韓國家畜繁殖學會誌 16(2) : 117~123(1992)
Korean J. Animal Reprod.

돼지 受精卵의 緩慢 및 超急速 凍結 融解後의 生存性에 관한 硏究

李鳳求·金相根*·李揆丞
忠南大學校 農科大學

Studies on the Survival Rates after Slow and Ultrarapid Frozen-Thawing of Porcine Embryos

Lee, B.K., S.K. Kim and K.S. Lee
College of Agriculure, Chungnam National Univ.

SUMMARY

This Study was carried out to investigate the effects of concentration and equilibration time of cryoprotective agents on survival rate of slowly and ultrarapidly frozen porcine embryos. The porcine embryos following dehydration by cryoprotective agents and 0.25M sucrose were slowly freezed(from 20℃ to −7℃/−1℃/min., from −7℃ to −35℃/−0.2℃/min., from −35℃ to −38℃/−0.3℃/min.) by Cell Freezer and directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 38℃ water bath. Survival rate was defined as development rate to the morula and blastocyst stage after *in vitro* culture or by FDA test.

The results are summarized as follows:

1. The survival rates of porcine embryos after slow frozen-thawing in the freezing medium of 0.25M sucrose added 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol or 2.0M glycerol+2.0M propanediol was 80.6, 84.7, 75.0 or 78.8%, respectively.
2. The survival rates of porcine embryos after slow frozen-thawing in the freezing medium of 0.50M sucrose added 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol or 2.0M glycerol+2.0M propanediol was 80.9, 82.4, 73.1 or 77.1%, respectively.
3. The survival rates of porcine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 0.25M sucrose added 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol ro 2.0M glycerol+2.0 M propanediol was 65.3, 68.6, 63.2 or 59.9%, respectively.
4. The survival rates of porcine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium of 0.50M sucrose added 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0 propanediol ro 2.0M glycerol+2.0M propanediol was 67.5, 62.9, 56.9, or 62.8%, respectively.
5. The higer survival rate of porcine embryos was attained at the short period of equilibration time(5min.) in the freezing medium added 0.25M sucrose and 3.0 DMSO compared to those of 10 or 20min. equilibration time in the same condition.

Ⅰ. 緖 論

家畜의 繁殖效率 증진과 優秀畜의 증식을 위해서는 分娩間隔의 短縮, 雙胎分娩, 體外受精, 受精卵의 凍結 및 遺傳子, 核移植 등의 새로운 遺傳工學的 技術開發이 절실히 요청되며 이를 장기간 보존하면서 필요에 따라

*忠南大學校 獸醫科大學(College of Veterinary Medicine, Chungnam National Univ.)

移植에 이용할 수 있는 受精卵의 凍結技術의 확립이 急先務라 하겠다.

受精卵의 凍結은 주로 실험동물을 대상으로 동결시 耐凍劑를 이용하여 세포내의 脫水로부터 氷形成을 감소시킬 수 있는 緩慢凍結法으로 受精卵을 凍結 保存하였으나(Miyamoto 등, 1986 ; Mazur, 1977 ; Leibo 와 Mazur, 1972 ; Wilmut, 1972), 최근에는 glycerol 및 DMSO(dimethyl sulfoxide) 등의 내동제에 의해 受精卵내에 수분을 탈수시킨 상태에서 超急速으로 동결하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Nakagata, 1989 ; Szell 과 Shelton, 1986a, b ; Merry 등, 1983 ; Whittingham 등, 1972).

돼지 受精卵의 超急速 凍結에 관한 연구는 거의 찾아볼 수 없으나, 정 등(1990)은 호르몬 처리 수정란의 緩慢凍結 융해시 54.2%의 생존율과 내동제로서 DMSO 가 glycerol 보다 융해후 생존율 및 생존시간은 24~72시간 이내로서 우수하였다고 하였으며, Nagashima 등(1989)은 돼지 수정란을 緩慢凍結 융해시 48.5~83.3%의 생존율을 보고하였다. 그러나 급속동결법은 冷却, 凍結溫度의 조절, 단계적인 凍結保護劑의 첨가 및 제거를 필요로 하는 緩慢凍結法에 비해 간편하고 실용적이므로 凍結胚의 이용 보급에 공헌할 것으로 기대되나, 생존율이 극히 저조하여 돼지 受精卵의 急速凍結에 관한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

