

Mouse受精卵의 超急速凍結에 있어서 Vitrification Solution 開發에 關한 研究

I. Vitrification Solution內的 耐凍劑組合이 超急速凍結·融解後 mouse morulae의 生存率에 미치는 影響

高敬來, 金重桂, 康珉秀, 梁柄哲, 文星豪
濟州大學校 農科大學

Studies of the Improvement of Vitrification Solution in Mouse Embryos by Ultrarapid Freezing.

I. Effects of the Combination of Cryoprotectants in Vitrification Solution on the Survival of Frozen-Thawed Mouse Embryos.

College of Agriculture, Cheju National Univ.

Ko, G.R, J.K. Kim, M.S. Kang, B.Ch. Yang, M. S. Moon

SUMMARY

Studies were carried out to find the freezing media which gives no ice crystals in single(glycerol, ethylene glycol, dimethyl sulfoxide(DMSO)) and mixture solutions(glycerol + propylene glycol, glycerol + ethylene glycol) of permeable cryoprotectants in vitrification solution and to study effects of VS on the survival of vitrified mouse morulae.

The results are summarized as follows:

1. In toxicity test of permeable cryoprotectants, the higher FDA-score(4.1) of mouse morulae frozen in 20, 30 and 40% single solution of cryoprotectants(glycerol, ethylene glycol, DMSO) was obtained in 30% solution. The FDA-score(4.1) of 30% glycerol was higher than 30% ethylene glycol(3.6) and DMSO(1.4) ($P < 0.05$).

2. 20, 30 and 40% single solutions of permeable cryoprotectants containing m-PBS with 10% sucrose and 20% BSA did not crystallize during cooling, but crystallized during warming. However, the 30% mixture solution of the two permeable cryoprotectants did not crystallized both during cooling and warming.

3. When mouse morulae were frozen in 30% mixture solutions of two permeable cryoprotectants(glycerol and propylene glycol, glycerol and ethylene glycol), highest FDA-score(4.5) was obtained in a mixture solution of 20% glycerol and 10% ethylene glycol(20G10E) than other 30% mixture solution(10G20E, 15G15E, 20G10P, 15G15P, 10G20P) and there was significant difference between 20G10E and 10G20E($P < 0.05$).

* 本 研究는 1990年度 韓國科學財團 研究費 지원에 의하여 수행되었음 *

I. 緒 論

受精卵의 凍結은 1972년 Whittingham과 Wilmot가 緩慢凍結法을 이용한 생쥐 수정란에서 성공을 거둔 이후 凍結過程의 간편화, 凍結融解후의 생존율 향상, 다른 種에의 적용 등에 대한 많은 연구가 집중되어 왔다.

哺乳動物의 초기의 동결은 耐凍劑의 사용과 緩慢凍結에 의한 受精卵의 부분적인 脫水에 의존하였으나, 세포내의 수분을 탈수시키는 sucrose를 동결액에 첨가하므로 세포내부의 水晶形成을 감소시키므로서 急速凍結이 가능하게 되었다(Nguyen 등, 1984; Renard 등, 1984; Takeda 등, 1984; Szell & Shelton, 1986, 1987, Kasai 등, 1980, 1982).

세포내부의 水晶形成은 受精卵이 충분히 脫水되지 않을 때 생성되며, 세포외부의 빙정형성은 凍結保存液의 농도가 낮을 때 생성되므로서 세포사망의 주원인이 되었다.

최근 Rall과 Fahy(1985)는 -196°C 에서 빙정이 형성되지 않는 vitrification 방법으로 생쥐 8-cell을 凍結融解한 후 양호한 성적을 얻었다고 보고한바 있다. Vitrification은 高濃度의 凍結液이 低溫에서 粘性이 강하게 되어 빙정이 형성되지 않는 理論이다.

