

## 1段階 straw凍結法이 소 受精卵의 生存性에 미치는 影響에 관한 研究

金相根·金武剛  
忠南大學校 獸醫科大學

## A Study on the Effects of Cryopreservation by One-Step Straw Method on the Survival of Bovine Embryos

S. K. Kim and M. K. Kim  
*Coll. of Vet. Med., Chungnam National Univ.*

### SUMMARY

This study were carried out to investigate the effective concentration of cryoprotectant agents and sucrose by one-step straw method, and to determine the optimum thawing temperature and equilibration time of frozen bovine embryos. The bovine embryos following dehydration by cryoprotective agents and a various concentration of sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 30°C water. Survival rate was defined by FDA test.

The results are summarized as follows :

1. The survival rate of bovine embryos thawed after rapid freezing in the freezing medium containing a various kinds of cryoprotective agents added 0.25M and 0.50M sucrose were 28.6% and 25.0%, 35.1% and 31.6%, 32.4% and 24.4%, 34.2% and 28.2%, 18.9% and 17.6%, 14.7.% and 21.6%, respectively.
2. The survival rate of bovine embryos thawed after rapid freezing in the freezing medium containing a various concentration of sucrose added 1.5M and 2.0M glycerol, 1.5M and 2.0M DMSO and 1.5M and 2.0M propanediol were 22.9~37.8%, 20.7~31.3%, 19.2~30.0% and 17.2~25.0%, respectively.
3. The temperature thawed at 20°C after rapid freezing of bovine embryos resulted in a significantly higher embryos survival rate than did at 30°C and 35°C.
4. The equilibration time on the survival rate of bovine embryos was attained after short period of time(2.5~5 min.) in the freezing medium higher than long period of time (10~20 min.).

**Key words:** cryoprotectants, rapid freezing, sucrose concentration, equilibration time, survival rates

### 序 論

受精卵의 凍結은 주로 실험동물을 대상으로 緩慢

凍結法으로 凍結 保存하였으나, 최근에는 vitrification solution을 제조하여 액체질소 container의 증기로 직접동결하거나, 고농도의 耐凍劑를 이용하여 동결전 受精卵내의 수분을 탈수시킨 상태에서

직접 液體窒素中에 침지하는 간편한 急速凍結法에 관한 연구가 이루어지고 있다(Krag 등, 1985; Frank 등, 1985; Rall과 Fahy, 1985; Hsu 등, 1986; 金 등, 1991a,b; Takeda 등, 1984; Williams와 Johnson, 1985; Krag 등, 1985; Szell과 Shelton, 1987.; Leibo와 Mazur, 197.8; Wilmut, 197.2).

수정란의 동결시 sucrose의 적정농도는 Mapletoft 등(1989a), 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. 耐凍劑의 平衡時間별 생존율은 Trounson 등(1984)은 2분이하가, Mapletoft (1989 a,b)는 1분간이, Robertson 등(1989)은 10초간이, Trounson 등 (1987)은 5분과 10분의 평형시간에는 차이가 없다고 하였으며, Boon 등(1988)은 20분에서 현저하게 저조하다고 보고하였다. 受精卵의 용해온도별 생존율은 Mapletoft(1989a,b)는 20°C, Szell과 Shelton (1986a,b)은 20°C, Smorag 등(1990)은 20°C, Palasz 등(1990)은 22°C, Bielanski 등(1984)은 30°C가 우수하다고 보고하였다.

이에, 본 연구는 소 受精卵의 1단계 straw법의 應用技術을 확립하고자 耐凍劑의 濃度 및 平衡時間, sucrose의 添加 및 融解溫度에 따른 急速凍結 融해 후의 生存率을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

## 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, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 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×)하에서 卵胞卵을 회수하여 배양액으로 3회 洗滌후 10%(v/v)의 FCS와 1 g/ml의 FSH(Sigma, USA), 2IU/ml의 HCG, 1 g/ml의  $\beta$ -estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin

G 및 100  $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate가 添加된 TCM-199(Whittaker, M.A., Bioproducts Co., USA) 培養液으로 배양하였으며, 사용전 0.2 m millipore filter로 濾過 滅菌후 사용하였다.