이에, 本 硏究는 돼지 受精卵의 超急速 凍結 融解후 生存性에 미치는 영향을 究明코져 각종 내동제와 sucrose에 의해 평형시킨 후 cell freezer에 의한 緩慢凍結法과 동결액에 평형시킨 다음 液體窒素에 浸漬하는 超急速凍結法에 의해 각각 동결 융해후 각 耐凍劑에 따른 생존율을 비교 검토하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 卵胞卵의 回收

正常 生殖器를 가진 屠殺直後의 雌豚으로부터 卵巢를 적출하여, 100IU/ml 의 penicillin G와, 100μg/ml 의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 生理食鹽水에 浸漬하여 1~2시간 이내에 실험실로 옮긴 후 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 다음 實體顯微鏡(20~40×)하에서 卵胞卵을 회수하였다.

2. 方 法

1) 卵胞卵의 培養

회수한 卵胞卵을 배양액으로 3回 洗滌후 10%(v/v)의 FCS와 1μg/ml의 FSH(Sigma, USA), 2IU/ml의 HCG, 1μg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100μg/ml의 streptomycin sulfate가 添加된 TCM-199(Whittaker, M.A., Bioproducts Co., USA) 培養液으로 배양하였으며, 사용전 0.2μm millipore filter로 濾過하여 滅菌후 사용하였다.

2) 卵胞卵의 體外成熟 및 受精

卵胞卵의 體外成熟은 배양액 50μl 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간전에 CO_2 培養器내(5% CO_2, 95% air, 38.5℃)에서 5~6시간 平衡시킨 후 5개의 卵胞卵을 주입하여 48시간 배양하여 성숙시켰다.

體外受精은 성숙배양한 卵胞卵을 배양액으로 3회 세척한 후, 45μl의 培養液 小滴에 5개의 卵胞卵과, 雄豚의 精巢上體를 細切하여 精子浮遊液 0.01ml와 BO액 2ml을 잘 혼합하여 38℃의 培養器에서 1시간 swim up 처리를 한 다음 약 0.5ml의 上層液을 2,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 精子 pellet를 동량의 heparin 용액(100μg/min)과 함께 혼합하여 CO_2 培養器에서 受精能獲得을 유기시킨 精子浮遊液 2μl(1.5×10^6 spermatozoa/ml)을 주입하여 媒精시킨 후 수정으로 판정된 胚를 이용하였다(Ball 등, 1983 ; Shea 등, 1976).

3) 緩慢 凍結

돼지 受精卵의 緩慢凍結은 自動細胞凍結器(R-204, Cell Freezer, Planer Products, England)의 sensor에 내동제와 평형시킨 후 受精卵을 주입한 straw를 끼워 동결하면서 autorecorder로 확인하였다. 凍結溫度는 실온에서 −7℃까지는 −1℃/min., −7℃에서 −35℃까지는 −0.2℃/min., −35℃에서 −38℃까지는 −0.3℃/min으로 동결후 LN_2 container에 침지하였다.

4) 超急速 凍結

돼지 受精卵의 超急速 凍結은, 2.0M glycerol, 3.0

M DMSO 및 propanediol+0.25M 및 0.50M sucrose+20% FCS+PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 각각 5분간 平衡시킨 후 1cm 높이의 부표위에 straw를 놓아 5분간 豫冷시킨 다음 液體窒素에 곧바로 浸漬함으로써 超急速凍結을 실시하였다.

돼지 受精卵의 완만 및 초급속동결에 있어서 내동세의 평형시간에 따른 生存率시험은 3.0M DMSO+0.25M sucrose+20% FCS+PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 각각 5분, 10분, 20분간 평형시킨 후 각각 동결하였다.

5) 生存性 檢査

凍結후 3~6개월간 보존된 受精卵의 融解는 straw를 실온에 30초간 방치한 다음 38℃의 溫水에서 융해후 耐凍劑를 제거하기 위하여 거꾸로 흔들어 10분간 방치한 후 신선한 PBS로 3회 세척한 다음 TCM-199 培養液으로 배양하면서 발생상태를 관찰하거나, fluorescence diacetate(FDA) 1mg을 acetone 1ml에 용해한 다음 PBS액에 600,000 : 1의 비율로 희석한(pH 7.0~7.4) 액에 受精卵을 넣고 常溫에서 3~5분간 배양한 후 FDA가 함유되어 있지 않은 PBS액에 옮겨 位相差顯微鏡하에서(×200) 生死與否를 판정하였다(Schilling 등, 1982).