초기의 vitrification solution은 20.5% DMSO, 15.5% acetamide, 10% propylene glycol의 透過性物質과, 6% polyethylene glycol의 非透過性物質로 구성되었지만, 고농도에 의한 높은 滲透壓때문에 4°C 에서 조작하여야 하며 낮은 농도의 VS에서부터 step wise manner로 조작하여야 하는 단점이 있었다(Kono, 1987).

본 연구는 vitrification solution내의 耐凍劑 混合이 동결용해후 생쥐 morulae의 생존율에 미치는 영향과 vitrification solution의 水晶形

成여부를 조사하기 위해 실행되었다.

II. 材料 및 方法

1. 受精卵 採取

본 실험에 사용된 ICR mouse와 rat는 14/10 light cycle을 유지하는 實驗動物 사육실의 plastic cage에서 사육되었다. 過排卵 誘起를 위해서 PMSG 6 I.U. 를 皮下注射후 48시간째 HCG 6 I.U. 를 피하주사하였고 HCG주사후 암컷을 수컷과 일대일로 합사하였으며, 다음날 아침 vaginal plug를 검사하였다. 수정란은 HCG주사후 70-75시간째 flushing media로 卵管을 관류하여 신선한 m-PBS에서 두번 세척하였으며, 형태적으로 정상적인 것만 실험에 사용하였다.

2. 透過性 耐凍劑의 毒性 檢査

凍結保存液은 세가지 透過性 耐凍劑(20, 30, 40% glycerol, ethylene glycol, DMSO)와 10% sucrose를 m-PBS에 稀釋하였다. 동결액은 1ml주사기를 연결시킨 0.25ml straw에 미리 PS($50\mu\text{l}$), air bubble($20\mu\text{l}$), PS($30\mu\text{l}$), air bubble($20\mu\text{l}$), $50\mu\text{l}$ 의 동결액 순으로 주입하여 준비하였다.

受精卵(7-10개)은 실험에서 $50\mu\text{l}$ 의 동결보존액 drop에 침지한 후 같은 동결보존액 drop으로 한번 옮겼다. 受精卵이 있는 동결액 drop, air bubble, PS순으로 준비되어 있던 straw에 주입한 후 straw powder로 봉입하여 동결액 drop에서 10분간 평형후 실온에서 직접 liquid nitrogen(液體窒素)에 침적하여 보존시켰다.

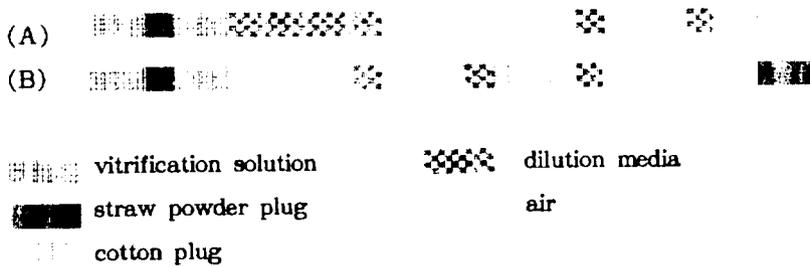


Figure 1. Configuration of vitrification solution, dilution media and air bubble in 0.25ml straw, just before loading embryos(A) and after sealing with straw powder(B).

3. 凍結保存液의 氷晶形成 與否 檢査 (vitrification test)

凍結保存液의 vitrification test(氷晶形成檢査)를 하기 위하여 20, 30, 40%의 glycerol, ethylene glycol, propylene glycol, DMSO를 10% sucrose와 20% BSA를 함유한 m-PBS에 각각 稀釋하여 single 동결보존액을 제조하였다. 두가지의 透過性 耐凍劑混合溶液을 10% sucrose와 20% BSA를 첨가한 m-PBS에 稀釋하여 組合된 동결보존액을 제조하였다.

凍結保存液의 組成은 다음과 같다.

