

肉牛受精卵 簡易凍結 및 融解方法에 관한 研究

— Glycerol 耐凍劑에 sucrose 添加與否가 FDA test에 의한 mouse 受精卵의 生存率에 미치는 影響* —

金重柱 · 李揆勳 · 姜萬種 · 金登勳 · 吳雲龍 · 康珉秀

Studies on Simplified Procedures for Freezing and Thawing of Bovine Embryos

— Effects of the glycerol cryoprotectants containing sucrose on the mouse embryo survival rate determined by FDA test —

Kim, J. K., K. H. Lee, M. J. Kang, Y. H. Kim, U. Y. Oh and M. S. Kang

SUMMARY

Effects of the glycerol addition and removal medium containing 10% sucrose on the mouse embryo survival after freezing in a liquid nitrogen container were determined using the FDA test. The summarized results are the following.

1. The FDA score was higher ($P < 0.05$) when embryos were frozen in the glycerol addition medium with sucrose than the one without it (3.4 vs 3.0)
2. No difference in the score was found between the glycerol removal medium containing 10% sucrose(3.2) and PBS + 10% sucrose(3.3)
3. The score was higher ($P < 0.01$) at morular stage than blastocyst stage of embryos.

I. 緒 論

受精卵의 凍結에 있어 耐凍劑에는 細胞膜을 透過하여 内部細胞를 保護하는 物質 (DMSO, glycerol, ethylenglycol)과 外部細胞膜을 保護하는 不透過性 溶質 (sucrose, raffinose, albumin)로 區別할 수 있다 (Szell과 Shelton, 1986b).

이러한 耐凍劑中 DMSO에 關해서는 Whittingham 等(1972) 이 mouse 受精卵의 凍結에 利用하여 成功한 以後, 많은 研究者에 依하여 廣範圍하게 利用되었으며 (Willmut, 1972; Leibo 等, 1974; Whittingham 等, 1975, 1976, 1979; 角田, 1978 ;

Kasai等, 1980), glycerol에 關해서는 Bilton과 Moore(1976)에 의해서 山羊 受精卵 凍結에서 耐凍劑效果가 確認된 後 牛 受精卵 (Bilton과 Moore, 1977)에서 再立證되어 많은 研究가 進行되어 왔고 Parkening 等, 1976 ; Miyamoto와 Ishibashi, 1979 ; Kasai等, 1983 ; Miyamoto等, 1983, 1986), 그리고 DMSO와 glycerol 이외의 耐凍劑에 關해서는 ethylen glycol(Miyamoto 와 Ishibashi, 1977, 1978 ; Miyamoto等, 1986, Urano 等 1986), propane-diol (Renard 等, 1981 ; Urano 等, 1986)등에 對하여 研究되고 있다. 그러나 現在 많은 耐凍劑中 glycerol을 凍結用液으로 利用할 때 卵子內에 浸透하

* 本 論文은 韓國家畜繁殖學會誌 12(2) : 65~71(1988)에 게재 되었음.

지 않고 外部 細胞膜을 保護하는 sucrose 를 添加하여 受精卵의 높은 生存率에 Kasai 等(1980)에 의하여 報告된 後 繼續인 研究가 이루어지고 있다 (Miyamoto 等, 1986, William과 Johnson, 1986 ; Chupin과 Reviere, 1986).

이러한 sucrose의 使用을 研究者에 따라, 凍結以前 脫水(Miyamoto 等, 1986, Rdeneard 等, 1984 ; 宮本等, 1986 ; Chupin 과 Reviere, 1986)와 融解後 耐凍劑 除去液(Reneard, 1983, Bielenski 等, Kasai 等, 1980 ; Reneard 等, 1984 ; Rall과 Palge, 1984), 그리고 凍結前後의 耐凍劑 添加 및 除去液(Nieman, 1985 ; William과 Johnson, 1985, 1986 ; Leibo, 1986 ; Reneard 等, 1980)等에 관해서 多樣하게 利用되고 있으며, 凍結液에 sucrose 를 添加할 경우에는 凍結前 細胞内の 自由水를 脫水시키므로서 急速凍結이 可能하고 外部 細胞膜을 保護한다고 하였다 (Wood와 Farrant, 1980).

