

생쥐 2-세포기 수정란의 초급속동결

강만중 · 이철상 · 한용만 · 유대열 · 이경광
한국과학기술연구원 유전공학연구소

Ultrarapid Freezing of Mouse 2-Cell Embryos

Kang, Man-Jong, Chul-Sang Lee, Yong-Mahn Han,
Dae-Yeul Yu and Kyung-Kwang Lee
Genetic Engineering Research Institute, KIST

Summary

This study was carried out in order to investigate effects of cryoprotectant concentration and equilibration time on survival of ultrarapidly frozen 2-cell mouse embryos. Mouse 2-cell embryos, following dehydration by exposure to DMSO and sucrose, were directly immersed into liquid nitrogen and thawed in 37°C water. Viability was defined by development rate to the blastocyst stage after in vitro culture for 72 hours.

The results are summarized as follows ;

1. When 0.25M of sucrose was added into the freezing medium at various concentrations of DMSO and dilution medium, higher development rate of embryo was obtained in 3.0M DMSO concentrations (82.6%).

However, When sucrose concentrations of 0.25 and 0.5M were added to the freezing medium with 3.0M DMSO and dilution medium, development rate of embryos were 81.7% and 24.1%, respectively.

2. In the equilibration time at room temperature, higher development rate was attained after short period of time(2.5min) in 3.0M DMSO + 0.25M sucrose(85.9%).

3. The development rate of embryos at in vitro 2-cell, in vivo 2-cell, solution control and untreated control was 84.6%, 90.9%, 89.9%, and 89.7%, respectively.

I. 서 론

수정란 동결은 1972년 Whittingham이 생쥐 수정란을 -196°C에 동결, 융해한 후 이식하여 산자를 얻은 다음부터 많은 연구가 수행 되어 왔다. 포유동물 수정란의 동결에 있어서 초기에는 완만 동결방법(Mazur, 1977 ; Miyamoto

와 Ishibash, 1979)으로 실시 되어 왔으나 최근에는 고농도의 동결액을 사용하여 동결전 수정란내의 수분을 탈수시킨 상태에서 실시하는 초급속 동결에 대한 연구가 진행되고 있다(Szell과 Shelton, 1986 a, b, 1987 ; Roll et al., 1987 ; Trounson et al., 1987 ; Nakagata, 1989).

초급속 동결방법은, 완만 동결시에 필요 불

가결한 고가의 장비(cell freezer)가 불필요하고, 또한 많은 시간과 다량의 액체질소등을 최대한으로 절약함은 물론 완만동결시보다 훨씬 간편하게 액체질소 container내에서 동결을 실시할 수 있다. 초급속 동결방법에는 각종 내동제를 혼합하여 세포 내외에 빙정을 방지시키는 vitrification방법(Roll과 Fash, 1985; Nakagata, 1989)과 세포 내외를 각각 보호하는 두가지 내동제를 이용하여 동결전 세포 내부의 수분을 탈수시키는 방법(Takahashi와 Kanagawa, 1985; Chupin과 Reviere, 1986; Szell과 Shelton, 1986 a, b, 1987, Wilton et al, 1989)으로 구분 할 수 있으나 vitrification방법은 동결액내에 약 50%의 내동제가 첨가되기 때문에 내동제의 독성을 줄이기 위하여 5°C에서 조작을 해야 하는 단점이 있다.

이러한 초급속 동결방법을 생쥐 수정란에 적용한 경우 8세포기 수정란 또는 상실배에서는 좋은 결과를 얻고 있으나 2세포기 수정란에서는 상실배보다 저조할 뿐만 아니라 불규칙한 성적을 보이고 있다(Kono와 Tsunoda, 1987; Friedle et al, 1987; Trounson et al., 1987). 이러한 결과는 2세포기 수정란의 경우 막투과성과 활성화에너지가 상실배와는 다르기 때문이며(Critser et al., 1988), 오늘날 2세포기 수정란의 동결에는 주로 완만 동결방법이 실시되고 있는 실정이다(Ng et al., 1988; Critser et al., 1988; 백 등, 1989).

