

## 동결보호제의 농도와 평형시간이 생쥐의 정상배 및 분할배의 용적 변화와 체외 발달에 미치는 영향

이은봉\* · 공일근 · 강대진 · 박충생  
경상대학교 농과대학 축산학과

### Effect of Cryoprotectant Concentration and Equilibration Time on Volume Change and *In Vitro* Development of Intact and Bisected Mouse Embryos following Rapid Freezing

Lee, E.B\*., I.K. Kong, D.J. Kang and C.S. Park

Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

#### SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of cyroprotectant concentration and equilibration time on volume change and *in vitro* development of intact and bisected mouse embryos by rapid freezing. When compacted morulae were rapidly frozen in 3.0 to 4.0 glycerol or DMSO with 0.25 M sucrose solution, the superior ( $P < 0.05$ ) post-thaw survival rate was obtained at the glycerol concentration of 4.0 M (89.4%) than 3.0 M (71.4%) or 5.0 M (42.4%), but at the DMSO concentration of 3.0 M (84.5%) than 4.0 M (51.1%) or 5.0 M (0.0%). The optimal equilibration time for rapid freezing of ZP-free or bisected morulae in 4.0 M glycerol with 0.25 M sucrose was found to be 3 minutes. The minimal volume of compacted morulae which corresponded with 61 to 62% of pre-equilibrated embryo volume was obtained from equilibration for 3 minutes in both 3.0 and 4.0 M glycerol solutions with 0.25 M sucrose.

(Key words : volume change, rapid freezing, equilibration time, ZP-free and bisected embryos)

#### I. 緒 論

포유동물배의 동결보존에 관한 연구는 1972년에 Whittingham 등이 처음으로 생쥐배를  $-196^{\circ}\text{C}$ 와  $-269^{\circ}\text{C}$ 에서 동결보존 후 이식하여 산자 생산에 성공한 이래 많은 연구가 진행되어 현재 가축배의 동결보존은 모든 축종에서도 성공되어 산자가 생산되고 있다. 배의 동결·용해후 생존율은 생물학적, 물리학적 및 생화학적인 상호반응으로 동결보호제의 종류, 냉각속도, 동결 방법 및 용해속도 등에 따라 크게 영향을 받는다. Takeda 등(1984)은 생쥐의 배를 이용하여 간편한 급

속동결방법을 개발하였으며, 그 후에 Chupin과 De Reviers(1986)는 흰쥐의 배를 액체질소 container 내의 증기에서 단시간 내에 많은 배를 빠르게 동결시키면서도 높은 생존율을 얻을 수 있는 급속동결방법을 고안하였다.

Leibo(1986) 및 Széll과 Schelton(1986) 등은 부적당한 탈수는 세포의 생존성에 치명적인 영향을 미치는 세포내 결빙을 형성한다고 하였다. 급속동결방법으로 동결보존을 실시할 때 최적의 평형시간에 관하여 Takahashi와 Kanagawa(1990)는 동결보존액에서 배의 용적변화를 측정하여 최소용적에 도달하는 시기를

\*순천대학교 농과대학 축산학과(Department of Animal Science, College of Agriculture, Sunchun National University)

최적의 평형시기라고 하였다.

본 연구에서는 급속동결방법에서 동결보호제의 농도와 평형시간이 생쥐의 정상배 및 분할배의 용적변화 및 체외발달에 미치는 영향을 검토하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 실험동물 및 배의 채취

본 실험에 공시된 실험동물은 ICR 계통의 생쥐로서 공란생쥐는 4~6주령, 교미용 수컷은 10~12주령의 생쥐를 공시하였다. 과배란 유기는 Park 등(1990)의 방법에 준하여 실시하였으며, hCG 투여후 64, 86 및 92 시간경에 각각 8세포기배, compact 화 상실기배 및 배반포기배를 채취하였다. 채취한 배는 기본액(D-PBS+16% FCS; 이하 기본액으로 약함)으로 3~4 회 세척하여 Kennedy 등(1983)의 방법에 따라 excellent, good, fair, poor 및 degenerate의 등급으로 구분하였으며, 본 실험에서는 excellent와 good 이상의 정상형태인 8세포기배, compact 화 상실기배 및 배반포기배를 선별하여 사용하였다.