또한, sucrose를 耐凍劑 除去에 利用하면 滲透壓의 差異에 의한 受精卵內에 瞬間적으로 外部變化없이 除去하므로 直接 one-step 除去가 可能하다고 하였다 (Leibo, 1983, 1984 ; Renard 等, 1983 ; Merry 等, 1983).

그리고 前術한 두가지 方法을 混合하여 凍結前後에 sucrose를 添加하는 것은 두가지 長點을 모두 活用할 수 있으며 이러한 方法에 의하여 one-step-straw(Kasai, 1980 ; Leibo, 1983 ; 鈴木, 1984)를 製造하여 實用化 段階에 있으나 凍結시킬 卵子를 straw 内の 下部에 넣는 것(鈴木, 1984)과 上部에 넣는 것(Leibo, 1984)等 어느것이 良好한 것인지는 앞으로의 研究課題이다.

그러므로 本 研究는 家兔의 第III報를 補完한 것으로서 glycerol 添加液과 除去液에 sucrose의 添加與否에 따라 液體窒素 container에서 凍結할 경우 生死判定을 FDA-test로 하여 mouse 受精卵의 生存率을 相互比較하여 牛 受精卵 凍結에 應用하고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

供試動物은 7週 以上の 雌性 ICR界 mouse를 使

用하였으며 飼養管理는 配合飼料를 自由採食 및 給水시켰으며 飼育室의 溫度는 18~28°C를 維持 하였다.

過排卵 誘起를 爲하여 腹腔內에 5~10IU의 PMSG(三共社, 日本)와 HCG((三共社, 日本)를 48時間間隔으로 注射하고 HCG주사후 同系統의 雄性 mouse 를1:1로 合舍하여 自然交尾를 誘導하였다.

다음날 아침 膣腔을 確認하였으며 膣腔이 確認되지 않은 個體는 試驗에서 除外시켰다.

受精卵의 採卵은 HCG 注射後 72~80時間에 屠殺하여, 卵管과 子宮을 切取한 後 1ml관류액이 들어있는 注射器로 回收하였다.

이때 使用한 灌流液은 modified dulbeco's phosphate buffer(m-PBS)였고 使用前에 0.2 μ m의 millipore filter로 濾過시켜 無菌處理하였다.

回收된 受精卵은 40~80培의 實體顯微鏡 下에서 形態적으로 正常인 세포만을 凍結에 利用하였다.

난자동결용 배양액으로는 PBS에 10% glycerol, 10% sucrose 와 非働化된 20% donor serum을 添加한 凍結液과 10% sucrose를 添加하지 않은 one step방법(Leibo, 1983)으로 5分間 平衡後 0.5ml straw에 몇세포를 5~15個씩 封入하였다.

受精卵의 凍結은 液體窒素 container 內에서 實施하였으며 溫度確認은 自動細胞凍結器(R-204, cell freezer, planer products, English)의 sensor에 耐凍劑로 채운 0.5ml straw을 끼워서 使用하여 Auto-recorder로 確認을 하였다. 凍結速度 緩慢((0.3°C/min)과 急速(3~5°C/min)凍結로 實施하였으며, 凍結後 融解는 38°C 溫水에서 氷片이 완전히 녹을 때까지 하였다.

融解後 耐凍劑 除去는 10% sucrose를 含有하고 있는 PBS 를 除去液으로하여 내동제의 添加와 同一한 one-step 方法으로 5分間 平衡시켰다.

耐凍劑를 제거한 후 세포의 生死判定은 3', 6'-directly fluourescence(GDA) 1mg 을 acteon 1ml에 녹인다음 이것을 PBS液에 600,000對1로 稀釋(pH 7.0~7.4)한 液에 受精卵을 넣고 常溫에서 3~5分 동안 培養한 後 FDA가 함유되어 있지 않은 PBS 液에 옮겨 位相差螢光顯微鏡(X200)에서 다음과 같은 score로 判定하였다.