單一凍結保存液(single solutions)

- (1) 20G, 30G, 40G : 20, 30, 40% glycerol
- (2) 20E, 30E, 40E : 20, 30, 40% ethylene glycol
- (3) 20D, 30D, 40D : 20, 30, 40% DMSO

混合凍結保存液(mixture solutions)

- (1) 10G+20E : 10% glycerol+20% ethylene glycol
- (2) 15G+15E : 15% glycerol+15% ethylene glycol
- (3) 20G+10E : 20% glycerol+10% ethylene glycol
- (4) 10G+20P : 10% glycerol+20% propylene glycol
- (5) 15G+15P : 15% glycerol+15% propylene glycol
- (6) 20G+10P : 20% glycerol+10% propylene glycol

凍結保存液을 0.25ml plastic straw에 주입하여 straw powder로 봉입한 후 LN₂ container에 직접 침적시켰다. 1분후 38°C water 수조에 옮겨 不透明하게 변한 straw내의 동결액은 氷晶이 形成된 것으로 간주하였고, 透明하게 된 것은 氷晶이 형성되지 않는 것으로 간주하였다. 한번이라도 불투명하게 된 sample은 氷晶이 형성된 것으로 간주하였으며 5회 반복하였다.

4. 琉璃化 溶液(vitrification solution(VS))

동결보존액의 vitrification test에서 氷晶이 형성되지 않은 혼합용액을 vitrification solution으로 간주 하였으며, 본 동결실험에서 생존율이 가장 높은 20G10E(20% glycerol + 10% ethylene glycol)를 vitrification solution으로 정하였다. 각 용액은 membrane filter로 여과한 후 4°C에서 보관하였다.

5. 超急速 凍結過程(vitrification procedures)

vitrification solution은 1ml주사기가 연결된 0.25ml plastic straw에 PS(PBS + sucrose), air bubble, PS를 주입하여 준비하였다. 본 실험에 사용된 受精卵의 발달단계는 morula이며

petridish에 50 μ l의 VS drop에 浮遊한 후에 다른 drop에 한번 옮겼다. 受精卵를 함유한 drop을 미리 준비된 straw에 주입한 후 air bubble, PS순으로 주입하여 straw powder로 봉입(封入)하였다. 실온에서 5, 10, 20분 동안 평형 후 즉시 LN₂ container에 침적하여 7-15일 동안 저장하였다.

6. 融 解

1-2주동안 液體窒素에 저장하였던 straw를 38°C water bath에서 천천히 흔들면서 融解시켰으며, straw 내용물을 watching glass에 부은 후 실온의 신선한 PS로 옮겼다. 2분후에 受精卵를 PBS로 세번 세척하였으며, 융해된 수정란의 生存判定은 FDA test를 이용하였다.

7. 生死判定方法

FDA 生死判定 : 5mg FDA/ml acetone의 stock solution을 1:400,000의 비율로 PBS에 稀釋하였다. 융해된 수정란을 1분동안 FDA 용액의 drop에서 배양한 후 m-PBS로 세번 세척하였으며 螢光顯微鏡으로 生死를 判定하였다.

FDA - score 는 다음과 같이 分類하였다 :

P ₅ : 100% 發光	} Positive
P ₄ : 80% 이상 發光	
P ₃ : 60% 이상 發光	} Partial
P ₂ : 40% 이상 發光	
P ₁ : 20% 이상 發光	} Negative
P ₀ : 전혀 發光하지 않음	

평균 FDA - score는 다음 식에 의하여 계산되었다.

$$\text{Mean score} = [(A \times 5) + (B \times 4) + (C \times 3) + (D \times 2) + (E \times 1)] / N$$

A:No. of P₅, B:No. of P₄, C:No. of P₃

D:No. of P₂, E:No. of P₁, N:Total of P₀-P₅

8. 統計分析

통계분석은 Minitab을 사용하여 T-test로 분석하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 透過性 耐凍劑의 毒性檢査

Mouse morula 受精卵를 20, 30, 40%의 glycerol, ethylene glycol과 DMSO등 내동제 單用으로 동결하여 생존율을 비교한 결과는 Table 1에 나타나 있다.