### 2. 方 法

#### 1) 卵胞卵의 體外受精

卵胞卵의 體外成熟은 CO<sub>2</sub> 培養器내(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5°C)에서 5-6시간 平衡시 켜 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복한 배양액 50 $\mu$ l 小滴에 5개의 卵胞卵을 주입하여 24시간 배양하였으며, 體外受精은 45 $\mu$ l의 受精用 培養液 小滴에 5개의 卵胞卵을 주입한 후, BO액 (Bracket와 Oliphant, 1975) 1 ml와 38°C의 溫水에 약 1분간 침지하여 融解한 精液 0.2ml를 시험관내에서 혼합하여 CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ g/ml의 heparin(Sigma, USA)과 희석하여 15분간 CO<sub>2</sub> 培養器에서 受精能獲得을 유도시킨 精子浮遊液 2  $\mu$ l(1.5 × 10<sup>6</sup>/ml)로 媒精하여 수정으로 판정된 胚를 이용하였다 (Shea 등, 1976; Ball 등, 1983).

#### 2) 急速凍結

受精卵의 急速凍結은, glycerol, DMSO 및 propanediol 등의 耐凍劑를 각각 1.5M, 2.0M, + 0.25M 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 곧 바로 浸漬함으로써 急速凍結을 실시하였다.

#### 3) 生存性 檢査

凍結후 3~6개월간 보존된 受精卵의 融解는 straw를 실온에 30초간 방치한 다음 38°C의 溫水에서 용해후 耐凍劑를 제거하기 위하여 거꾸로 흔들어 10분간 방치한후 신 선한 PBS로 3회 세척한 다음 TCM-199 培養液으로 배양하면서 발생상태를 관찰하거나, fluorescence diacetate (FDA) 1 mg을 acetone 1 ml에 용해한 다음 PBS액에 600,000 : 1

의 비율로 희석한(pH 7.0~7.4) 액에 受精卵을 넣고 常溫에서 3~5분간 배양한후 FDA가 함유되어 있지 않은 PBS액에 옮겨 형광현미경 또는 位相差顯微鏡하에서(× 200) 생존지수에 의해 生死與否를 판정하였다(Schilling등,1982).

## 結果 및 考察

### 1. 單一 및 混合 耐凍劑의 농도에 따른 生存率

소 受精卵의 急速凍結에 있어서 내동제에 첨가된 sucrose의 농도에 따른 生存率은 Table 1 및 2와 같다.

0.25M sucrose에 glycerol, DMSO 및 propanediol을 각각 1.5M 및 2.0M농도의 첨가에 따른 수정란의 急速凍結 融解후의 生存率은 각각 28.6%, 35.1%, 32.4%, 34.2%, 18.9% 및 14.7% 였으며 0.5 M 농도의 첨가에 따른 生存율은 25.0%, 31.6%, 24.4%, 28.2%, 17.6% 및 21.6%로서 0.25M sucrose 첨가가 0.50M 농도보다 높은 生存율을 나타냈다. 한편, 1.5M glycerol + 1.5M DMSO, 2.0M glycerol + 2.0M DMSO, 1.5M DMSO + 1.5M propanediol 2.0M DMSO + 2.0M propanediol, 1.5M propanediol + 1.5M glycerol 및 2.0M propanediol + 2.0M glycerol 등의 내동제에

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

Freezing medium	Sucrose concentration(M)					
	0.25			0.50		
	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)
1.5M G	42	40(95.2)	12(28.6)	36	33(91.7)	9(25.0)
2.0M G	37	35(94.6)	13(35.1)	38	35(92.1)	12(31.6)
1.5M D	35	33(94.3)	11(32.4)	41	39(95.1)	10(24.4)
2.0M D	38	35(92.1)	13(34.2)	39	35(89.7)	11(28.2)
1.5M P	37	34(91.9)	7(18.9)	34	31(91.2)	6(17.6)
2.0M P	34	32(94.1)	5(14.7)	37	35(94.6)	8(21.6)