III. 結果 및 考察

1. 돼지 受精卵의 緩慢凍結 融解後의 生存率

1) 0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 緩慢凍結 融解後의 生存率

Cell freezer에 의한 돼지 受精卵의 緩慢凍結에 있어서 0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 융해후의 生存率은 Table 1과 같다.

각 耐凍劑에 대한 緩慢凍結 融解후의 生存率은 0.25 M sucrose에 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0 M propanediol 및 2.0M glycerol+2.0M propanediol을 첨가한 경우 각각 80.6, 84.7, 75.0 및 78.8%의 생존율을 보여 3.0M DMSO+0.25M sucrose에서 가장 높은 생존율을 나타냈으나, 2.0M propanediol+0.25M sucrose에서는 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 시험동물은 다르나 mouse의 桑實胚를 이용하여 완만동결시 Miyamoto 등(1986)의 71~92%, Williams와 Johnson(1985)의 72~80%의 생존율에 비해 낮았으나, mouse에서 Kasai 등(1982)의 60~74%, 돼지의 완만동결에서 정 등(1990)의 54.2%와 Niemann(1985)의 소 수정란의 완만동결시 桑實胚期에서 46.2%와 胚盤胞期에서 54.2%의 생존율에 비해서는 높은 결과였다.

2) 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 緩慢凍結 融解後의 生存率

돼지 受精卵의 緩慢凍結에 있어서 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 평형에 따른 凍結 融解후의 生存率은 Table 2에서 보는 바와 같이, 각 耐凍劑에 대한 緩慢凍結 融解후의 생존율은 0.50M sucrose에 2.0M glycerol. 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.0 M glycerol+2.0M propanediol의 경우 각각 80.9, 82.4, 73.1 및 77.1%의 생존율을 보여, 3.0M

Table 1. Effect of cryoprotective agents and 0.25M sucrose in the freezing medium on the survival rate of slowly frozen porcine embryos

Cryoprotective agents	No. of embryos freezed	No. of embryos recovered(%)*	No. of embryos survived(%)**
2.0M G+S	67	65(97.0)	54(80.6)
3.0M DMSO+S	72	70(97.2)	61(84.7)
2.0M P+S	64	62(62.9)	48(75.0)
2.0M G+2.0M P+S	66	64(97.0)	52(78.8)

S : sucrose, G : Glycerol, P : Propanediol

* : No. of embryos recovered/No. of embryos freezed

** : No. of morula or blastocyst/No. of embryos freezed

Table 2. Effect of cryoprotective agents and 0.50M sucrose in the freezing medium on the survival rate of slowly frozen porcine embryos

Cryoprotective agents	No. of embryos freezed	No. of embryos recovered(%)*	No. of embryos survived(%)**
2.0M G+S	68	66(97.1)	55(80.9)
3.0M DMSO+S	74	71(95.9)	61(82.4)
2.0M P+S	74	75(96.2)	57(73.1)
2.0M G+2.0M P+S	70	66(94.3)	54(77.1)

* : No. of embryos recovered/No. of embryos freezed

** : No of morula or blastocyst/No. of embryos freezed

DMSO+0.50M sucrose에서 가장 높은 생존율을 나타냈으나, 2.0M glycerol+2.0M propanediol+0.5 M sucrose에서는 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, murine과 mouse胚에서 0.50M sucrose를 첨가한 동결액으로 동결융해시 Krag 등(1985) 및 Miyamoto 등(1986)의 67~89%, Chupin과 Reviers(1986)의 rat胚에서 84~87%, Trounson 등(1987)의 mouse胚에서 76.0%의 생존율에 비해서는 낮은 결과이었다. 한편, Trounson 등(1987)은 3.0M DMSO+0.50M sucrose에서 가장 우수한 발달율을 나타냈다고 보고하였는데 이는 본 시험결과와도 일치되는 결과였다.

2. 돼지 受精卵의 超急速凍結 融解後의 生存率

1) 0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 超急速凍結 融解후의 生存率

0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 평형에 따른 돼지 受精卵의 超急速凍結 融解후의 生存率은 Table 3에서 보는 바와 같이, 0.25M sucrose에 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.0M glycerol+2.0M propanediol을 첨가한 경우 각각 65.3, 68.6, 63.2 및 59.5%의 생존율을 보여 3.0M DMSO+0.25 sucrose에서 가장 높은 생존율을 나타냈으나, 2.0M glycerol+2.0M propanediol+0.25 M sucrose에서 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 돼지 受精卵의 超急速 凍結에 관한 연구보고를 찾을 수 없어 정확하게 비교할 수 없지만, 강 등(1990)의 mouse 胚를 이용한 急速凍結시의 생존율 89.9%에 비해서는 낮은 결과이었다. 한편, Nguyen 등(1984)은 동결용액에 sucrose를 첨가하면 동결하기 전 脫水되기 때문에 植氷하지 않고 急速凍結하더라도 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였는데, 이는 본시험 결과에서도 거의 일치되는 결과였다.