따라서 본 연구에서는 2세포기 수정란의 초급속 동결에 있어 양호한 성적을 얻을수 있는 최적의 조건을 확립할 목적으로 우선 2세포기 수정란의 초급속 동결시 내동제의 농도와 평형 시간의 변화에 따른 영향을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 다배란 유기 및 수정란 준비

공시동물은 유전공학연구소 생물검정실로부터 분양받은 교잡종 생쥐(C57BL/6 CBA)를 사용하였다. 다배란 유기를 위하여 PMSG(제국장기, 일본)와 HCG(sigma, USA)를 48시간 간격으로 각각 5IU씩 복강내에 주사한 다음, 동일계통의 웅성 생쥐와 1:1로 합사시켜 자연교미를 유도 하였으며, 다음날 아침 질전이 확인된 개체만을 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 2세포기 수정란은 체외배양하여 얻은것(이하 in vitro 2세포기 수정란)과 체내 발달시킨것(이하 in vivo 2세포기 수정란)으로 나누었으며, in vitro 2세포기 수정란의 준비는 HCG 주사후 18~19시간에 난관으로부터 회수한 1세포기 수정란을 hyaluronidase (300 unit/mi, sigm, USA)용액에서 3분간 처리하여 난구세포를 제거 하였다. 난구세포가 제거된 수정란을 신선한 PBS(modified Dulbecco's phosphate buffered saline)로 5회 세척한 후 M16 배양액에서 24시간 체외배양하여 정상적인 2세포기 수정란으로 발달한 수정란만을 선별, 실험에 사용하였다. 그리고 in vivo 2세포기 수정란은 HCG주사후 42~43시간에 난관으로부터 회수하였다.

2. 수정란 동결

수정란 동결은 다음과 같이 구분 하여 실시하였다.

실험 I : 실험 I은 DMSO의 농도 변화가 수정란의 동결 용해후 체외 발달에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 동결액을 3.0, 3.5, 4.0M DMSO + 0.25M sucrose + 20% FCS + PBS의 조성으로 제조하였다.

준비된 in vitro 2세포기 수정란을 0.25ml straw에 주입되어 있는 동결액(그림1 참조)에 5분간 평형 시킨후 액체질소에 바로 침지하므로써 초급속 동결을 실시하였다.

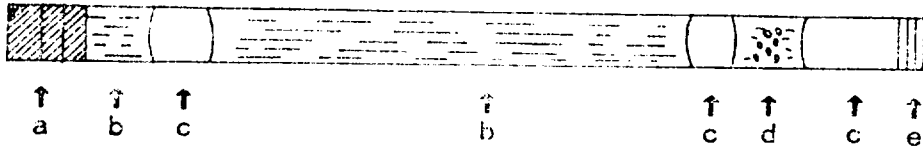


Figure 1. Diagrammatic representation of 0.25ml straw loaded with freezing and dilution medium for the one-step dilution procedure.

- a) cotton plug b) dilution medium c) air bubble
- d) freezing medium and embryos e) straw powder plug

동결후 1일 내지 1주일동안 보존된 수정란의 융해는 straw를 실온에 40초간 방치후 37°C온수에서 30초간 천천히 흔들여 실시하였다. 융해후 내동제를 제거하기 위하여 straw의 powder plug부위를 엄지와 검지로 잡고 흔들여 straw내의 희석액(0.25M sucrose+PBS)과 수정란이 들어있는 동결액을 섞어 10분간 방치하였다. 내동제가 제거된 수정란은 신선한 PBS로 3회 세척한 다음 5분간 PBS에 방치한 후 M16배양액에서 72시간 동안 배양하면서 배반포기 배로의 발달상태를 관찰하였다.

실험 II : 동결액과 희석액에 첨가된 sucrose 농도가 수정란의 동결융해후 발달에 미치는 영향을 검토하기 위하여 실험 I에서 선정된 동결액(3.0M DMSO)에 0.25M과 0.5M sucrose를 첨가하여 실험 I과 같은 방법에 따라 동결을 행하였다.

실험 III : 3.0M DMSO, 0.25M sucrose, 20% FCS가 첨가된 PBS를 동결액으로 이용할 때 수정란 평형시간이 수정란의 동결 융해후 발달에 미치는 영향을 확인하고자 평형 시간을 2, 5, 5, 10분으로 구분하여 전술한 방법과 동일하게 동결을 실시하였다.