G : Glycerol, D : DMSO, P : Propanediol

\* : No. of embryos recovered / No. of embryos freed

\*\* : No. of morula or blastocyst / No. of embryos freed

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

Freezing medium	Sucrose concentration(M)					
	0.25			0.50		
	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)
1.5M G+1.5M D	37	35(94.6)	11(29.7)	37	34(91.9)	10(27.0)
2.0M G+2.0M D	35	32(91.4)	13(37.1)	41	39(95.1)	14(34.1)
1.5M D+1.5M P	41	39(95.1)	10(24.4)	36	33(91.7)	8(22.2)
2.0M D+2.0M P	39	36(92.3)	10(25.6)	34	31(91.2)	7(20.6)
1.5M P+1.5M G	34	31(91.2)	8(23.5)	37	35(94.6)	8(21.6)
2.0M P+2.0M G	36	33(91.7)	9(25.0)	35	32(91.4)	8(22.9)

\* : No. of embryos recovered / No. of embryos freed

\*\* : No. of morula or blastocyst / No. of embryos freed

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

Freezing medium	One step sucrose dilution(M)							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)
1.5M G	37	14(37.8)	32	10(31.3)	32	8(25.0)	35	9(25.0)
2.0M G	35	12(34.3)	30	8(26.7)	30	9(30.0)	37	8(21.6)
1.5M D	36	9(25.0)	32	8(25.0)	26	5(19.2)	30	5(16.7)
2.0M D	41	12(29.3)	29	7(24.1)	29	7(24.1)	32	7(21.9)
1.5M P	39	10(25.6)	30	9(30.0)	32	8(25.0)	29	5(17.2)
2.0M P	35	8(22.9)	29	6(20.7)	33	8(24.2)	35	7(20.0)

\* : No. of embryos recovered / No. of embryos frozen

\*\* : No. of morula or blastocyst / No. of embryos frozen

0.25M 및 0.50M의 sucrose의 첨가에 따른 생존율은 각각 29.7%와 27.0%, 37.1%와 34.1%, 24.4%와 22.2%, 25.6%와 20.6%, 23.5%와 21.6% 및 25.0%와 22.9%의 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 凍結方法에 차이가 있으나, mouse 胚를 이용한 Szell과 Shelton(1987)의 95%의 생존율과, Chupin과 Reviers(1986), Williams와 Johnson(1985) 등의 79.6%와 84.0%의 生存率과 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. 耐凍劑 sucrose의 濃度에 따른 生存率

소 受精卵의 急速 凍結에 있어서 각 내동제에 첨가된 sucrose의 농도에 따른 凍結 融解後의 生存率은 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 sucrose농도의 첨가에 따른 急速凍結 融解後의 生存率은 각각 22.9~37.8%, 20.7~31.3%, 19.2~30.0% 및 17.2~25.0%로서 0.25M sucrose의 농도에서 비교적 높은 생존율을 나타냈으나 0.75M 및 1.00M sucrose에서는 비교적 낮은 생존율을 나타냈다.

내동제에 첨가된 sucrose의 적정농도에 대해

Mapletoft 등(1989 a,b) 및 Trounson 등(1987)은 0.5M이, Szell과 Shelton(1987) 및 Wilton 등(1989)은 0.25M이, Mapletoft 등(1987)은 1.0M과 1.5M이 Andrede와 Rodrigues(1987)는 1.0M이라고 보고하였다. Wood와 Farrant(1980) 및 Szell과 Shelton(1986a,b)은 sucrose를 내동제에 첨가할 경우 세포내의 자유수를 탈수시키므로써 외부세포막을 보호하여 초급속동결이 가능하다고 하였으며, Renard 등(1983) 및 Leibe(1984) 등은 sucrose를 내동제 제거에 이용하면 삼투압 차에 의해 순간적 제거가 가능하므로 1단계 straw법이 가능하다고 하였다.

## 3. 融解溫度에 따른 生存率

소 受精卵의 급속동결 용해에 있어서 融解溫度에 따른 生存率은 Table 4에 나타난 바와 같이 1.5M, 2.0M glycerol 및 1.5M, 2.0M DMSO + 0.25M, 0.50M sucrose로 처리한 동결 수정란을 20°C, 30°C 및 35°C에서 용해했을 때 생존율은 각각 26.7~37.5%, 25.8~34.5% 및 24.1~32.1%로서 30°C에서 용해했을 때 비교적 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, mouse배를 이용하여 20°C에 1분간의 용해시간이 다른 용해온도에 비해 생존율이 높았다는 Szell과 Shelton(1986a,b), Mapletoft(1989a,b) 및 Smorag 등(1990)의 결과와 유사하였으나, 37°C에 10~30초간 용해한 Robertson 등(1989) 및 Hernandez-Ledezma 등(1988a,b)의 결