### 2. 동결보존액 및 배양액

생쥐의 배를 관류, 세척 및 동결보존함에는 본액을 사용하였고, 배의 조작 및 배양을 위하여는 Brinster's mouse ovum culture medium-3(BMOC-3; Brinster, 1971)을 사용하였다. 배양액의 pH는 7.4로 조정하였으며, 사용 직전에 0.2 $\mu$ m의 Milipore filter(Gelman Science Co., 미국)로 여과시킴으로써 제공하였다. 조작 및 배양액의 사용은 light weight paraffin oil(Junsei Chem. Co., 일본)을 도포한 Brinster(1963)의 미소적배양법에 따라 실시하였으며, 체외배양시는 37°C의 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> 및 포화 습도상태인 CO<sub>2</sub> 배양기(Leec, 영국)내에서 실험 전 2시간동안 평형시킨 후 사용하였다.

### 3. 배의 투명대 제거 및 분할

Compact 화 상실기배의 투명대 제거는 Nagashima 등(1984)의 방법에 준하여 실시하였으며, compact 화 상실기배의 분할은 McEvoy와 Sreenan(1987)의 방법을 약간 개선하여 실시하였다. 즉, 정상적인 배를 선별하여 분할작업 2시간 전에 CO<sub>2</sub>배양기에

서 배양한 후, 배를 멸균된 plastic petri dish(100×15mm; Costar, 미국)에 소립배양액(PBS+16% FCS)을 적하하고 배를 옮긴 후 paraffin oil로 포매하고, 도립현미경하에서 micromanipulator(Huxley-Goodfellow, 영국)에 수평면에서 15~30°의 각으로 장착된 microsurg blade(Weck, 미국)로 시야의 중앙에 있는 배의 정중선상에 놓고 서서히 누르면 투명대가 돌리며 배는 고정되고 약간 편평해지면서 절단된다. 그리고 투명대의 일부가 붙어있을 때에는 blade의 장축방향으로 전후 수회 미동시켜 미세조작하여 양분하였다.

### 4. 배의 용적변화 측정

급속동결에서 최적의 동결 및 평형시기를 찾기 위하여 배가 최소용적에 도달하는 시기를 Takahashi와 Kanagawa(1990)의 방법에 준하여 조사하였다. 실험에 사용된 배는 compact 화 상실기배로서 glycerol 3.0, 4.0, 5.0 M 및 0.25 M sucrose의 동결보존액에서 각각 3, 5, 10 및 20분간 평형시키면서 배의 용적을 도립위상차현미경(Nikon, 일본)의 400배 배율하에서 ocular micrometer를 사용하여 투명대를 제외한 난황막의 장경 및 단경을 직교되도록 측정하여

$$V = 4/3 \cdot \pi r^3$$

공식에 의하여 배의 용적을 계산하였다.

### 5. 급속동결방법

동결보존액의 조성은 기본액에 동결보호제로 glycerol과 DMSO의 농도를 각각 3.0, 4.0 및 5.0 M로 하고 0.25 M sucrose를 첨가하여 제조하였다. 처리한 배의 평형은 정상배에서는 공히 5분간 평형을 유도하여 Fig. 1과 같이 0.25ml plastic straw에 7~15개씩 주입하여 Chupin과 De Reviers(1986)의 방법으로 액체질소 container내의 액체질소 증기표면(straw를 수직으로 고정하였을 때 straw내의 동결액 부위의 온도는 약 -140~-150°C)에서 약 5분간 정지 후 액체질소에 침지하였다. 투명대 제거 및 분할배는 평형시간을 3분과 5분으로 구분하여 실시하였으며, 동결방법은 정상배의 동결과 동일한 방법으로 실시하였다.

처리한 배의 용해는 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 38°C의 온수에 20초간 흔들면서 급속용해하여, 0.25 M sucrose의 희석액에 10분간 유지시키고 기본배

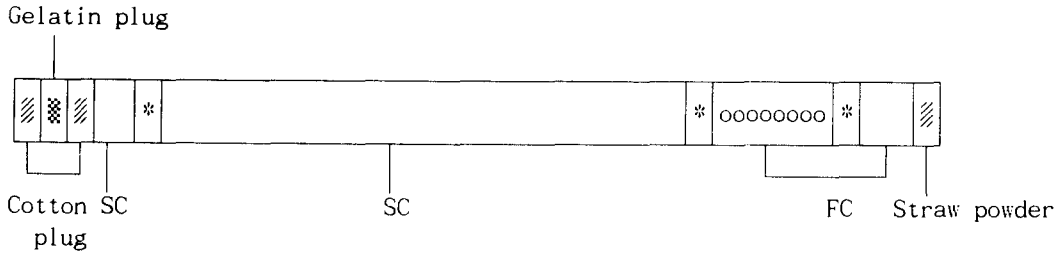


Fig. 1. Diagrammatic representation of 0.25ml plastic straw loaded with freezing solution and embryos for rapid freezing.  
 (FC) Freezing solution column, (SC) 0.25M sucrose solution column,  
 (\*) Air bubble column and (o) Embryos in freezing solution column.