실험 IV : 실험 I, II, III에서 선정된 실험 방법에 따라 in vitro 2세포기 수정란과 in vivo 2세포기 수정란을 동결하여 체외 배양이 수정란 동결에 미치는 영향을 확인하였다. 그리고 동결액의 독성 여부를 규명하기 위하여 in vitro 2세포기 수정란을 동결액에 평형시킨후 동결을 하지않고 바로 희석액으로 옮겨 내동제를 제거한 다음 72시간 동안 배양 하였으며(solution

control), in vitro 2세포기 수정란을 control로서 타처리구와 동일한 배양조건에서 배양을 하였다.

3. 수정란 배양

본 실험에서 사용된 배양액은 0.4% BSA (sigma, USA)와 EDTA(100 μM)가 함유된 bicarbonate-buffered M16 배양액 (Whittingham, 1971)을 사용하였으며, 체외 배양을 위하여 petri dish(Falcon, USA)에 약 50 μl의 배양액 소적을 만들어 heavy mineral oil(sigma, USA)를 피복한 다음, 37°C, 5% CO배양기 내에서 최소한 2시간 이상 평형을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

2세포기 수정란의 초급속 동결에 있어서 동결액에 첨가된 DMSO농도가 동결융해후 수정란의 체외발달에 미치는 영향은 Table 1에 나타낸 바와 같다.

DMSO의 농도가 증가될 수록 동결융해후 2세포기 수정란의 발달율은 저조하였으며(3.0M, 82.6%, 3.5M, 70.2%, 4.0M, 18.3), 수정란의 형태적인 판별에서는 차이가 없었다.

Trounson등(1987)은 0.5M sucrose를 사용했을 경우, 3.0M DMSO에서 가장 우수한 발달율(76%)을 나타 내었으나, 0.25M sucrose에서는 농도별 차이가 없었다고 하여 본 실험의 결과와 다소 다른 경향을 보고 하였다.

Table 1. Effect of DMSO concentration in the freezing medium on the survival of ultrarapidly frozen mouse 2-cell embryos.

DMSO conc. (M)	No. of embryos			No. of embryos ^{***} developed to normal blastocyst
	Frozen	Recovered [*]	Normal at recovery ^{**}	
3.0	92	89 (96.7)	86 (96.6)	71 (82.6)
3.5	92	89 (96.7)	84 (94.4)	59 (70.2)
4.0	92	86 (93.5)	82 (95.3)	15 (18.3)

percentage of embryos in parentheses
equilibration time ; 5 min

^{*} No. of embryos recovered/ No. of embryos frozen X 100

^{**} No. of normal embryos post-thaw/ No. of embryos recovered X 100

^{***} No. of blastocysts/ No. of normal embryos post-thaw X 100

본 실험에 있어서 4.0M이 저조한 성적을 보이고 있는데 이는 4.0M을 사용할때 음해후 외형적으로는 정상적인 2세포기 수정란 형태이지만 배양시 발달이 정지되는 경향이 있었으며, 또한 7회 반복중 단 3회에 있어서 소수의 발달을 보였을 뿐이다. 이러한 현상은 고농도의 내동제(4M DMSO)가 사용 될 때 본 실험에서 이용된 내동제 제거와 수정란의 평형 시간이 적절하지 못한 것으로 생각된다.

한편 Wilton등(1989)은 4세포기 생쥐 수정란을 4.5M DMSO와 0.25M sucrose가 첨가된 동결액으로 초급속 동결을 실시할때 상실배까

지 높은 발달율(95.6%)을 보고하고 있으므로 고농도 내동제의 이용도 연구 검토하면 좋은 결과를 얻을수 있을 것으로 생각된다. 그러나 모든 내동제는 세포에 대하여 독성이 있으므로 (Kuzan과 Quin, 1988)가능 하다면 낮은 농도의 내동제를 선택하여 사용하는 것이 바람직할 것으로 여겨진다.

3M DMSO가 첨가된 동결액에 sucrose농도를 0.25M과 0.5M로 구분하여 첨가하였을 때, 2세포기 수정란의 초급속 동결후 발달율은 Table 2에서 보는 바와 같다.

Table 2. Effect of sucrose concentration in the freezing and dilution medium on the survival of ultratapidly frozen mouse 2-cell embryos.