P-5 : 受精卵의 分割球 全體가 綠色螢光을 強하게 發散하는 것(5點 : 100%)

P-3 : 受精卵 分割球中 50~90% 綠色螢光을 띠는 것(3點 : 60%)

P-1 : 50% 以下의 分割球가 綠色螢光을 發散하거나 또는 全般的인 分割球가 弱하게 螢光을 發하는 것(1點 : 20%)

N-0 : 綠色螢光이 전혀 띠지않고 어둡게 보이는 것.(0點 : 0%)

위와 같은 4段階 score로 區分하여 平均點數로 算出하였다.

III. 結果 및 考察

凍結液과 除去液에 sucrose 添加에 따른 液體室素 container에서 凍結後 FDA test에 의한 mouse 受精卵의 生存率을 比較한 것은 Table 1에 나타난 바와 같다.

凍結液에 PBS+glycerol, 除去液에는 sucrose만을 添加시킨 A 處理區(PG : S)는 P-5가 40.6%, P-3 : 28.9%, P-1 : 23.8%, 平均 score 3.0(60%)으로 모든 처리구중 第一 低調하였고, 同一한 凍結液에서 除去液을 달리한 B 處理區(PG : PS)에서는 P-5 : 41.7%, P-3 : 35%, N-0 : 14.6%를 나타내어 平均 score 3.2(64%)로서 다음 順位로 좋지 않은 生存率을 보여 주었으나 有意性은 없었다.

그리고 凍結液에 sucrose를 添加한 C 處理區(PG + S : S)의 生存率은 P-5 : 51.1%, P-3 : 26.8%, N-0 : 5.9%, 平均 score 3.4(68%)였으며 D 處理區(PGS : PS)에서는 P-5 : 50.6%, P-3 : 26.0%, N-0 : 12.1%를 나타내어 3.4(68%)의 score로서 同一한 成績을 보여주고 있다.(P>0.05).

P-5(FDA-test 評價)에서 가장 높은 生存率을 보여 준 것은 C와 D 處理區였고 낮은 生存率은 A 處理區이며 대체로 100% 生存率(P-5)은 全般的으로 낮은 數值였다.

Table 1. Effects of freezing and removing and removing media on mouse embryo survival evaluated by FDA-test

Treatment	Freezing medium	Removing medium	No. of embryos frozen	No. of survival embryos evaluated by FDA test				Score
				P-5 (%)	P-3 (%)	P-1 (%)	N-0 (%)	
A	PG	S	143	58 (40.6)	41 (28.7)	10 (6.9)	34 (23.8)	3.0
B	PG	PS	103	43 (41.7)	36 (35.0)	9 (8.7)	15 (14.6)	3.2
C	PGS	S	276	141 (51.1)	74 (26.8)	17 (6.2)	44 (15.9)	3.4
D	PGS	PS	389	197 (50.6)	101 (26.0)	44 (11.3)	47 (12.1)	3.4

PG:PBS+10% glycerol PGS:PBS+10% glycerol+10% sucrose S:10% sucross PS:PBS+10% sucrose

그리고 完全히 죽은 것으로 認定된 N-0 역시 凍結液에 sucrose를 添加하지 않은 A 處理區로서 凍結液과 除去液에 모두 sucrose가 添加된 D 處理區가 가장 낮은 數值(12.1%)을 보여주고 있다.

그러므로 受精卵 凍結液에 sucrose를 添加하여 predehydration 시킨 것이 實施하지 아니한 것보다

良好하였고, (P>0.05), glycerol 除去液에서도 sucrose 單用使用한 것보다 PS液(PBS+ sucrose)으로 平衡하였을 때 가장 좋은 것으로 나타났다.