양액에서 3회 세척함으로써 동결보호제를 제거하였다.

### 6. 배의 생존성 판정

동결·융해한 배는 동결보호제를 제거시키고 기본액에서 5분간 정치시킨 후 8세포기배, compact 화 상실기배 및 배반포기배는 각각 48, 24 및 12시간씩 100  $\mu$ M의 ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA: Sigma, 미국)가 첨가된  $\text{NaHCO}_3$ -BMOC-3 배양액으로 옮겨 37°C의  $\text{CO}_2$  배양기 내에서 배양을 실시하여, 확장배반포기까지 발육한 것을 생존한 것으로 판정하였고, 투명대 제거배 및 분할배는 각각 24~28시간 배양하여 배반포기까지 발달한 것을 생존한 것으로 판정하였다.

### 7. 통계학적 분석

체외배양 및 동결·융해한 배의 생존율은 Microsta computer statistical program package를 사용하여  $\chi^2$ -test를 실시하였고, 배의 용적변화 측정은 Duncan's multiple range test를 실시하여 각 처리구 평균간의 유의차를 검정하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 동결보호제의 농도 및 평형시간에 따른 배의 용적 변화

급속동결방법에서 최적의 동결시기를 결정하기 위하여 평형시간에 따른 생쥐배의 용적변화를 측정된 결과는 Table 1과 같다. Takahashi와 Kanagawa (1990)는 동결보존액에서 배의 용적변화를 측정하여

최소용적에 도달하는 시기를 최적의 평형시기라고 판단하여 3.0 M glycerol에 0.25 M lactose를 첨가한 동결보존액에서 배의 용적을 측정된 결과 3분간 평형유지시 최소용적 ( $60.9 \pm 2.1\%$ )에 도달하여 3분 평형시에서 최고의 생존율을 얻었다고 보고하였다.

본 실험의 결과에서는 최소용적에 도달하는 시기를 각 농도간의 수치를 보면 glycerol 0.0 M ( $67.5 \pm 1.6\%$ ), 3.0 M ( $62.2 \pm 1.3\%$ ), 4.0 M ( $61.6 \pm 1.7\%$ ) 및 5.0 M ( $64.8 \pm 1.7\%$ )으로써 4.0 M glycerol에 0.25 M sucrose를 첨가한 동결보존액에서 3분간 평형유지했을 때 최소용적 ( $61.6 \pm 1.8\%$ )에 도달하였으며 이는 Takahashi와 Kanagawa (1990)의 결과와 일치하는 경향이였다.

이상의 결과로 보아 최적의 평형시간은 3.0 M과 4.0 M에서는 3분간이었으며, 3분이 경과한 이후에는 다시 배의 용적이 점차 증가하는 경향이였다. 5.0 M glycerol의 경우에는 3분 이전에 최소용적에 도달하였던 것으로 보여지므로 평형시간을 3분 이내로 하는 것이 생존율을 향상시킬 것으로 사료된다. 동결보존액에 glycerol은 첨가하지 않고 0.25 M sucrose만 첨가한 구에서는 평형 이후 계속 탈수가 일어나 용적이 줄어드는 경향을 보였는데, 이는 비투과성 동결보호제인 sucrose가 세포밖에서 침투하지 않고 작용하는 것으로 사료된다.