Surose conc. (M)	No. of embryos			No. of embryos ^{***} developed to normal blastocyst
	Frozen	Recovered [*]	Normal at recovery ^{**}	
0.25	81	79 (97.5)	71 (89.9)	58 (81.7)
0.5	80	76 (95.0)	54 (71.1)	13 (24.1)

percentage of embryos in parenthese

DMSO concentration ; 3M equilibration time ; 5min.

^{*} No. of embryos recovered/ No. of embryos frozen X 100

^{**} No. of normal embryos post-thaw/ No. of embryos recovered X 100

^{***} No. of blastocysts/ No. of normal embryos post-thaw X 100

sucrose농도 0.25M 처리구(81.7%)가 0.5M 처리구(24.1%)보다 월등히 우수한 발달율을 보이고 있으며, 용해후 형태적인 판별에서도 0.25M처리구가 좋은 결과를 나타내고 있다.

sucrose를 동결액에 첨가할 경우에는 동결시 세포내의 자유수를 탈수시키므로서 초급속 동결이 가능하고 외부 세포막을 보호 한다고 알려져 있으며(Wood와 Farrant, 1980), 또한 sucrose를 내동제 제거에 이용하면 삼투압의 차이에 의하여 수정란으로 부터 내동제를 외부의 변화없이 순간적으로 제거할 수 있으므로 내동제의 one-step제거가 가능하다고 하였다(Leibo, 1983, 1984 ; Renard et al., 1983). 그리고 Mapletoft등(1989)은 생쥐 상실패를 sucrose용액에 옮긴후 시간과 온도에 따른 생존율을 검토한 결과, 낮은 농도와 짧은 시간에서 높은 발달율을 얻을 수 있었다고 보고 하였으며, 강등(1989)은 생쥐 상실패의 급속 동결시 0.3M

sucrose의 첨가는 0.5M과 1.0M보다 더 높은 생존율을 얻었다고 보고하여 본 연구와 유사한 경향을 보이고 있다.

본 실험에서 0.5M sucrose처리구가 낮은 성적을 보이는 것은, 수정란을 동결 용해후 내동제 제거를 실시할 때에는 비록 정상적인 형태를 보이고 있으나, PBS로 수정란을 옮기면 2~3분 이내에 합구가 파괴(lysis)되는 경향이 있었다. 이러한 현상은 동결액과 제거액의 농도 차이가 2세포기 수정란에 적절하지 못하여, 수정란 내부의 내동제가 완전히 제거되어 있지 않은 상태의 수정란을 PBS로 옮기므로서 수분이 수정란 내부로 급속히 침투되기 때문인 것으로 생각된다.

Table 3은 3.0M DMSO와 0.25M sucrose가 첨가된 동결액에서 동결전 수정란의 평형 시간이 2세포기 수정란의 초급속 동결용해후 발달율에 미치는 영향을 나타내고 있다.

Table 3. Effect of equilibration time in the freezing medium on the survival of ultrarapidly frozen mouse 2-cell embryos.

Equilibration time (min)	No. of embryos			No. of embryos*** developed to normal blastocyst
	Frozen	Recovered*	Normal at recovery**	
2.5	87	83 (95.4)	78 (94.0)	67 (85.9)
5	88	86 (97.7)	84 (97.7)	68 (81.0)
10	88	86 (97.7)	83 (96.5)	62 (74.7)

percentage of embryos in parentheses

freezing medium ; 3M DMSO+ 0.25M sucrose + 20% serum + PBS

* No. of embryos recovered/ No. of embryos frozen X 100

** No. of normal embryos post-thaw/ No. of embryos recovered X 100

*** No. of blastocysts/ No. of normal embryos post-thaw X 100

수정란의 평형시간에 따른 2세포기 수정란의 체외 발달율은 2.5분(85.9%), 5분(81.0%), 10분(74.7%)의 순으로 우수하였으며, 동결 용해후 형태적인 판별에서는 별 차이가 없었다.

Trounson등(1987)은 2M DMSO와 0.25M sucrose를 사용할 때 2분 이하의 평형 시간이 가장 우수하다고 하였으며, Boone등(1988)은 3.5M DMSO와 0.5M sucrose를 이용하여 2세

포기 수정란을 two-step 동결시 평형시간이 5분과 10분간에는 차이가 없었으나 20분에서는 현저히 저조함을 보고 하였다.

