

# 肉牛受精卵簡易凍結 및 融解方法에 關한 研究\*

第Ⅲ報：液體窒素 container에서凍結時 諸種氷方法이  
mouse 受精卵의 生存率에 미치는 影響

金重桂·李揆勳·姜萬種·金瑩勳·康珉秀·金承浩

## Studies on Simplified Procedures for Freezing and Thawing of Bovine Embryos

Ⅲ. Effects of seeding procedures in a liquid nitrogen container on the survival rate of mouse embryos

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

### Summary

This study was done with mouse embryos to determine effects of the freezing media with with-out 10% sucrose, and seeding methods (pincette, no seeding, liquid nitrogen gas phase and copper wire coiled straw) on embryo survival were determined using the FDA test.

The summarized results are the following.

1. The FDA score found with copper wire coiled straw, no seeding, pincette and liquid nitrogen gas phase was 3.6, 3.6, 3.3 and 3.0 respectively. There were no significant differences.
2. The embryo score shows higher ( $P < 0.05$ ) survival rate using a freezing medium with sucrose than the one without it. Among the seeding procedures, better results are copper wire coiled straw and no seeded.
3. The results suggest that copper wire coiled seeding and no seeding are as good as seeding when the mouse embryos were frozen in a liquid nitrogen container using both the freezing and dilution media containing 10% sucrose.

---

濟州大學校 農科大學 (College of Agriculture, Cheju National University)

\* 本 研究는 1986 년도 韓國科學財團의 지원에 의하여 수행되었으며 韓國家畜繁殖學會誌 12(2): 65~71 (1988)에 掲載되었음.

## 序 論

受精卵의 凍結過程에 있어서 植水 (seeding)은 Whittingham等(1972)이 mouse 受精卵 凍結에서 最初로 利用하였으며, 卵子는 精子和 달리 분할후 세포수와 水分含量이 많고 特殊한 膜構造(透明帶)를 갖고 있기 때문에 植水하지 않으면 過冷却으로부터 세포질內에 氷晶이 形成되어서 急速한 溫度上昇(潛在熱 發生)이 생겨 세포질에 物理的 衝擊을 주게 되어 傷害를 입게 되므로 卵子凍結時 植水은 꼭 施行하여야 하는 것이다.

또한 Leibo와 Mazur(1978)는 植水을 하므로서  $-5 \sim -15^{\circ}\text{C}$ 에서 細胞에 害를 주는 過冷却을 짧게 하고 straw 內 永結晶을 強制로 形成시키는 것으로 過冷却中 脫水가 유발되어 液狀에서 固體로 轉換될 때 潛在熱 發散에 의한 sample의 溫度上昇(plateau)의 發生을 防止한다고 보고하였다.

植水方法은 Elsdén과 Seidel(1982)以後, 주로 cooled forcep으로 遂行되어 왔으며, Kasai等(1980)은  $-7^{\circ}\text{C}$ 에서 液體窒素 gas로, Kasai等(1984)은 dry ice로, Massip等(1982)과 Nieman等(1985)은 液體窒素를 bowling하면서 Miyamoto等(1986)은 ice crystal로, Suzuki等(1985)은 seeding chamber를 별도로 만들어 cooled forcep으로 各各 植水을 試圖하였다.

그러나 Bui-Xuan-Nguyen等(1984)은 凍結用液에 sucrose를 添加하면 受精卵이 凍結하기 전에 脫水되기 때문에 植水하지 않고 急速凍結하더라도 受精卵의 높은 生存率을 얻을 수 있다고 하였고, 이외에도 여러 研究가 이루어지고 있다 (Krag等, 1985; Williams, 1983).

本 研究는 以前에 發表된(第Ⅳ報) 家兔 受精卵에서 얻은 結果를 再確認하기 爲하여 10% sucrose를 凍結用液에 添加할 때 植水하지 않은 것, pincette 植水, 液體窒素蒸氣 植水 그리고 銅線을 straw에 감고 植水을 誘導하는 方法 등으로 區分하였으며 液體窒素 container에서 凍結速度別로 凍結한 後 融解 即時 FDA-test로 生存率을 比較하여 大家畜 受精卵 凍結에 利用하고자 實施하였다.