### 2. 급속동결방법에 의한 생존성

상실기배를 실온에서 glycerol 및 DMSO의 동결보호제를 각각 3.0, 4.0 및 5.0 M의 농도에 0.25 M

Table 1. Changes in embryo volume(mm<sup>3</sup>) during exposure to various concentrations of glycerol with 0.25M sucrose in basal medium

Concentration of glycerol (M)	No. of embryos examined	Equilibration time(min.)				
		0	3	5	10	20
0	40	236.1±7.1 <sup>c</sup>	161.4±4.8 <sup>a</sup>	161.6±4.7 <sup>a</sup>	148.2±4.3 <sup>ab</sup>	142.7±3.9 <sup>b</sup>
		(100)	(67.5±1.6)	(68.6±1.4)	(62.7±1.6)	(60.6±1.4)
3	40	194.2±7.1 <sup>b</sup>	122.1±3.7 <sup>a</sup>	125.7±3.4 <sup>a</sup>	132.6±2.8 <sup>a</sup>	133.9±2.3 <sup>a</sup>
		(100)	(62.2±1.3)	(63.3±1.6)	(67.6±1.4)	(68.8±1.8)
4	40	211.6±4.9 <sup>c</sup>	130.0±5.0 <sup>a</sup>	136.5±4.8 <sup>a</sup>	145.5±5.0 <sup>ab</sup>	151.6±5.8 <sup>b</sup>
		(100)	(61.6±1.8)	(65.1±1.6)	(70.1±1.7)	(72.1±2.0)
5	40	214.5±5.4 <sup>c</sup>	139.2±4.5 <sup>a</sup>	148.6±4.0 <sup>ab</sup>	152.4±3.5 <sup>ab</sup>	158.3±4.3 <sup>b</sup>
		(100)	(64.8±1.7)	(70.2±2.1)	(71.9±2.3)	(74.3±2.5)

\*Means±S.E.M. with different superscripts in the same rows are significantly different (P<0.05).

\*Figures in parentheses are the relative percentages of the isotonic volume of embryos.

sucrose를 첨가한 동결보존액 내에서 5분간 평형유지하여 액체질소 증기에 5분간 정지한 후 액체질소에 침지하여 급속동결을 실시하였을 때 배의 생존성은 Table 2에 나타난 바와 같다. Kasai 등(1981)은 생쥐배를 급속동결할 때 동결보호제로써 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 사용하는 것이 좋다고 하였는데, 저농도 DMSO는 융해후 높은 생존율을 나타내지만 glycerol이나 ethylene glycol에 비하여 고농도일때 독성이 강하다고 하였다. 본 실험에서 DMSO를 사용한 배반포기에서 생존배가 없는 것은 강한 독성과 포배강에서의 삼투압 등이 영향을 미친 것

로 사료된다.

급속동결에서 배의 발달단계별로 생존성을 살펴 보면 Table 3 및 4에 나타난 바와 같다. 배의 발달단계에 따른 급속동결·융해후의 생존율의 차이는 Chupin (1986)이 동결보호제의 불충분한 희석으로 인한 삼투압의 영향이라고 하였고, Williams와 Johnson (1986)은 상실배가 배반포기배보다 더 좋은 생존율을 보이는데 이는 할구의 크기, 배의 용적 및 탈수 때 수분의 이동을 변경시키는 포배강 등이 영향을 미친다고 하였다.

본 실험의 결과에서 4.0M glycerol에 있어서 배의

Table 2. Effect of cryoprotectant concentrations on survival of mouse compact morulae for rapid freezing following equilibration for 5 minutes

Cryoprotectant concentration (M)	No. of embryos frozen	No. and (%) of embryos recovered	No. and (%) of embryos developed to			
			Normal blastocyst	False blastocyst	Degenerated	
Glycerol	3	112	105(93.8)	75(71.4) <sup>c</sup>	10( 9.5)	20(19.1)
	4	122	113(92.6)	101(89.4) <sup>b</sup>	4( 3.5)	8( 7.1)
	5	109	99(90.8)	42(42.4) <sup>a</sup>	20(20.2)	37(37.4)
DMSO	3	106	97(91.5)	82(84.5) <sup>c</sup>	2( 2.1)	13(13.4)
	4	116	94(81.0)	48(51.1) <sup>b</sup>	18(19.1)	28(29.8)
	5	112	98(87.5)	0( 0.0) <sup>a</sup>	10(10.2)	88(89.8)

\*Values with different superscripts denote significant (P<0.05) difference among cryoprotectant concentration.

**Table 3. Effect of cell stage on survival of mouse embryos cryopreserved by rapid freezing following equilibration in 4M glycerol for 5 minutes**

Cell stages	No. of embryos frozen	No. and (%) of embryos recovered	No. and (%) of embryos developed to		
			Normal blastocyst	False blastocyst	Degenerated
8-cell	104	96(92.3)	89(92.7) <sup>b</sup>	3(3.1)	4(4.2)
Morula	122	113(92.6)	101(89.4) <sup>b</sup>	4(3.5)	8(7.1)
Blastocyst	106	94(88.7)	70(74.5) <sup>a</sup>	9(9.6)	15(15.9)

\*Values with different superscripts denote significant ( $P < 0.05$ ) difference among cell stages.