前述한 成績의 結果는 Leibo(1984)가 bovine 受精卵을 利用하여 sucrose로 glycerol을 除去할 때 64%의 生存率과 Merry 等(1983)이 1.0M glycerol을

凍結液으로 사용, 1.0M sucrose 로 除去했을 때 60.5%의 生存率, 그리고 Chupin과 Procureor(1984)는 sucrose를 包含하고 있는 PBS를 除去液으로 60.7~74%의 生存率, Kasai 등이 보고한 64~70% 등과 이 실험의 P-5의 生存率만을 比較할 때는 50% 前後로 낮은 數值였으나 平均 score로 볼 때 類似한 生存率을 보여주고 있었다.

Schilling 등(1978, 1979)에 의하면 FDA-test에서 3~4等級(Brilliant, partly, weak, negative)으로 分類했을 때 Brilliant에서 85~90%, Partly: 16~21%, Weak: 20%의 몇세포기가 CO₂ 배양기에 培養했을 때 發育을 하였다고 보고하였기 때문에 本成績에서도 P-3와 P-1에 있어서도 충분히 發育할 가능성이 있는 것으로 볼 때 上記연구자와 거의 一致하는 傾向을 나타내었다.

그러나 Szell과 Shelton(1987)은 PBS에 5.0M glycerol, 5.0M sucrose를 添加하고 있는 凍結液을 高濃度로 하여 LN₂ vapour로 直接 急速凍結後 5.0M sucrose로 平衡하였을 때, mouse 受精卵에서 92~95%의 生存率을 報告하고 있으며, 凍結前 細胞内部의 自由水の 脫水가 卵子の 生存에 큰 影響을 미친다고 하였다. 그리고 凍結液과 耐凍劑 除去液에 모두 sucrose를 添加하였을 때 William과 Johnson(1985, 86)이 70~86% 生存率을, Chupin과 Re-

viers(1986)에 의한 57.5~96.4%의 報告等은 本成績에 比하여 優秀하였다.

結果적으로 耐凍劑의 除去液에만 sucrose를 添加시킨 것 보다는 凍結液이나 耐凍劑 除去液에 10% sucrose를 添加하면 滲透壓에 의한 충격防止와 細胞膜을 保護하여 mouse 受精卵의 生存率을 向上시킬 수 있다고 생각한다.

Table 2는 glycerol을 凍結液으로 使用할 때 凍結液과 除去液에 sucrose 添加與否에 따른 卵子發育 段階別 mouse 受精卵의 生存率의 結果이다. 凍結液을 PBS에 glycerol만을 첨가하고 耐凍劑의 除去液에 sucrose를 添加했을 때 桑實胚期가 平均 score 3.4(68%), 胞胚期는 2.7(54%)로 가장 低調하였다.

한편 PBS에 glycerol과 sucrose를 含有한 凍結液으로 凍結한 後, glycerol 除去를 sucrose로 實施하였을 때 胞胚期는 3.7(74%)의 score의 桑實胚期의 3.4(6.8%)보다 조금 優秀하였으며 sucrose를 含有하고 있는 PBS를 除去液으로 利用하였을 때는 桑實胚期가 3.9(78%)이며 胞胚期는 3.7(72%)의 score를 보여주고 있다.

이러한 實驗의 結果를 綜合하여 보면 대체로 桑實胚期가 胞胚期보다 優秀하였음을 보여주고 있다 (P<0.01)

Mouse 受精卵에서 Miyamoto 등(1986)은 桑實胚

Table 2. Effects of cryoprotectants by liquid nitrogen vapour on morula and blastocyst stages of mouse survival evaluated by FDA-test