## 材料 및 方法

供試動物은 ICR 계 mouse를 利用하였으며 飼養管理는 配合飼料를 自由給食하였다.

過排卵誘起를 爲하여 PMSG (5~10 IU)를 腹腔內에 注射하고, 48 時間後 同量의 HCG를 同一한 方法으로 注射한 다음 同一系統의 雄性 mouse를 合畵하여 自然交尾를 誘導하였으며 翌日 아침 陰腔에서 陰栓(coital plug)을 確認하여, 陰栓이 確認되지 않은 個體는 本 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, 子宮 및 卵管을 體外로 摘出하고 1 ml 注射器를 利用하여 灌流液을 子宮의 한쪽 끝에서 注入하여 watching glass內로 回收하였다.

이 때 使用된 灌流液은 m-PBS로 使用前에 0.2  $\mu\text{m}$  millipor filter로 濾過시켜 無菌 處理하였다.

採卵된 受精卵은 40倍 實體顯微鏡下에서 形態의 優秀한 卵子를 選別하여 新鮮 PBS로 2~3回 洗滌한 後 試驗에 利用하였으며 未受精卵 및 異常卵은 試驗對象에서 除外시켰다.

卵子凍結用液은 10% glycerol 10% sucrose와 非働化시킨 20% donor serum을 含有하고 있는 PBS와 10% sucrose를 除外한 10% glycerol과 20% donor serum을 添加한 PBS를 利用하였다.

Glycerol 添加는 Leibo(1984)가 使用한 方法과 同一한 方法으로 卵子를 直接 凍結用液에 옮겨 平衡하는 one-step으로 添加한 후 0.25 ml plastic straw에 氣泡(air bubble)를 2個所 만들어 그 사이에 受精卵을 注入한 後 straw powder로 封印하였다 (第6報; Fig. 1).

封印된 straw를 곧바로 液體窒素(LN<sub>2</sub>) container로 옮겨 凍結을 實施하였으며 溫度確認은 自動細胞 凍結器(R-204 cell freezer, planer products England)의 sensor에 凍結液으로 채운 0.5 ml straw를 끼워서 固定後 使用하여 auto recorder로 溫度確認을 하였다.

凍結速度는 다음과 같이 4가지로 區分하여 實施하였다.

1-F; 常溫에서 -7℃까지는 1℃/min 下降시킨 후 植水 (seeding) 하고, 5분 동안 定置한 다음 -35℃까지는 0.3℃/min씩 下降하여 LN<sub>2</sub> container에 浸漬保存하였다.

2-F; 植水 後 5分 定置까지는 "1-F"와 같고 -35℃까지는 3℃/min 下降시킨 다음 -80℃까지는 5℃/min씩 凍結하여 液體窒素에 浸漬保存하였다.

3-F; 植水 後 5分 定置까지는 "1-F"와 같고 -80℃까지는 15℃/min씩 凍結하여 液體窒素에 浸漬保存하였다.

4-F; 植水 後 5分間 定置까지는 "1-F"와 같고 즉시 液體窒素 表面 3~5mm까지 下降시켜 5分間 定置시켰다가 -196℃에 浸漬시켰다.

植水方法은 p-seeding (핀셋植水), N-seeding (植水 아니한 것), LN<sub>2</sub>-seeding (液體窒素 蒸氣 植水), co-seeding (銅線植水)으로 區分하여 實施하였는데 P-seeding은 pincette로 受精卵이 들어 있는 straw 上位部를 接觸시켜 氷結晶이 나타날때까지 實施하였으며 (Elsden 과 Seidel, 1982), LN<sub>2</sub>-seeding은 -7℃일 때 液體窒素 表面의 上面 2~5mm까지 瞬間적으로 下降시켰다 올렸으며 이 때 下降溫度는 約 -12℃ 前後 (sensor 溫度) 되도록 하였다.

Co-seeding은 1mm銅線을 straw 밑에서부터 5mm間隔으로 윗부분까지 감아서 -7℃일 때 LN<sub>2</sub> seeding과 同一한 方法으로 植水을 試圖하였다.

受精卵의 融解는 38℃ 水槽에서 straw를 천천히 흔들어 氷結晶이 사라질 때까지 實施하였는데 所要 時間은 約 10秒 程度였다.