Table 4. Effect of thawing temperature after rapidly freezing in the freezing medium on the survival rate of bovine embryos

Freezing medium	thawing temperature(°C)					
	20		30		35	
	Frozen Survival(%)		Frozen Survival(%)		Frozen Survival(%)	
1.5M G+0.25M S	35	13(37.1)	32	11(34.4)	30	9(30.0)
2.0M G+0.50M S	32	12(37.5)	29	10(34.5)	32	8(25.0)
1.5M D+0.25M S	34	11(32.4)	27	7(25.9)	28	9(32.1)
2.0M D+0.50M S	30	8(26.7)	31	8(25.8)	29	7(24.1)

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

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

과와 30°C 및 35°C에서 용해한 Bielanski등(1984)과 Takeda (1984)의 결과와는 차이가 있었다.

unson등(1987) 및 Boon등(1988)의 결과와 거의 일치하였다.

#### 4. 耐凍劑의 平衡時間에 따른 生存率

소 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 5에서 보는 바와 같이, 1.5M, 2.0M의 glycerol 및 DMSO + 0.25M, 0.50M의 sucrose 동결액에서의 平衡시간을 2.5분, 5분, 10분, 20분으로 처리했을때 동결 용해후의 生存率은 각각 45.5~57.1%, 45.5~52.9%, 37.9~41.2% 및 28.0~35.7%로서 2.5분 및 5.0분의 平衡시간이 10분 및 20분에서의 平衡시간보다 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, 2.0M DMSO와 0.25M sucrose를 이용하였을 때 2분 이하의 平衡시간이 생존율에 있어 가장 우수하며 5분과 10분간에는 차이가 없었으나 20분에서는 현저하게 저조하였다고 보고한 Tro-

#### 摘 要

본 研究는 소 受精卵의 急速凍結 技術을 확립하고자 초급속 동결에 있어서 耐凍劑 및 sucrose의 濃度, 融解溫度 및 耐凍劑의 平衡時間에 따른 동결 용해후의 生存率을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 0.25M sucrose에 glycerol, DMSO 및 propandiol을 각각 1.5M 및 2.0M농도의 첨가에 따른 急速凍結 融解후의 生存率은 각각 28.6%, 35.1%, 32.4%, 34.2%, 18.9% 및 14.7%였으며 0.5M 농도의 첨가에 따른 생존율은 25.0%, 31.6%, 24.4%, 28.2%, 17.6% 및 21.6%였다.

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

Freezing medium	Equilibration time in the freezing (min.)							
	2.5		5.0		10.0		20.0	
	Frozen Survival(%)		Frozen Survival(%)		Frozen Survival(%)		Frozen Survival(%)	
1.5MG+0.25MS	32	12(37.5)	34	11(32.4)	34	10(29.4)	29	6(20.7)
2.0MG+0.50MS	28	10(35.7)	30	8(26.7)	30	8(26.7)	28	7(25.0)
1.5M D+0.25M S	35	15(34.9)	33	11(33.3)	29	7(24.1)	25	4(16.0)
2.0M D+0.50M S	33	10(30.3)	27	8(29.6)	31	8(25.8)	32	6(18.8)

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

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

2. 1.5M, 2.0M glycerol과 1.5M, 2.0M DMSO 및 1.5M, 2.0M propanediol농도에 0.25M, 0.50M, 0.75M 1.00M sucrose농도의 첨가에 따른急速凍結 融解후의 生存率은 각각 22.9~37.8%, 20.7~31.3%, 19.2~30.0% 및 17.2~25.0%였다.
3. 소 受精卵의 急速凍結 融解에 있어서 融解溫度 별 처리효과는 20°C에서 용해한 것이 30°C 및 35°C에서 용해한 것보다 생존율이 유의하게 높았다.
4. 소 受精卵의 急速凍結에 있어서 동결액에서의 平衡時間에 따른 生存率은 2.5분 및 5분의 평형시간이 10분, 20분보다 높게 나타났다.

