 등, 1980; Miyamoto 등, 1986).

2. DMSO의 濃度에 따른 體外受精卵의 超急速凍結 融解後의 生存率

소 體外受精卵의 초급속동결에 있어서 동결액에 첨가 된 DMSO의 농도에 따른 超急速凍結 融解後의 生存 率은 Table 2와 같다.

0.25M sucrose에 DMSO 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M, 4.0M의 농도에 따른 超急速凍結에 融解後의 體外受精卵의 生存率은 각각 64.0%, 66.7%, 70. 8%, 52.7 및 18.6%로서 3.0M DMSO 농도에서 가 장 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 Trounson 등(1987)이 3.0M DMSO와 0.50M sucrose를 이용할 때 76%의 가장 우수한 발달율을 나타냈다는 보고와 비교할 때 다소 떨어지나, 0.25M sucrose에서는 농도별 차이가 없었다 고 한 보고와는 상이한 결과이었다.

Table 1. Effect of glycerol concentration in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen bovine embryos

Concentration of glycerol	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed(to M and B)**
2.0M*	68	62(91.2)	51(75.0)
2.5M	72	68(95.8)	54(72.0)
3.0M	71	66(93.0)	48(67.6)
3.5M	67	62(92.5)	30(44.8)
4.0M	71	65(91.5)	13(18.3)

* : 0.25M sucrose

** : M ; morula, B ; blastocyst

Table 2. Effect of glycerol concentration in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen bovine embryos

Concentration of DMSO	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed (to M and B)
2.0M*	75	71(94.7)	48(64.0)
2.5M	78	75(96.2)	52(66.7)
3.0M	72	69(95.8)	51(70.8)
3.5M	74	70(97.2)	39(52.7)
4.0M	70	66(94.3)	13(18.6)

* : 0.25M sucrose

3. Propanediol의 농도에 따른 體外受精卵의 超凍結融解後의 生存率

소 體外受精卵의 초급속동결에 있어서 동결액에 첨가된 propanediol 농도에 따른 超急速凍結 融解後의 生存率은 Table 3과 같다.

0.25M sucrose에 propanediol 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M, 4.0M의 농도에 따른 체외수정란의 超急速凍結 融解後의 生存率은 각각 68.4%, 64.9%, 63.2%, 62.2% 및 34.7%로서 2.0M propanediol 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈으며, 4.0M propanediol에서 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 mouse 수정란을 25% glycerol과 25% propanediol의 혼합동결액에 sucrose를 첨가하여 급속동결 융해시 90%이상의 생존율을 나타냈다는 석 등(1990)의 보고에 비해 상당한 차이가 있었다. 한편, Rall과 Polge(1984), Renard 등(1984), Ko와 Threlfall(1988) 및 Massip 등(1989) 등은 耐凍劑로서의 propanediol은 毒性이 적고 否定形 상태에서 안정성이 높아 높은 생존율을 얻을 수 있다고 보고하였

다.

4. Sucrose의 농도에 體外受精卵의 急速凍結 融解後의 生存率

소 體外受精卵의 초급속동결에 있어서 동결액에 첨가된 sucrose의 농도에 따른 超急速凍結 融解後의 生存率은 Table 4와 같다.

2.5M glycerol에 0.10M, 0.25M, 0.50M, 0.75M sucrose 농도에 첨가에 따른 超急速凍結 融解後의 體外受精卵의 生存率은 각각 60.5%, 72.2%, 70.1% 및 54.9%로서 0.25M sucrose 농도에서 가장 높은 생존율을 나타냈으며, 0.75M sucrose에서 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 대상동물은 다르지만, Williams와 Johnson(1985)의 동결액과 제거액에 sucrose를 첨가했을 때 70~80%의 생존율과 Chupin과 Reviers(1986)의 57.5~96.4%의 생존율과는 차이가 있었다. 한편, sucrose를 동결전에 첨가하면 동결전 세포내 自由水の 脫水로 急速凍結이 가능하며, 耐凍劑 제거에 이

Table 3. Effect of propanediol concentration in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen bovine embryos

Concentration of propanediol	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed (to M and B)**
2.0M*	76	76(97.4)	52(68.4)
2.5M	74	71(95.9)	48(64.9)
3.0M	68	65(95.6)	43(63.2)
3.5M	74	71(95.9)	47(62.2)
4.0M	75	72(96.0)	26(34.7)

* : 0.25M sucrose

Table 4. Effect of sucrose concentration in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen bovine embryos

Concentration of sucrose	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered (%)	No. of embryos developed (to M and B)
0.10M*	76	74 (97.4)	46 (60.5)
0.25M	72	69 (95.8)	52 (72.2)
0.50M	67	63 (94.0)	47 (70.1)
0.75M	71	68 (95.8)	31 (54.9)

* : 0.25M glycerol

용하면 삼투압의 차이에 의해 순간적으로 제거하므로 one step straw 법에 의한 직접 移植이 가능하다고 하였다 (Wood와 Farrant, 1980; Leibo, 1985; Renard 등, 1983; Merry 등, 1983; Kasai 등, 1980;鈴木 등, 1984)

5. 耐凍劑의 平衡時間에 다른 體外受精卵의 急速凍結 融解後의 生存率

소 體外受精卵의 急速凍結에 있어서 耐凍劑의 平衡時間에 따른 동결 용해후의 生存率은 Table 5와 같다.