20, 30, 40%의 glycerol과 ethylene glycol에서 10분간의 平衡후 凍結融解한 mouse 수정란의 FDA - score(生存率)는 각각 3.8(76%), 4.1(82%), 4.0(80%) 그리고 3.2(64%), 3.7(74%), 3.2(64%)였다. FDA - score는 20%와 40%보다 30%에서 더 높았으며 30% glycerol과 20, 40%의 ethylene glycol 사이에서 有意性이 있었으며(P<0.05), 20, 30% DMSO에서 동결 융해한 mouse morulae의 FDA - score는 1.8, 2.4였으며 有意性은 없었다(P>0.05). 그렇지만 DMSO와 glycerol, DMSO와 ethylene glycol 사이에서 有意性이 있었으며(P<0.01), 가장 높은 생존율은 30% glycerol에서 얻었다. 두 처리(glycerol과 ethylene glycol)에서 透過性 耐凍劑의 적절한 濃度는 30%였다.

본 실험의 결과와 비교하여 볼 때 Szell과 Shelton(1986a)은 8 cell mouse embryos를 가

Table 1. Effect of the concentration of permeable cryoprotectant on the survival of mouse morulae frozen rapidly in liquid nitrogen

Cryoprotectant (%) [*]	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test [†]						Mean FDA score
			P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀	
Glycerol									
20	24	19	8	3	0	4	1	3	3.2 ^b
30	60	50	27	5	14	4	0	0	4.1 ^{bdf}
40	40	33	14	8	7	0	4	0	3.9 ^{bh}
Ethylene glycol									
20	42	37	10	6	12	3	2	4	3.2 ^{bcg}
30	60	51	20	14	8	2	4	3	3.7 ^b
40	45	38	6	10	11	7	4	0	3.2 ^{bcg}
Dimethyl sulfoxide									
20	40	34	4	5	3	3	5	14	1.8 ^a
30	50	44	1	2	7	7	15	12	1.4 ^a

Values with different superscripts are significantly different (^{a-b}, ^{c-d}, ^{e-f}, P<0.01; ^{g-h}, P<0.05).

지고 急速凍結 시켰을 때 30% glycerol에서, Miyamoto와 Ishibashi(1986)는 15% glycerol에서 가장 높은 생존율을 얻었다고 하였으며, 특히 DMSO는 glycerol보다 좋지 않았다고 보고한 것과 거의 일치한다. 그리고 Kassi 등(1990)은 mouse morulae를 30%의 透過性耐凍劑(Ficoll)에서 동결융해했을 때 30% ethylene glycol(98%)과 glycerol(88%)이 양호하였다고 보고하였다. 그러므로 다른 내동제보다 glycerol의 동결보존효과는 세포에 해가 없고, 동결시 동결되지 않은 부분에서 염분의 농도를 감소시키는 점으로 설명되어진다(Rall et al., 1987; Szell & Shellton, 1986a).

내동제의 농도는 Miyamoto와 Ishibashi(1986)의 결과가 더 좋았는데 그 이유는 동결 방법에 기인할 것으로 생각되며, 본 실험에서

의 동결은 LN₂에 침적함에 반하여 LN₂ vapor에서 실행되었다는 차이가 있었다.

2. 凍結保存液의 琉璃化 檢査

Straw내 동결액의 氷結晶 여부를 파악하기 위하여 검사한 결과는 Table 2에 제시한 바와 같다.