2) 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 超急速凍結 融解後의 生存率

돼지 受精卵의 凍結에 있어서 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 평형에 따른 超急速凍結 融解후의 生存率은

Table 3. Effect of cryoprotective agents and 0.25M sucrose in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos

Cryoprotective agents	No. of embryos freezed	No. of embryos recovered(%)*	No. of embryos survived(%)**
2.0M G+S	72	68(94.4)	47(65.3)
3.0M DMSO+S	70	67(95.7)	48(68.6)
2.0M P+S	68	63(92.6)	43(63.2)
2.0M G ; 2.0M P+S	74	69(93.2)	44(59.5)

* : No. of embryos recovered/No. of embryos freezed

** : No. of morula or blastocyst/No. of embryos freezed

Table 4. Effect of cryoprotective agents and 0.50M sucrose in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos

Cryoprotective agents	No. of embryos freezed	No. of embryos recovered(%)*	No. of embryos survived(%)**
2.0M G+S	77	75(97.4)	52(67.5)
3.0M DMSO+S	62	58(93.5)	39(62.9)
2.0M P+S	61	61(93.8)	37(56.9)
2.0M G ; 2.0M P+S	70	67(95.7)	44(62.8)

* : No. of embryos recovered/No. of embryos freezed

** : No. of morula or blastocyst/No. of embryos freezed

Table 4에서 보는 바와 같이, 각 耐凍劑의 平衡에 따른 超急速 凍結 融解후의 생존율은 0.50M sucrose에 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.0M glycerol+2.0M propanediol을 첨가한 경우 각각 67.5, 62.9, 56.9 및 62.8%의 생존율을 보여 2.0M glycerol+0.5M sucrose에서 가장 높은 생존율을 나타냈으나 2.0M propanediol+0.50M sucrose에서는 가장 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, 試驗動物 및 凍結方法에 차이가 있으나 Szell과 Shelton(1987)의 mouse胚의 緩慢동결시 90.0% 이상의 생존율에 비해 저조한 성적이나, Kasai 등(1982)의 rat胚의 緩慢동결시 20~39%의 생존율에 비해서는 높은 성적이었다. 한편, Tsunoda 등(1982), Rall과 Polge(1984) 및 Niemann(1985)은 가급적 명확한 分割球 상태를 나타내는 受精卵은 동결후 生存率과 受胎率이 높다고 하였다.

3. 耐凍劑의 平衡時間에 따른 緩慢 및 超急速凍結 融解후의 生存率

돼지 受精卵의 緩慢 및 超急速凍結에 있어서 耐凍劑의 平衡時間에 따른 동결 융해후의 生存率은 Table 5와 같다.

受精卵의 緩慢 및 超急速凍結에 있어서 3.0M DMSO+0.25M sucrose+20% FCS+PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 5, 10, 20분간 평형시킨 후 동결했을 때 동결 융해후의 生存率은 각각 82.6, 81.5, 59.7% 및 67.1, 65.7, 27.1%로서 5분의 평형시간에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 3.5M DMSO와 0.5M sucrose를 이용하여 2세포기 mouse胚를 two-step 동결시 평형

Table 5. Effect of equilibration time in the freezing medium added 3.0M DMSO+0.25M sucrose on the survival rate of slowly and ultrarapidly frozen porcine embryos

Equilibration Time(min)	No. of embryos freezed	No. of embryos recovered(%)*	No. of embryos survived(%)**
Slow-freezing			
5	69	65(94.2)	57(82.6)
10	65	61(93.4)	53(81.5)
20	62	57(93.4)	37(59.7)
Ultrarapid-freezing			
5	82	77(93.9)	55(67.1)
10	67	61(91.0)	44(65.7)
20	70	64(91.4)	19(27.1)

* : No. of embryos recovered/No. of embryos freezed

** : No. of morula or blastocyst/No. of embryos freezed

시간이 5분과 10분간에는 차이가 없었으나 20분에서는 현저하게 저조하였다고 보고한 Boon 등(1988)의 결과와 거의 일치하였다.