### 참고문헌

- Andrede TP and Rodrigues JL. 1987. Rapid freezing of mouse embryos: In glycerol-sucrose medium. *Theriogenology* 31:225.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 28:717-725.
- Boon WR, Brown CA, Vasquez JM and Shapiro SS. 1988. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programable freezer. *Fertil. Steril.* 50:348-354.
- Chupin D and Reviere MM De. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology* 26:157-166.
- Frank GC, Coley SL, Betterbed B and Page RD. 1985. The effects of cryoprotective agents, dilution rate, freezing rates and freezing units on the survival of bovine embryos. *Theriogenology* 23:194.H
- ernandez-Ledzma JJ, Gaskins CT and Wright RW. 1988a. Freezing of mouse embryos with cryoprotectant mixture(CPM) of glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology* 29:285.
- Hernandez-Ledzma JJ, Selgrath JP and Wright RW. 1988b. One step sucrose dilution of a cryoprotectant mixture(CPM) of glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology* 29:259.
- Hsu TT, Yamakawa H, Yamanoi H and Ogawa J. 1986. Survival and transfer test of mouse embryos frozen by vitrification method. *Japan J. Anim. Reprod.* 32:29-32.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.* 59:51-56.
- Krag KT, Koehler IM and Wright RW Jr. 1985. A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. *Theriogenology* 23:199.
- Leibo SP and Mazur P. 1978. Preservation of mammalian embryos during freezing and thawing. *Exp. Cell Res.* 89:79-88.
- Leibo SP. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 23:201.
- Mafletoft RJ, Moker J and Palasz A. 1989a. Effect of thawing temperature and time to sucrose dilution on survival of mouse embryos in culture. *Theriogenology* 31:225.
- Mafletoft RJ, Moker J and Palasz A. 1989b. The effect of sucrose concentration, temperature and time on survival of fresh mouse embryos in culture. *Theriogenology* 31:225.
- Mafletoft RJ, Moker JS and Hagele WC. 1987. Comparison of two methods of removing glycerol from frozen-thawed mouse embryos with sucrose. *Theriogenology* 27:255.
- Niemann H. 1985. Freezing of bovine embryos: Effects of a one-step dilution or 1.4M glycerol. *Theriogenology* 23:369-379.
- Palasz A, Del Campo MR and Mapletoft RJ. 1990. The effect of methods of thawing and glycerol removal on survival of frozen

- mouse and bovine embryos. *Theriogenology* 33:294.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 313:573-575.
- Renard JP, Heyman Y, Leymonie P and Plat JC. 1983. Sucrose dilution: A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology* 19:145.
- Robertson JL, Minhas BS, Randall GW, Dodson MG, Palmer TV and Ricker DD. 1989. Ultrarapid freezing of mouse embryos with DMSO and trehalose. *Theriogenology* 31:250(abstr.).
- Schilling E, Niemann H and Smidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology* 15:245-248.
- Shea BF, Latour JPA, Berdin KN and Baker RD. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. *J. Anim. Sci.* 43:809-815.
- Smorag Z, Heyman Y, Garnier V and Shapiro SS. 1990. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programable freezer. *Fertil. Steril.* 50:348-354.
- Szell A and Shelton JN. 1986a. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 78:699-703.
- Szell A and Shelton JN. 1986b. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.* 80:401-408.
- Szell A and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 78:699-703.
- Takeda T, Elsdon RP and Seider GE Jr. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology* 21, 266(Abstract)
- Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrarapid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.* 48:843-850.
- Tsunoda Y, Soma T and Sugie T. 1982. Effects of postovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morula. *J. Reprod. Fert.* 65:483-487.
- Williams TG and Johnson SE. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology* 23:235(abstr.).
- 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.
- Wilton LT, Shaw JM and Trounson AO. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.* 51:513-517.
- Wood M and Farrant J. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology* 17:178-180.
- 金相根, 李晚徽. 1991. 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후의 生存性에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌 16(2):141-148.
- 李鳳求, 金相根, 李揆丞. 1991. 소 體外受精卵의 超急速凍結에 관한 研究. I. 소 體外受精卵의 緩慢 및 超急速凍結 融解후의 生存性에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌 16(2):133-140.