Freezing medium	Removing medium	No. of embryos frozen		Morula stage				Score	Blasto cyst stage				Score
				P-5 (%)	P-3 (%)	P-1 (%)	N-0 (%)		P-5 (%)	P-3 (%)	P-1 (%)	N-0 (%)	
PG	S	24	65	13 (54.2)	5 (20.8)	1 (4.2)	5 (20.8)	3.4	22 (33.8)	24 (36.9)	7 (10.8)	12 (18.5)	2.9
PG	PS	33	42	22 (66.7)	9 (27.3)	0 (0)	2 (6.0)	4.2	10 (23.8)	18 (42.9)	8 (19.0)	6 (14.3)	2.7
PGS	S	122	138	61 (50.0)	32 (26.2)	11 (9.0)	18 (14.8)	3.4	73 (52.9)	42 (30.4)	21 (15.2)	2 (1.4)	3.7
PGS	PS	138	187	84 (60.9)	34 (24.6)	13 (9.4)	7 (5.1)	3.9	91 (48.7)	62 (33.2)	30 (16.0)	4 (2.1)	3.6

P PG: PBS+10% glycerol PGS: PBS+10% glycerol+10% sucrose S: 10% sucrose PS: PBS+10% sucrose

期에서 71~92%와 胞胚期の 27~61%, William과 Johnson(1986)이 凍結液과 除去液에 모두 sucrose를 添加하여 桑實胚期에서 80%, 胞胚期에서 72%의 生存率을 보고하고 있으며 本研究의 結果와 거의 一致하였다. 또 bovine 受精卵에서 Niemann(1985)은 glycerol만을 凍結液으로 使用하고 sucrose로 除去할때 桑實胚期에서 46.2%로서 胞胚期の54.2%보다 낮았고, Farrand等(1985)도 桑實胚期の 受胎率이 胞胚期보다 低調하였으므로 本 成績과 相反되었다. 그러나 William(1985), Leibo(1985), Kennedy等(1983)은 桑實胚期이 胞胚期보다 良好하였다고 報告하였다.

그리고 Kasai 等(1982)은 緩慢凍結하여 sucrose로 凍結液을 除去하였을 때 64~70%의 生存率과도 같은 傾向을 보이고 있다. 한편 最近에 Szell과 Shelton(1987)에 依하면 mouse의 8~16細胞期에서 高濃도의 5.0M glycerol 凍結液에 0.5M sucrose를 添加하였을 때 95%의 높은 生存率을 報告하고 있다.

이러한 것으로 볼때 卵子, 凍結液, 除去液, 處理過程, 凍結方法, 凍結前 卵子狀態등에 따라 生存率의 變化를 갖게 되므로 卵子 發育段階에 미치는 여러 가지 要因에 對한 研究가 더 遂行되어야 할 것으로 思料된다.

IV. 摘 要

本 實驗은 牛 受精卵 凍結課程의 簡易化 可能性 與否를 究明하기 爲하여 8週以上の ICR mouse를 使用하여 遂行되었다.

Glycerol 添加液과 除去液에 10% sucrose의 添加 與否에 따라 液體窒素 container에서 凍結한 mouse 受精卵의 生存率을 FDA-test로 相互 比較한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 液體窒素 container에서 凍結시킬 때 glycerol 添加液에 sucrose를 添加했을 때와 添加하지 않았을 때 FDA-test에 依한 平均 score는 各各 3.4와 3.0으로 sucrose를 添加한 것이 良好하였다.($P < 0.05$).
2. Glycerol 除去液으로 10% sucrose 單用區는 平均 score 3.2로 PBS+10% sucrose의 3.3과 差가

없었다.

3. 液體窒素 container에서 凍結할 때 桑實胚期の 卵子가 胞胚期の 卵子보다 有意性($P < 0.01$) 있게 生存率이 높았다. (3.6 : 3.1)
4. 結論的으로, glycerol 凍結液에는 10% sucrose 添加, glycerol 除去液에는 PBS에 sucrose를 添加하는 것이 有效하다고 생각된다.