透過性 耐凍劑의 single solution(單用劑)은 10% sucrose + 20% BSA를 첨가한 m-PBS에 20, 30, 40%의 농도로 稀釋하였을 때, 凍結時에 모두 氷結晶을 形成하였지만 融解時 3초 이내에 不透明하게 변하였다. 두가지의 내동제의 30% 혼합용액을 10% sucrose + 20% BSA에 첨가한 m-PBS에 稀釋하였을 때 凍結과 融解시 모두 透明하였다. 30%의 혼합용액에서보다 40% single용액에서 氷정이 형성되

Table 2. Occurrence of crystallization in freezing media during rapid cooling in liquid nitrogen and warming in 38°C water

Cryoprotectant	Concentration of permeable cryoprotectant					
	20%		30%		40%	
	Cooling	Warming	Cooling	Warming	Cooling	Warming
Glycerol	-	+	-	+	-	±
Ethylene glycol	-	+	-	+	-	±
Propylene glycol	-	+	-	+	-	±
Dimethyl sulfoxide	-	+	-	+	-	±
20% G + 10% E			-	-		
15% G + 15% E			-	-		
10% G + 20% E			-	-		
20% G + 10% P			-	-		
15% G + 15% P			-	-		
10% G + 20% P			-	-		

All the transparent samples were considered uncrystallized and were scored (-) and all the opaque samples were considered crystallized and were scored (+). If only all the samples turned opaque once, it was considered crystallized and was scored (±). Each treatment had 5 replications.

는 이유는 명확하지 않지만 혼합물질의 특성에 기인하는 것이 아닌가 생각된다. Kasai(1990) 등은 30% Ficoll 혹은 30% Ficoll + 20% sucrose 를 첨가한 m-PBS에 40% glycerol과 ethylene glycol을 稀釋하였을때 氷晶이 형성되지 않았다고 보고하였다. 세포사망의 주요인은 凍結과 融解시에 세포내외부에서 생성되는 氷정형성과 관계가 깊은데 세포내부에 氷晶形成은 受精卵이 충분히 脫水되지 않았을때 생성되며 세포질이 物理的인 압력을 받음으로써 세포가 파괴된다(Szell & Shelton, 1986ab). 세포외부의 氷정형성은 동결보존액의 농도가 낮을 때 발생하며 동결되지않은 보존액의 염분농도를 증가시킴으로써 세포가 죽는 원인이 된다. 세

포내외부의 氷정형성을 방지하기 위해서 Rall & Fahy(1980)에 의해서 vitrification방법이 개발되었는데 vitrification은 동결시 氷정형성 없이 동결보존액이 저온에서 점성이 강하게 되어 고체화되는것으로 규정되어진다. 초창기의 vitrification solution은 20.5% DMSO, 15.5% acetamide, 10% propylene glycol, 6% ethylene glycol로 구성되었다. Valdez등(1989)은 25% glycerol과 20% propylene glycol로 구성되는 vitrification solution에서 높은 생존율을 얻었다고 하였고, Kasai등(1990)은 40% ethylene glycol, 30% Ficoll, 20% sucrose로 구성되는 vitrification solution에서 높은 생존율을 얻었다고 보고하였다.

본 연구에서 빙정이 형성되지 않는 glycerol 과 ethylene glycol, glycerol과 propylene glycol 의 30% 혼합용액을 새로운 vitrification solution으로 선정하였다.

3. 投過性 耐凍劑의 混合效果

glycerol과 ethylene glycol, glycerol과 propylene glycol의 30% 混合溶液으로 mouse morulae의 생존율(FDA-score)에 미치는 영향은 Table 3과 4에서 보여 주고 있다.

Table 3. Effects of the mixture of glycerol and propylene glycol on the survival of the vitrified mouse morulae

Cryoprotectant (%)*	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test(%)						Mean FDA score
			P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀	
10G 20P	30	24	3 (13)	12 (50)	4 (17)	4 (17)	1 (4)	0 (0)	3.5
15G 15P	30	25	6 (24)	5 (21)	8 (33)	3 (13)	0 (0)	3 (13)	3.2
20G 10P	30	29	11 (38)	6 (21)	8 (28)	3 (10)	1 (3)	0 (0)	3.8