Glycerol 除去는 添加方法과 同一한 one-step 方法으로 glycerol 除去用液 (PBS+10% sucrose)에 直接 옮겨 5分間 平衡시켜 glycerol을 除去하였다.

受精卵의 生死判定은 Schilling等(1982)의 方法으로 FDA (3',6'-diacetyl fluorescence)를 利用하여 第5報와 同一한 方法으로 判定하였다.

## 結果 및 考察

10% sucrose를 添加한 後 LN<sub>2</sub> container에서 凍結速度와 여러가지 植水方法에 따른 mouse 受精卵의 生存率을 FDA-test에 依하여 比較한 成績은 Table 1과 같다.

1-F (緩慢凍結)에서 FDA score는 N-seeding이 平均 3.8(76%), P-seeding; 3.8(76%), LN<sub>2</sub>-seeding; 3.7(74%)이며 Co-seeding은 3.9(78%)로 1-F에서 가장 좋은 成績이며 N-seeding과 P-seeding은 同一한 成績을 나타내고 있다.

그리고 2-F (急緩慢凍結)에서는 N-seeding, P-seeding, LN<sub>2</sub>-seeding, Co-seeding이 各各 2.9, 2.9(58%), 3.1, 3.1(62%)로 他 凍結보다 低調한 成績을 보여주고 있으며, 3-F (急速凍結)에서는 N-seeding; 3.7(74%), P-seeding; 3.4(68%), Co-seeding; 3.9(78%)로 Co-seeding이 가장 좋은 成績을 나타내고 있으며 P-seeding과 LN<sub>2</sub>-seeding은 同一한 數値를 보여주고 있다.

4-F (超急速凍結)는 N-seeding; 3.3(66%), P-seeding; 3.2(64%), LN<sub>2</sub>-seeding; 2.4(48%)이며 Co-seeding은 4.0(80%)으로 가장 優秀하였고 LN<sub>2</sub>-seeding은 가장 不良한 成績이었다.

이러한 結果에 있어서 Co-seeding이 各 凍結處理에서 대체로 優秀하지만 實驗卵子數가 적으므로 再檢討가 必要하다.

여기서 銅線植水은 液體窒素 上面에서 溫度傳達이 빨라서 全體 straw에 均一하게 急冷却되어 自然植水된 것으로 생각된다. 그리고 P-seeding에서는 seeding하기 爲하여 straw를 空氣中에 露出시켜야하므로 sample의 溫度上昇 때문에 成績이 低調한 것으로 思料된다.

한편 LN<sub>2</sub>-seeding에서 가장 낮은 數値를 보인 것은 植水을 하기 爲해서 container로 下降시킬 때 간혹 液體窒素에 straw가 瞬間적으로 接觸하면서 溫度下降이 -15℃ 以下로 떨어지는 境遇 受精卵 生存率 低下를 나타낸 理由로 들 수 있다.

Table 2는 凍結用液에 sucrose를 添加한 것 (PGS)과 添加하지 않은 것 (PG)으로 區分하여

**Table 1. Effects of seeding procedures according to freezing procedures by LN<sub>2</sub> container on mouse embryo survival evaluated by FDA-test**

Freezing procedure	Methods of seeding	No. of embryos frozen	No. and(%) of survival embryos evaluated by FDA-test				Score
			P-5	P-3	P-1	N-0	
1-F <sup>a</sup>	N-S	70	41(58.6)	18(25.7)	8(11.4)	3(4.3)	3.8
	P-S	78	49(62.8)	16(20.5)	5(6.4)	8(10.3)	3.8
	LN <sub>2</sub> -S	39	24(61.5)	7(17.9)	4(10.3)	4(10.3)	3.7
	Co-S	32	22(68.8)	3(9.4)	7(21.9)	0(0.0)	3.9
2-F <sup>b</sup>	N-S	76	34(44.7)	14(18.4)	8(10.5)	20(26.3)	2.9
	P-S	84	31(36.9)	25(29.8)	5(6.0)	23(27.4)	2.9
	LN <sub>2</sub> -S	94	38(40.4)	23(24.5)	7(7.4)	26(27.7)	3.1
	Co-S	51	23(45.1)	13(25.5)	5(9.8)	10(19.6)	3.1
3-F <sup>c</sup>	N-S	100	55(55)	30(30)	0(0)	15(15)	3.7
	P-S	73	29(39.7)	34(46.6)	1(1.4)	9(12.3)	3.4
	LN <sub>2</sub> -S	30	15(50)	7(23.3)	5(16.7)	3(10)	3.4
	Co-S	28	15(53.6)	10(35.7)	3(10.7)	0(0)	3.9
4-F <sup>d</sup>	N-S	65	32(49.2)	14(21.5)	12(18.5)	7(10.8)	3.3
	P-S	70	27(38.6)	29(41.4)	5(7.1)	9(12.9)	3.2
	LN <sub>2</sub> -S	28	5(17.9)	11(39.3)	8(28.6)	4(14.3)	2.4
	Co-S	21	15(71.4)	1(4.3)	0(0)	3(14.3)	4.0