III. 引用文獻

1. Bielanski, A. V. Schneider, V. P. Pawlyshyn, and R. J. Mapletoft. 1986. Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos in vitro ; The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. *Theriogenology*, 25 : 429~437.
2. Biltion, R. J. and N. W. Moor. 1976. Effect of ice seeding and of freezing and thawing rate on the development of sheep embryos stored at -196°C . *Theriogenology*, 6 : 635(abstr).
3. Biltonn, R. J. and N. W. Moor. 1976. Successful transfort of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. *J. Repord. Fert.* 50 : 363~364.
4. Bouysson, B. and D. Chupin. 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethyl sulfoxide(DMSO) or glycerol. *Theriogenology*, 17 : 159~166.
5. Chupin, D. and R. Procureor. 1984. Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts ; Effect of number of steps and of total duration. *Theriogenology*, 21 : 230 Abstr.
6. Chupin, D. and M. M. De reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26 : 157~166.
7. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly, *J. Repord. Fert.*, 59 : 51~56.
8. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1982. Survi-

- val of rat embryos after freezing J. Reprod. Fert., 66 : 367~370.
9. Leibo, S. P. 1983. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. *Cryo-Letters.*, 4 : 387~400.
 10. Leibo, S. P. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21 : 767~790.
 11. Leibo, S. P. 1985. A one-step in situ dilution frozen-thawed bovine embryos. *Anupdate Theriogenology*, 23 : 201.
 12. Leibo, S. P. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. In : Daniel, J. O. Jr. (ed). *Methods in Mammalian Reproduction*. Academic Press New York : 179~197.
 13. Leibo, S. P. Mazur, and S. C. Jackowski. 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exptl. Cell. Res.*, 89 : 79~99.
 14. 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 concentrations. *Theriogenology*, 20 : 325~332.
 15. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fert.*, 50 : 373~375.
 16. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1978. The protective action of glycerols against freezing damage of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 54 : 427~432.
 17. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1979. Effects of low temperatures on survival of frozen-thawed mouse embryos. *Experientia*, 35 : Birkhauser Verlag, Basel(Schweiz), 1505~1506.
 18. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. *J. Exptl. Zool.*, 220 : 123~127.
 19. 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.
 20. Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos ; Effects of a one-stop addition of 1.4M glycerol. *Theriogenology*, 23 : 369~379.
 21. Parkening, T. A., Y. Tsunoda. and M.C. Chang. 1976. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Exp. Zool.*, 197 : 369~374.
 22. Rall, W. F. and C. Polge. 1984. Effect of warm rate on mouse embryos frozen thawed in glycerol. *J. Reprod. Fert.*, 7 : 185~292.
 23. Renard, J. P., Heyman, Y. and De Mesnil Du Buisson, F. 1977. Unilateral and bilateral cervical transfer of bovine embryos at the blastocyst stage. *Theriogenology*, 7 : 189~191.
 24. 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.
 25. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 699~703.
 26. Szell, A. and J. N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol sucrose solutions on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 80 : 309~316.
 27. Whittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 178 : 411~414.
 28. Whittingham, D. G. 1975. 1972. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.*, 43 : 575~578.
 29. Whittingham, D. G. and C. E. Adams. 1976. Low temperature preservation of rabbit embr-

- yos. J. Reprod. Fert., 47 : 269~274.
30. Whittingham, D. G., M. Wood, J. Farrant, H. Lee, and J. A. Ealsey. 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C . J. Reprod. Fert., 56 : 11~21
31. Whittingham, T. J. and S. E. Johnson. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. Theriogenology, 23 : 235.
32. Whittingham, T. J. and S. E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. Theriogenology, 26 : 125~133.
33. Wilmut, U. 1972. The effects of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Sci., 11 : 1071~1079.
34. Wood, M. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. Cryobiology, 17 : 178~180.
35. 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.
36. 豊田裕, 竹島勉. 1978. 体外受精由来マウス胚の凍結保存. 家畜繁殖誌 24 : 34~35.
37. 浦野造司, 高橋芳幸, 金川弘司. 1986. 凍結融解後のマウス胚生存性に及ぼす各種凍結保護剤の効果. 家畜繁殖誌 32 : 130~132.
38. 角田幸生, 相馬正, 杉泊信. 1978. 家畜受精卵の長期保存. 家畜繁殖誌 24 : 157~160.