* 10G 20P : 10% glycerol + 20% propylene glycol

15G 15P : 15% glycerol + 15% propylene glycol

20G 10P : 20% glycerol + 10% propylene glycol

Table 4. Effects of the mixture of glycerol and ethylene glycol on the survival of vitrified mouse morulae

Cryoprotectant (%)*	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test(%)						Mean FDA score
			P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀	
10G 20E	30	29	13 (45)	7 (24)	1 (3)	3 (10)	3 (10)	2 (7)	3.6 ^a
15G 15E	30	30	15 (50)	10 (33)	1 (3)	2 (7)	1 (3)	1 (3)	4.1 ^{ab}
20G 10E	30	25	18 (72)	5 (17)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	4.5 ^b

* 10G 20E : 10% glycerol + 20% ethylene glycol

15G 15E : 15% glycerol + 15% ethylene glycol

20G 10E : 20% glycerol + 10% ethylene glycol

Values with different superscripts are significantly different(*-^b, P<0.05)

Table 3에서 보여주듯이 10G20P, 15G15P, 20G10P에서 동결된 mouse morulae의 생존율은 각각 3.5(70%), 3.2(64%), 3.8(76%)로서 유의성은 없었지만($P > 0.05$), 20G10P에서 100% 발광하는 P5의 분포율(38%)이 15G15P(24%)와 10G20P(13%)보다 더 높기 때문에 20G10E가 凍結融解후의 mouse morulae에서 가장 효과적인 것으로 나타났다.

그리고 Table 4에서 10G20E, 15G15E, 10G20E에서 동결된 mouse morulae의 생존율은 각각 3.6(72%), 4.1(82%), 4.5(90%)이었으며 20G10E와 10G20E사이에서 유의성이 있었으나($P < 0.05$), 10G20E와 15G15E, 15G15E와 20G10E사이에서는 유의성이 없었다. 20G10E의 P5(FDA-score)의 분포율(72%)이 10G20E(45%)와 15G15E(50%)보다 더 높은 성적을 보임으로써 20G10E가 mouse morula의 생존율에 더 높은 영향을 미쳤다. 결과에서 알 수 있듯이 20G10P(Table 3)보다 20G10E(Table 4)에서 더 높은 생존율을 얻음으로써 본 실험에 사용된 가장 좋은 vitrification solution은 glycerol농도에서 20%이며 ethylene glycol이 10% 처리구(20G10E)가 제일 효과적이었다는 것을 보여주고 있다. 결론적으로 Miyamoto & Ishibashi(1977), Szell & Shelton(1986a)등은 glycerol, ethylene glycol, propylene glycol이 mouse 수정란의 동결에 효과적이었다고 보고된 바있으며, Kasai(1990)등은 30% ethylene glycol에서 平衡된 mouse morula의 培養後 發達率(98%)과 glycerol(88%)이 propylene glycol(16%)보다 더 높았다고 보고하였다. Table 3과 4에 보여주듯이 glycerol과 ethylene glycol이 propylene glycol보다 mouse 受精卵凍結에 더 효과적인 것으로 판단되었다.

초기 Rall과 Fahy(1985)의 vitrification solu-

tion은 毒性이 높았기 때문에 동결과정이 step-wise manner로 두 가지의 온도(20°C, 4°C)에서 실행되어야만 하였으나, 본 실험의 새로운 vitrification과정은 실온에서 간단한 방법으로 수행되었다는 점에서 의의가 있다.

IV. 摘 要

본 연구는 vitrification solution의 改善을 목적으로 세포내 透過性 耐凍劑의 單用(glycerol, ethylene glycol and dimethyl sulfoxide (DMSO)) 또는 混用(glycerol+ ethylene glycol, glycerol+ propylene glycol)에서 氷結晶이 형성되지 않는 가장 합리적인 凍結液을 선정하여, 이 동결액에서 超急速凍結시킨 mouse embryos의 생존율에 미치는 영향을 究明하기 위하여 실시되었으며 要約된 結果는 다음과 같다.