\* a; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5min seeding → -35°C (0.3°C/min) → -196°C

b; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5min seeding → -35°C (3°C/min) → -80°C (5°C/min) → -196°C

c; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5min seeding → -80°C (15°C/min) → -196°C

d; Room temp. → -7°C (1°C/min) 5min seeding → Rapid freezing by LN<sub>2</sub> vapour for 5min → -196°C

N-S; Non-seeded, P-S; Pincette-seeded, LN<sub>2</sub>-S; Liquid nitrogen seeded, Co-S; Copper wire seeded

**Table 2. Effects of freezing media according to seeding procedures on mouse embryo survival evaluated by FDA**

Method of seeding	Freezing medium	No. of embryos frozen	No. and(%) of survival evaluated by FDA-test				Score
			P-5	P-3	P-1	N-0	
N-S	PG	83	36(43.4)	19(22.9)	10(12.0)	18(21.7)	3.0
	PGS	223	126(56.5)	57(25.6)	18(8.1)	22(9.9)	3.8
P-S	PG	92	37(40.2)	37(40.2)	3(3.3)	15(16.3)	3.3
	PGS	207	93(44.9)	65(31.4)	15(7.2)	34(16.4)	3.3
LN <sub>2</sub> -S	PG	46	19(41.3)	13(28.3)	4(8.7)	10(21.7)	3.0
	PGS	137	59(43.1)	32(23.4)	19(13.9)	27(19.7)	3.0
Co-S	PG	39	13(33.3)	14(35.9)	6(15.4)	6(15.4)	2.9
	PGS	87	55(63.2)	18(20.7)	10(11.5)	4(4.6)	3.9

PG; PBS + 10% glycerol PGS; PBS + 10% glycerol + 10% sucrose

N-S; Not seeded, P-S; Pincette seeded, LN<sub>2</sub>-S; Liquid nitrogen vapour seeded, Co-S; Copper wire seeded

植水方法에 따라 FDA-test 로 mouse 受精卵의 生存率을 比較한 것으로서 N-seeding에 있어서는 PG가 平均 score 3.0(60%)으로 PGS의 3.8(76%)보다 低調한 成績을, P-seeding은 PG와 PGS가 同一하게 3.3(66%)의 score를 보여주고 있다.

또한 LN<sub>2</sub>-seeding에 있어서는 PG와 PGS가 同一한 3.0(60%)의 score를 提示하고 있으나 Co-seeding에서는 PG가 2.9(58%), PGS 3.9(78%)로 sucrose를 添加한 것이 優秀한 成績을 보여주고 있다 (P<0.05).

本 成績을 相互 比較하여 보면 sucrose를 添加하지 않았을 境遇는 P-seeding이 N-seeding, LN<sub>2</sub>-seeding, Co-seeding보다 優秀하였으며, sucrose를 添加할 境遇에 있어서는 seeding을 하지 않아도 他 植水方法보다 優秀하였고 特히 Co-seeding이 良好하였다.

그러므로 LN<sub>2</sub> container에서는 sucrose를 添加함으로써 植水을 하지 않아도 mouse凍結卵 生存率에는 큰 關係가 없는 것을 보여주었다.