**Table 4. Effect of cell stage on survival of mouse embryos cryopreserved by rapid freezing following equilibration in 3M DMSO for 5 minutes**

Cell stages	No. of embryos frozen	No. and (%) of embryos recovered	No. and (%) of embryos developed to		
			Normal blastocyst	False blastocyst	Degenerated
8-cell	112	94(83.9)	61(64.9) <sup>a</sup>	17(18.1)	16(17.0)
Morula	106	97(91.5)	82(84.5) <sup>b</sup>	2(2.1)	13(13.4)
Blastocyst	118	102(86.4)	52(50.9) <sup>a</sup>	14(13.7)	31(30.4)

\*Values with different superscripts denote significant ( $P < 0.05$ ) difference among cell stages.

발달단계별 생존율은 8세포기배(92.7%)와 상실기배(89.4%) 간에는 유의차가 없었으며 8세포기배는 배반포기배(74.5%)에 비하여 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 생존율을 나타내었고, 3.0 M DMSO에서 배의 발달 단계별 생존율은 8세포기배(64.9%), 상실기배(84.5%) 및 배반포기배(50.9%)로써 상실기배가 8세포기배 및 배반포기배에 비하여 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 생존율을 나타냈으며, 이러한 결과는 배반포기배일 때는 배의 용적 및 포배강 등의 영향때문에 배반포기배가 동결에 적절치 못한 것으로 사료된다.

투명대 제거배 및 분할배를 glycerol의 농도를 3.0 및 4.0M로 하고 평형시간을 3 및 5분으로 하였을 때 생존성을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 투명대 제거배 및 분할배의 급속동결·융해후 생존성은 투명대 제거배를 3분 또는 5분간 평형을 유지하였을 때 3.0 M glycerol 구에서 62.8 및 68.0%, 4.0 M glycerol 구에서 73.8 및 32.5%이었으며, 분할배에서도 3 및 5분간 평형을 유지하였을 때 3.0 M glycerol 구에서 55.1 및 61.1%, 4.0 M glycerol 구에서 64.8 및 33.3%로

써 투명대 제거배 및 분할배 공히 4.0M의 glycerol 구에서 3분간 평형을 유지했을 때 각각 높은 생존율을 보였는데, 이러한 결과는 투명대가 제거되고, 분할과정에서 상해를 입고 동결보호제가 직접 배에 장시간 접촉함으로써 독성과 삼투압 등의 영향을 더 많이 받았던 것으로 사료된다.

이상의 급속동결방법에서 정상배, 투명대 제거배 및 분할배를 glycerol의 농도를 각각 4.0M로 하여 동결한 후의 생존성을 비교한 결과는 Table 6에 나타난 바와 같다. 정상배의 경우에 검토된 발달단계중에서 가장 생존율이 높았던 것은 상실기배로서 4.0 M glycerol에서 각각 5분간 평형에 동결·융해후 생존성을 비교하여 보면 89.4%이었고, 투명대 제거배 및 분할배에서 73.8 및 64.8%를 얻음으로써 투명대 제거배와 분할배에서는 시간을 단축시키는 것이 좋았다.

#### IV. 摘 要

1. 동결보호제의 농도에 따른 적정 평형시간을 규명하

Table 5. Survival comparison of mouse zona-free and bisected compact morulae cryopreserved by rapid freezing following in glycerol contained 0.25M sucrose

Types of embryos	Glycerol concentration (M)	Equilibration time (min.)	No. of embryos frozen	No. and (%) of embryos recovered	No. and (%) of embryos developed to		
					Normal blastocyst	False blastocyst	Degenerated
Zona free	3	3	41	35 (85.4)	22 (62.8) <sup>a</sup>	3 (8.6)	10 (28.6)
		4	55	50 (90.9)	34 (68.0) <sup>a</sup>	6 (12.0)	10 (20.0)
	4	3	47	42 (89.4)	31 (73.8) <sup>b</sup>	3 (7.1)	8 (19.1)
		5	43	40 (93.0)	13 (32.5) <sup>a</sup>	7 (17.5)	20 (50.0)
Bisected	3	3	56	49 (87.5)	27 (55.1) <sup>a</sup>	5 (10.2)	17 (34.7)
		5	60	54 (90.0)	33 (61.1) <sup>a</sup>	6 (11.1)	15 (27.8)
	4	3	62	54 (87.1)	35 (64.8) <sup>b</sup>	10 (18.5)	9 (16.7)
		5	57	51 (89.4)	17 (33.3) <sup>a</sup>	14 (27.5)	20 (39.2)

\*Values with different superscripts denote significant ( $P < 0.05$ ) difference between the equilibration times and glycerol concentration.