Szell과 Shelton(1986 a, b, 1987)은 sucrose가 첨가된 동결액으로 수정란을 옮기면 신속히 수정란 내부의 수분이 탈수되고, 내동제가 세포내부로 침투되어 팽창이 일어나며 수정란 내외의 삼투압 상태가 동등일때는 수축과 팽창이 멈추고 이러한 상태에서 초급속 동결이 가능하다고 보고하고 있다.

본 실험에서는 이러한 현상이 수정란을 동결액에 옮긴후 1~2분이내에 일어남을 육안적으로 관찰할 수 있었으며, 실험의 결과로 보아도

수정란의 평형시간이 2.5분 이하에서도 충분히 평형이 이루어 지는 것으로 생각된다. 따라서 2.5분 이하 시간에 있어서의 영향에 관해서는 보다 상세한 검토가 있어야 할 것이다.

in vivo와 in vitro 2세포기 수정란의 초급속 동결음해후 발달율과 solution control, control을 비교한 것은 Table 4와 같다.

상실배까지의 발달율(48시간 배양)은 모든 처리구(in vivo, 96.5% ; in vitro, 96.4% ; solution control, 97.0% ; control, 97.9%)에서 높은 성적을 보여 주었으며 배반포기까지의 발달율(72시간 배양)에서도 각각 90.9%, 84.6%, 89.9%, 89.7%의 성적을 나타내고 있다.

Table 4. Viability of mouse 2-cell embryos.

Treatment	No. of embryos			No. of embryos ^{***} cultured for	
	Tested	Recovered [*]	Normal at recovered ^{**}	48h(M)	72h(B)
in-vivo 2 cell	147	143 (97.3)	142 (99.3)	137 (96.5)	129 (90.9)
in-vitro 2 cell	120	116 (96.7)	110 (94.8)	106 (96.4)	93 (84.6)
Solution control	99	— —	— —	96 (97.0)	89 (89.9)
Control	97	— —	— —	95 (97.9)	87 (89.7)

M ; morula B ; blastocyst

percentage of embryos in parenthese

* No. of embryos recovered/ No. of embryos frozen X 100

** No. of normal embryos post-thaw/ No. of embryos recovered X 100

*** No. of blastocysts and morula/ No. of normal embryos post-thaw X 100

본 연구의 성적은 초급속 동결에 있어 Trounson등(1987)이 보고한 75%의 발달율 및 Critser등(1988), Ng등(1988), 백 등(1989)의 완만 동결성적(63.9%~83.6%)과 vitrification 방법을 이용한 46~89%의 발달율보다 우수하

거나 유사하였다(Kono와 Tsunoda, 1987 ; Friedler et al., 1987).

그리고 in vitro 수정란에서 타 처리구보다 다소 저조한 발달율(84.6%)을 보이고 있으나, 처리 구간에 유의성은 인정되지 않았다. solution

control에서 타 처리구와 유사한 성적을 나타내는 것은 본 실험에 사용한 동결액이 생쥐 2세포기 수정란의 생존에 영향이 없으며, control과 모든 처리구를 비교하여도 발달율에 차이가 없는 것은 본 실험의 동결방법이 2세포기 생쥐 수정란의 초급속 동결에 적합한 방법이라고 할 수 있다.

그러나 수정란 이식 실험을 통하여 본 연구의 결과가 산자에 미치는 영향을 규명해야 될 것으로 생각되어 현재 실험중에 있으며 이에 따른 결과는 추후에 보고할 예정이다.

IV. 적 요

본 연구는 2세포기 수정란의 초급속 동결방법을 확립할 목적으로 내동제의 농도 및 수정란 평형시간에 따르는 영향을 검토하였다. 수정란을 동결액(DMSO+sucrose)에 평형시킨후 곧바로 액체질소에 침지하는 방법으로 초급속 동결을 실시하였고, 동결된 수정란은 37°C 온수에서 용해한 다음 CO₂배양기에서 72시간 동안 배양하면서 배반포기까지의 발달율을 조사하였던 바, 그결과는 아래와 같다.