1. 透過性 耐凍劑의 농도를 조사한 실험에 있어서 20, 30, 40%의 單用으로 동결된 mouse morulae의 FDA-score는 30%(glycerol, ethylene glycol)에서 높았으며, 30% 동결액중 ethylene glycol(3.6)과 DMSO(1.4)보다 glycerol(4.1)에서 더 높은 생존율을 보여 주었다 ($P < 0.05$).
2. m-PBS에 10% sucrose와 20% BSA를 함유한 20%, 30%, 40% 單用耐凍劑로 동결시에는 氷結晶이 형성되지 않았으나, 融解시에는 氷結晶이 형성된 반면, 30% 혼합 내동제에서는 동결과 융해시 모두 氷結晶이 형성되지 않았다.
3. 두가지 透過性 耐凍劑의 組合 실험에서 20% glycerol과 10% ethylene glycol混合液

(20G10E)이 다른 30% 혼합액(10G20E, 15G15E, 20G10P, 15G15P, 10G20P)보다 더 높은 FDA-score(4.5)를 얻었다.

V. 引用 文 獻

1. Kang, M.J., Y.H.Kim, S.H.Moon and J.K. Kim, 1989. Studies on the rapid freezing of mouse embryos: I. Effects of cryoprotectants concentration on the mouse embryo survival of the rapid freezing. Korean J. Anim. Reprod. 13(3) : 134-140.
2. Kang, M.J., Y.H. Kim, S.H. Moon and J.K. Kim, 1989. Studies on the rapid freezing of mouse embryos: II. Effects of development stage and seeding on mouse embryo survival of rapid freezing. Korean J. Anim. Reprod. 13 (3):141-148.
3. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J.Reprod. Fert., 59: 51 -56.
4. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1982. Survival of rat embryos after freezing. J. Reprod. Fert., 66:367-370.
5. Kasai, M., J.H. Komi, A. Takakamo, H. Tsudera, T. Sakurai and T. Machida, 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J. Reprod. Fert., 89:91-97
6. Kim, H.S., B.S. Yang, S.J. Oh and K.S. Lee, 1990. Factors affecting the survival of rabbit embryos cryopreserved by vitrification. Korean J. Anim.Reprod. 14(1):43-49.
7. Kono, T. and Y. Tsunoda, 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. Japan. J. Anim. Repord., 33:77-81.
9. Fahy, G.H., D.R. MacFarlane, C.A. Angell, H. T. Meryman, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology, 21:407-426.
10. Leibo, S.P., P. Mazur and S.C. Jackowski, 1984. Factors affection survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exptl. Cell. Res., 89:79-88.
11. Miyamoto, M. and T. Ishibashi, 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78:471-478.
12. Miyamoto, H., Y. Miyamoto and T. Ishibashi, 1989. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. Japan. J. Zootech., 57:250-256.
13. Nguyen, B.X., N.Y. Heyman and J.P. Renard, 1984. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. Theriogenology, 22:389-400.
14. Rall, W.F. and G.M. Fahy, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification. Nature Vol. 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. Renard, J.P., Y. Heyman and J.P. Ozil, 1981. Freezing bovine blastocysts with 1,2 propanediol as cryoprotectant. Theriogenology, 15:113.
17. Renard, J.P., B.X. Nguyent and V. Garnier, 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit

- embryos after partial dehydration at room temperature. *J.Reprod. Fert.*,71:573-580.
18. Széll, 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.
19. Széll, A. and J.N. Shelton, 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
20. Széll, A. and J. N. Shelton, 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80:309-316.
21. Valdez, C.A., O. Abas Kazni, Y. Takahashi, M. Hislinuma and H. Kanakawa, 1989. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 68(6): 627-636.
22. 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.
23. Whittingham D.G., S.P. Leibo and P. Mazur, 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -296 . *Science*,178:411-414.