Table 6. Survival comparison of mouse zona-free and bisected compact morulae cryopreserved by rapid freezing following in glycerol contained 0.25M sucrose

Types of embryos	Glycerol concentration (M)	Equilibration time (min.)	No. of embryos frozen	No. and (%) of embryos recovered	No. and (%) of embryos developed to		
					Normal blastocyst	False blastocyst	Degenerated
Intact	4	5	122	113 (92.6)	101 (89.4) <sup>b</sup>	4 (3.5)	8 (7.1)
Zona free	4	3	47	42 (89.4)	31 (73.8) <sup>a</sup>	3 (7.1)	8 (19.1)
Bisected	4	3	62	54 (87.1)	17 (64.8) <sup>a</sup>	10 (18.5)	9 (16.7)

\*Values with different superscripts denote significant ( $P < 0.05$ ) difference among type of embryos.

기 위하여 상실기배의 용적변화를 조사한 결과 3.0 M 및 4.0 M glycerol에서 3분간 평형유지하였을 때 배의 최소용적(61~62%)으로 수축되었으며, 최소용적에 도달한 시기에 동결을 실시하면 병정형성의 양을 최소한으로 줄임으로써 동결·용해후 배의 생존율을 향상시킬 수 있는 것으로 사료된다.

2. 급속동결방법으로 상실기배에서는 4.0 M glycerol에서 89.4%, 3.0 M DMSO에서 84.5%의 동결·용해후 생존율을 보여 타 농도에 비하여 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높았다. 배 발달단계에 있어서는 4.0 M glycerol의 동결보호제에서 8세포기배와 상실기배는 공히 배반포기배 보다, 그리고 3.0 M DMSO에서는 상실기배가 8세포기배나 배반포기배

보다 각각 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높은 생존율을 보였다. 투명대 제거배 및 분할배에서는 4.0 M glycerol의 동결보호제로 3분간 평형유지했을 때 각각 73.8 및 64.8%로써 가장 높은 ( $P < 0.05$ ) 생존율을 얻었다.

## V. 引用文獻

1. Brinster, R.L. 1963. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp. Cell Res., 32: 205-208.
2. Brinster, R.L. 1971. Measuring embryonic

- enzyme activity. In: Daniel, J.C. Jr. *Methods in mammalian embryology*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, U.S.A. pp.215-227.
3. Chupin, D. 1986. Quick freezing of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 25 : 147 (Abstr.).
  4. Chupin, D. and M.M. De Reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26 : 157-166.
  5. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 61 : 175-180.
  6. Kennedy, L.G., M.P. Boland and I. Gordon. 1983. The effect of embryos quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology*, 19 : 823-832.
  7. Leibo, S.P. 1986. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 25 : 114.
  8. McEvoy, T.G. and J.M. Sreenan. 1987. The survival of bisected cattle embryos without zona pellucidae. *Theriogenology*, 27 : 257 (Abstr.).
  9. Nagashima, H., K. Matsui, T. Sawasaki and Y. Kano. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fert.*, 70 : 357-362.
  10. Park, C.S., S.Y. Choe, H.J. Lee and H. S. Park. 1990. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos. II. Developmental potential of nuclei from embryos of different developmental stages. *Korean J. Vet. Sci.*, 30 : 355-360.
  11. Széll, A. and J.N. Schelton. 1986. Role of equilibrium before rapid freezing of mouse embryo. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 699-703.
  12. Takahashi Y. and H. Kanagawa. 1990. Effect of Equilibration period on the viability of frozen-thawed mouse morula after rapid freezing. *Molecular Reprod. and Develop.*, 26 : 105-110.
  13. Takeda T., R. P. Elsdén and G.E. Seidel. Jr. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 21 : 206 (Abstr.).
  14. Whittingham, D. G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-296^{\circ}\text{C}$ . *Science*, 178 : 411-414.
  15. Williams T. J. and S.E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 26 : 125-133.