體外受精卵의 초급속동결에 있어서 3.0M DMSO + 0.25M sucrose 동결액의 평형시간을 2.5분, 5분, 10분, 20분으로 했을 때 동결 용해후의 生存率은 각각 72.6%, 70.7%, 68.4%, 34.6%로서 2.5분의 평형 시간에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 2.0M DMSO와 0.25M sucrose를 이용하였을 때 2분 이하의 평형시간이 가장 우수하다고 한 Trounson 등(1987)의 보고와 3.5M DMSO와 0.5M sucrose를 이용하여 2세포기 수정란을 two-step 동결시 평형시간이 5분과 10분간에는 차이가 없었으나 20분에서는 현저하게 저조하였다고 보고한

Boon 등(1988)의 결과와 거의 일치하였다.

IV. 摘要

본 연구는 소 體外受精卵의 超急速凍結法을 확립할 목적으로 각종 耐凍劑와 +0.25M sucrose +20% FCS + PBS의 동결액으로 평형시킨 후 液體窒素에 浸漬하는 超急速凍結法에 의해 동결 용해했을 때 각 耐凍劑의 종류와 농도 및 내동제의 平衡時間에 따른 생존율을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 소 體外受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.25M sucrose에 glycerol 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M, 4.0M 농도의 첨가에 따른 凍結 融解후의 生存率은 각각 75.0%, 72.0%, 67.6%, 44.8%, 및 18.3%를 나타냈다.
2. 소 體外受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.25M sucrose에 DMSO 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M, 4.0M 농도의 첨가에 따른 凍結 融解후의 生存率은 각각 64.0%, 66.7%, 70.8%, 52.7% 및 18.6%를 나타냈다.

Table 5. Effect of equilibration time in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen bovine embryos

Equilibration time (min.)	No. of embryos frozen*	No. of embryos recovered	No. of embryos developed (to M and B)
2.5	84	80 (95.2)	61 (72.6)
5.0	82	78 (95.1)	58 (70.7)
10.0	79	76 (96.1)	54 (68.4)
20.0	81	77 (95.1)	28 (34.6)

* : 3.0M DMSO + 0.25M sucrose

3. 소 體外受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.25M sucrose 에 propanediol 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M, 4.0M 농도의 첨가에 따른 凍結 融解후의 生存率은 각각 68.4%, 64.9%, 63.2% 및 34.7%를 나타냈다.
4. 소 體外受精卵의 超急速凍結에 있어서 2.5M glycerol 에 0.10M, 0.25M, 0.50M, 0.75M 농도의 sucrose 의 첨가에 따른 凍結 融解후의 生存率은 각각 60.5%, 72.2%, 70.1%, 54.9%로서 0.25M sucrose 에서 가장 높은 생존율을 나타냈으며, 0.75M sucrose 에서 가장 낮은 생존율을 나타냈다.
5. 소 體外受精卵의 超急速凍結에 있어서 3.0M DMSO + 0.25M sucrose 동결액의 平衡時間에 따른 동결 融解후의 生存율은 平衡時間을 2.5분, 5분, 10분, 20분으로 했을 때 각각 72.6%, 70.7%, 68.4% 및 34.6%로서 2.5분의 平衡시간에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.

V. 引用文獻

1. 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.
2. Bank, H. and R.R. Maurer. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. Expl. Cell. Res., 89 : 188-196.
3. 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°C . Theriogenology, 6 : 635 (Abstract).
4. Boon, W.R., C.A. Brown, J.M. Vasquez and S.S. Shapiro. 1988. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programable freezer. Fertil. Steril., 50 : 348-354.
5. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12 : 260-274.
6. Chupin, D. and M.M. De Reviere. 1986. Quick freezing of rat embryos. Theriogenology, 26 : 157-166.
7. 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.
8. 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.
9. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert. 59, 51-56.
10. 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.
11. Krag, K.T., I.M. Koehler and R.W. Wright Jr. 1985. A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. Theriogenology, 23 : 199.
12. Leibo, S.P. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, 23 : 201.
13. Leibo, S.P. and P. Mazur. 1978. Preservation of mammalian embryos during freezing and thawing. Exptl. Cell. Res., 89 : 79-88.
14. Massip, A., P. Van der Zwalm, B. Scheffen 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.
15. 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. Ther-

- iogenology, 20 : 325-332.
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. Zootech., 57 : 250-256.
 17. Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos; Effects of a one-step dilution of 1.4M glycerol. Theriogenology, 23 : 369-379.
 18. Rall, W.F. and G.M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature, 313 : 573-575.
 19. Rall, W.F. and C. Polge. 1984. Effect of warm rate on mouse embryos frozen thawed in glycerol. J. Reprod. Fert., 70 : 185-192.
 20. 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.
 21. Renard, J.P., B.X. Ngyyen and V. Garnier. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J. Reprod. Fert., 71 : 573-580.
 22. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15 : 245-248.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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)
 26. 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.
 27. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269°C . Science, 178 : 411-414.
 28. 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.
 29. Williams, T.G. and S.E. Johnson. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. Theriogenology, 23 : 235(abstr.).
 30. Willmut, 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.
 31. Wood, M. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. Cryobiology, 17 : 178-180.
 32. 鈴木達行, 鈴木軸彦, 下平乙夫, 藤山雅照. 1984. ウシ受精卵の自動灌流器具について. 家畜繁殖誌, 30 : 194-197.
 33. 석호봉, 이광원, 손동수. 1990. 비침투성 동결 보호제가 급속동결한 마우스 수정란의 생존성에 미치는 영향. 대한수의학회지, 30(4) : 28.