IV. 結 論

本 硏究는 돼지 受精卵의 超急速 凍結 融解후 生存性에 미치는 영향을 究明하고져 각종 내동제와 sucrose에 의해 평형시킨 후 cell freezer에 위해 緩慢凍結法과 동결액에 평형시킨 다음 液體窒素에 浸漬하는 超急速凍結法에 의해 동결융해 후 각 耐凍劑에 따른 생존율을 비교 검토하였는바 그 결과는 다음과 같다.

1. 돼지 受精卵의 緩慢凍結에 있어서 0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 융해후의 生存率은 0.25M sucrose에 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.0M glycerol+2.0 propanediol의 경우 각각 80.6, 84.7, 75.0 및 78.8%의 생존율을 나타냈다.
2. 돼지 受精卵의 緩慢凍結에 있어서 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 융해 후의 生存率은 0.50M sucrose에 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.0M glycerol+2.0M propanediol의 경우 각각 80.9, 82.4, 73.1 및 77.1%의 생존율을 나타냈다.
3. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.25M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결 융해 후의 生存率은 0.25M sucrose에 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.0M glycerol+2.0M propanediol의 경우 각각 65.3, 68.6, 63.2 및 59.5%의 생존율을 나타냈다.
4. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 0.50M sucrose와 각 耐凍劑의 平衡에 따른 동결융해후의 生存率은 0.50M sucrose에 2.0M glycerol, 3.0M DMSO, 2.0M propanediol 및 2.0M glycerol+2.0M propanediol의 경우 각각 67.5, 62.9, 56.9 및 62.8%의 생존율을 나타냈다.
5. 돼지 受精卵의 완만 및 초급속동결에 있어서 3.0M DMSO+0.25M sucrose+20% FCS+PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 5, 10, 20분간 평형시킨 후 동결했을 때 동결 융해 후의 生存率은 각각 82.6, 81.5, 59.7% 및 67.1, 65.7, 27.1%로서 5분의 평형시간에서 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. Boon, W.R., C.A. Brown, J.M. Vasquez and S.S. Shapiro. 1988. Freezing of mammalian embryo without the aid of a programable freezer. Fertil. Steril., 50 : 348-354.
3. Chupin, D. and M.M. De Reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. Theriogenology, 26 : 157-166.
4. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1982. Survival of rat embryos after freezing. J. Reprod. Fert., 66 : 367-370.
5. 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.
6. Leibo, S.P. and P. Mazur. 1972. Preservation of mammalian embryos by freezing. In. Daniel, J.O. Jr.(ed). Methods in mammalian reproduction. Academic Press, New York. 179-197.
7. Mazur, P. 1977. Slow freezing injury in mammalian cells in the freezing of mammalian embryos. Ciba Foun. Symp. Elsevier North-Holland, Amsterdam., 52 : 19-45.
8. Merry, D.A., R.L. Allen, K. Krag and R.W. Wright Jr. 1983. Sucrose dilution of frozen mouse embryos ; Interaction of glycerol and sucrose concentration. Theriogenology, 20 : 325-332.
9. 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.
10. Nagashima, H., Y. Kato, H. Yamakawa and S. Ogawa. 1989. Low temperature sensitivity of blastocyst and blastocyst -derived cells in pigs. Theriogenology, 31(3) : 525-530.
11. Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. J. Reprod. Fert., 87 : 479-483.
12. Nguyen, B.X., N.Y. Heyman and J.P. Renard. 1984. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. Theriogenology, 22 : 389-400.
13. Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos ; Effects of a one-step dilution or 1.4M glycerol. Theriogenology, 23 : 369-379.
14. Rall, W.F. and C. Polge. 1984. Effect of warm rate on mouse embryos frozen thawed in glycerol. J. Reprod. Fert., 70 : 185-192.
15. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15 : 245-248.
16. 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.
17. 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.
18. Szell, A. and J.N. Shelton. 1986a. Role of eqilibration before rapid freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78 : 699-703.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to −196° and −269℃. Science, 178 : 411-414.
23. Williams, T.G. and S.E. Johnson. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. Theriogenology, 23 : 235(Abstract).
24. Wilmut, 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.
25. 강만종, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광. 1990. 생쥐 2-세포기 수정란의 초급속동결. 한국가축번식학회지, 14(1) : 23-30.
26. 정진관, 장원경, 유승환. 1990. 돼지 수정란의 동결에 관한 연구. 한국축산학회지, 32(8) : 450-458.