여러가지 植水方法을 綜合적으로 分析한 것은 Table 3에서 보여주는 바와 같이 N-seeding은 P-5가 54.2%, P-3; 25.1%이며 N-0; 10.5%로 平均 3.6(72%)의 score를 나타내고 있으며, P-seeding에 있어서 P-5가 44.6%, P-3; 33.5%, N-0; 16.8%로 平均 score 3.3(66%)을 보여주고 있다. 한편 LN<sub>2</sub>-seeding은 P-5가 42.9%, P-3; 25.1%, N-0; 19.4%의 生存率을 보여 score 3.1(61%)의 가장 不良한 成績을 보이고 있다.

그리고 Co-seeding에서는 P-5가 56.0%로 P-3가 23.0%, N-0; 9.5%로 平均 score 3.6(72%)로 가장 優秀하였으나 處理別 有意성이 없었다.

여기서 N-seeding이 P-seeding보다 良好한 것은 家兎(第4報)에서도 같은 結果를 提示하여 주었는데 sucrose 添加의 原因도 있겠으나 植水方法中 straw 氣泡(air bubble) 2個가 存在하여 이 곳이 먼저 冷却되어 液狀部에 傳達되므로 自然植水이 된 것이 아닌가 思料되며 이것은 앞으로 더 試驗이 施行되어야 할 課題인 것이다.

本 研究를 綜合적으로 考察하여 보면 Whittingham(1972)이 mouse에서 -3.5 ~ -4.5℃ 사이에 植水하여 좋은 成績이 얻어진 以後 必히 遂行하여야 되는 것으로 認識되어 이제까지 大部分 Elsdon과 Seidel(1980)의 方法인 cooled forcep으로 植水되어 왔다.

그러나 이러한 過程은 複雜하고, 自動式이 아닐 때는 항상 空氣에 露出시켜야 하므로 잘못 施行하였을 때는 오히려 sample의 溫度上昇을 誘導시킬 可能性이 있다고 井上等(1982)이 보고하였다.

Leibo와 Mazur(1978)에 따르면 植水을 하므로서 氷結晶을 誘導시켜 過冷却 期間을 짧게 하고 sample 溫度上昇(plateau)의 被害를 막을 수 있다고 하였다.

그리고 Massip等(1980)이 耐凍劑에 sucrose를 添加시킨 이후 Miyamoto와 Ishibashi(1983)는 mouse 受精卵에서 dry ice로 凍結한 境遇 seeding하지 아니하였을 때 언제 氷晶核이 發生하는

Table 3. Effects of seeding procedures on mouse embryo survival evaluated by FDA-test

Method of seeding	No. of embryos frozen	No. and(%) of survival embryos evaluated by FDA-test				Score
		P-5	P-3	P-1	N-0	
N-S	275	149(54.2)	69(25.1)	28(10.2)	29(10.5)	3.6
P-S	316	141(44.6)	106(33.5)	16( 5.1)	53(16.8)	3.3
LN <sub>2</sub> -S	191	82(42.9)	48(25.1)	24(12.6)	37(19.4)	3.1
Co-S	116	64(56.0)	27(23.3)	13(11.2)	11( 9.5)	3.6

N-S; Not seeded. P-S; Pincette seeded.

LN<sub>2</sub>-S; Liquid nitrogen vapour seeded. Co-S; Copper wire seeded.

지는 試驗하지 아니하였지만 one-step addition (glycerol)에서는 植水을 하지 않는 것이 좋지 아니하였으나 stepwise 方法으로 漸次 glycerol을 添加했을 때는 植水을 하지 않을 때가 성적이 향상되었다는 보고와 本成績과 一致하였으며, 1986年度에는 LN<sub>2</sub> gas로 凍結할 境遇 seeded와 not seeded區와는 耐凍劑 平衡時間이 5分 以後부터는 거의 差異가 없이 (glycerol 2.0 M일 때) 80~85%로 높은 生存率을 보고하고 있다.

Krag 등(1985)은 murine 受精卵에서 그리고 Miyamoto 등(1986)도 mouse 受精卵을 얼음(水)으로 植水할 때 生存率이 73~82%, 植水하지 않은 것이 57~61%로서 本成績과 相反되는 傾向이 나타났다. 그리고 Bui-Xuan-Nguyen 등(1984)은 bovine 受精卵에서 sucrose를 添加하여 植水하지 않고 81.8%의 生存率을, 그리고 William과 Johnson(1986)도 mouse 受精卵으로 80% 前後의 生存率을 얻음으로써 거의 一致하고 있다.