1. 0.25M sucrose가 동결액에 첨가되어 있을 때, DMSO농도(3.0M, 3.5M, 4.0M)에 따른 2세포기 수정란의 동결 용해후 발달율은 3.0M DMSO(82.6%)에서 가장 우수하였다. 또한 동결액과 제거액에 첨가된 sucrose농도에 따른 발달율은 0.25M(81.7%)의 경우가 0.5M(24.1%)보다 우수하였다.

2. 동결액(3.0M DMSO+0.25M sucrose)에 있어서 수정란 평형 시간을 2.5분으로 조정하였을 때 가장 좋은 성적(85.9%)을 얻었다.

3. 2세포기 수정란의 초급속 동결용해후 발달율(in vivo 2세포기 수정란, 90.9%; in vitro 2세포기 수정란, 84.6%)은 control구(solution control, 89.9%; control, 89.7%)와 차이가 없었다.

V. 인용문헌

1. Boon, W. R., C. A. Brown, J. M. Vasquez and S. S. Shapiro, 1988. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programmable freezer. *Fertil. Steril.*, 50 ; 348-354.
2. Critser, J. K., B. W. Arneson, D. V. Aaker, A. R. Huse-Benda and G. D. Ball, 1988. Factors affecting the cryosurvival of mouse two-cell embryos. *J. Reprod. Fert.*, 82 ; 27-33.
3. Chupin, D. and M. M. De Reviere, 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 17 ; 1-10.
4. Friedler, S., E. Shen and E. J. Lamb, 1987. Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification ; methodologic studies. *Fertil. Steril.*, 48 ; 306-314.
5. Kono, T. and Y. Tsunoda, 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 33 ; 77-81.
6. Kuzan, F. B. and P. Quinn, 1989. Cryopreservation of mammalian embryos. in : *In vitro fertilization and embryo transfer*. Plenum, New York, 301-347.
7. Leibo, S. P., 1983. A one-step in site dilution method for frozen-thawed bovine embryos. *Cryo-Letters*, 4 ; 387-400.
8. Leibo, S. P., 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21 ; 767-790.
9. Mazur, P., 1977. Slow freezing injury in mammalian cells. in : *The freezing of mammalian embryos*. Ciba Foun Symp. Elsevier North-Holland, Amsterdam. No. 52 ; 19-45.

10. Mapletoft, R. J., J. Moker and A. Palasz, 1989. The effect of sucrose concentration, temperature and time on survival of fresh mouse embryos in culture. *Theriogenology*, 31 ; 225.
11. 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.
12. Nakagata, N., 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 87 ; 479-483.
13. Ng, Soon-Chye, H. Sathananthan, A. Bongso, Mui-Nee Lee, H. Mok, Perg-Cheang Wong and S. S. Ratnam, 1988. The use of amniotic fluid and serum with propanediol in freezing of murine 2-cell embryos. *Fertil. Steril.*, 50 ; 510-513.
14. Rall, W. F. and G. M. Fahy, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313 ; 573-575.
15. Rall, W. F., M. J. Wood, C. Kirby and D. C. Whittingham, 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 80 ; 499-504.
16. Szell, A. and J. N. Shelton, 1986 a. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76 ; 401-408.
17. Szell, A. and J. N. Shelton, 1986 b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 ; 699-703.
18. 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.
19. Takahashi, Y. and Kanagawa, 1985. Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapor ; Effects of sugars. *Jph. J. Vet. Res.*, 33 ; 141-144.
20. Trounson, A., A. Reura, C. Kirby, 1987. Untrarapid freezing ; a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48 ; 843-850.
21. Whittingham, D. G., 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 14 ; 7-21.
22. Wood, M. and J. Farrant, 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 17 ; 178-180.
23. Wilton, L. T., J. M. Shaw and A. O. Trounson, 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 51 ; 513-517.
24. Whittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur, 1972. Survival of mouse embryos freezing to -196°C and -296°C . *Science*, 178 ; 411-414.
25. 강만중, 김영훈, 문성호, 김중계, 1989. 생쥐 수정란의 급속동결에 관한 연구. 제1보 내동제 농도가 생쥐 수정란 급속동결시 생존율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 13 ; 134-140.
26. 백청순, 서병희, 이재현, 이경광, 1989. 생쥐 2세포기배의 동결 보존. *대한불임학회지*, 16 ; 9-14.