그러나 Szell과 Shelton(1986a, 1986b, 1987)의 90% 前後의 生存率보다는 低調한 成績이었다.

그러므로 前述한 바와 같이 10% sucrose를 添加할 때 植水하지 않아도 된다는 것을 本研究의 結果에서 再立證되고 있다. 그런데 動物種類에 따른 受精卵 크기, 耐凍劑의 種類 및 濃度, 卵子發育 段階, 凍結速度와 凍結器具, 植水方法 등에 依해서 많은 變異가 있는 것으로 思料되어 繼續 究明이 必要하며 大家畜, 特히 牛와 受精卵 凍結에 應用하여 繼續 試驗을 갖고자 한다.

## 摘 要

Sucrose를 凍結液과 除去液에 添加하여 液體窒素(LN<sub>2</sub>) container에서 凍結할 때, 植水하지 않은 것, pincette로 植水, 液體窒素 蒸氣로 植水, 구리줄로 straw를 감아서 植水한 것 등으로 區分하여 凍結速度에 따라 FDA test로 生存率을 比較한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Sucrose 添加와 함께 LN<sub>2</sub> container에서 凍結時, 植水方法에 따른 FDA test의 score는 Co-S(구리선 감은 것) 3.6, N-S(植水하지 아니

한 것) 3.6, P-S(pincette 植水) 3.3 그리고 LN<sub>2</sub>-S(LN<sub>2</sub> gas 植水) 3.0 順位였다 (P) 0.05).

2. 凍結液에 sucrose 添加가 添加하지 아니한 것보다 生存率이 높았으며 가장 좋은 것은 sucrose를 添加한 Co-S(3.90)와 N-S(3.8)였다.

3. 結果적으로, sucrose 添加시킨 耐凍劑에서 LN<sub>2</sub> container에 凍結시킬 때 구리선 감은 植水과 植水하지 않은 것이 pincette seeding과 같은 成績을 보여주어 植水하지 않아도 된다는 것을 提示하여 주었다.

## 引用文獻

1. Bui-Kuan-Nguyen, N., Y. Heyman and J. P. Renard. 1984. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. *Theriogenology*, 22: 389-400.
2. Chupin, D. and M. M. De Reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26: 157-166.
3. Elsdon, R. P., Seidel, G. E. Jr., T. Taketa and G. D. Farrand. 1982. Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology*, 17: 1-10.
4. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59: 51-56.
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. Krag, K. T., I. M. Koehler and R. W. Wright, Jr. 1985. Trehalose: A non-permeable cryoprotectant for direct freezing of early stage murine embryos. *Theriogenology*, 23: 200.
7. Leibo, S. P. and P. Mazur. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel, J. C. Jr. (ed). *Methods in Mammalian Reproduction*, Academic Press, New York; 179-197.

8. Massip, A., Vander Zwalmen, P., Hanzen, C. and F. Ectors. 1982. Fast freezing of cow embryos in French straws with an automatic program. *Theriogenology*, 18: 325-332.
9. 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.
10. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Solid CO<sub>2</sub> Freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 67: 107-111.
11. 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. Sci.*, 57: 250-256.
12. Nieman, H. 1985. Freezing of bovine embryos; effects of a one-step addition of 1.4M glycerol. *Theriogenology*, 23: 369-379.
13. Leibo, S.P. 1984. Osmotic responses of bovine embryos in solutions of sucrose, glycerol or glycerol-sucrose. *Gryobiology*, 21: 711.
14. Schilling, E., H. Nieman and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Gryobiology*, 15: 245-248.
15. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986a. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76: 401-408.
16. Szell, A. and J.N. Shelton. 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78: 699-703.
17. Szell, A. and J.N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80: 309-316.
18. 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.
19. Williams, T. J. and S. E. Johnson. 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23: 235.
20. Williams, T.J. and S. E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 26: 125-133.
21. 井上忠恕, 吉田光, 金川弘司, 坂尾伸夫, 倉岡泰郎. 1982. 受精卵凍結装置の開発とウシ受精卵への應用. *家畜繁殖誌*, 28: 150~152.