

수정란 동결

박 춘 근

강원대학교 동물자원과학대학

I. 서 론

번식생리에 대한 이해 증진은 생식세포의 체외 보존법을 발전시켜 왔으며, 이 기술은 가축의 개량과 증식을 매우 빠른 속도로 촉진시켜 왔다. 예를 들면, 소의 인공수정과 수정란이식은 유전능력이 우수한 정자와 수정란을 동결보존함으로써 국제간 동물 수송을 가능하게 하였으며, 이는 빠른 시간 내에 우수 품종 또는 개체의 증식을 가능케 하여 생산성 향상에 결정적인 기여를 하였다. 최근 동결보존 기술은 가축뿐만 아니라 실험동물과 야생동물 그리고 인간에 있어서도 그 활용도가 점차 증가하고 있다. 또한 생식세포의 체외 보존법은 신품종의 창출을 기대하고 있는 다양한 번식공학기법의 필수적인 수단이 되고 있다.

동결보존의 목적은 생명 기능과 유전적 변화 없이 세포를 반영구적으로 보존한다는 것을 의미한다. 최초의 동결보존은 Luyet (1937)이 slow freezing 방법으로 정액 동결보존을 성공적으로 보고하였다. 하지만 slow freezing 시 빙점 이하의 온도에서 seeding이 일어나지 못하며, 또한 +10~ -5℃의 위험 온도범위를 극복하지 못하므로 생존성에 제한을 가져왔다. 그러나 동결보호제 개발과 높은 농도의 동해보호제의 사용에 의해 위험 온도범위를 극복하였으며, 더 낮은 온도범위에서 동결보존을 가능하게 하였다. 하지만 동결보존시 낮은 동결율에 의해 세포내 빙정형성이 일어나 세포사의 원인으로 작용하여 생존성 저하의 원인이 되었다. 이런 문제점은 더 낮은 온도에서 동결되며 동결시 높은 동결율에 의해 빙정형성을 방지하여 급속하게 동결 할 수 있는 방법으로 개선되었다. Whittingham (1971)에 의한 초자화동결법의 개발은 높은 농도의 동결보호제를 사용하여 낮은 온도 범위에서 동결-융해 후 생존율의 향상을 가져왔으며, 급속동결에 의해 세포내 빙정형성이 저하되었다. 그 후 계속된 동

결보존 기술의 개발에 의해 여러 종의 포유동물 난자가 성공적으로 동결보존되었다 (표 1).

최근까지 초자화동결법은 여러 연구자들에 의해 개선되어져 왔으며 Rall과 Pahy (1985)가 빙정형성 없이 포유류의 수정란 동결을 보고하는 등 많은 발전을 거듭하였다. 현재는 보편적인 방법으로 초자화동결법이 여러 동물 종에서 사용되고 있다. 1994년에는 190,000개의 동결보존된 소 수정란 이식이 세계적으로 이루어졌으며 (Thibier, 1995), 체외에서 생산된 소 수정란의 동결보존 후 수정란이식을 통한 산자 생산이 보고되었다 (Massip 등, 1995; Suzki 등, 1993; Tachikawa 등, 1993; Wurth 등, 1994; Zang 등, 1993).

일반적으로 사용되고 있는 초자화동결은 높은 생존율을 나타내고 있지만, 여러 가지 제한 요인을 갖고 있다. 먼저 초자화동결에 사용되고 있는 동결보호제는 농도가 높기 때문에 난자에 처리 시 삼투압 작용에 의해 형태적 손상을 주며, 또한 동해보호제의 독성에 의해 융해후 배반포 발달에 영향을 주어 생존율 저하의 원인으로 작용하고 있다. 그리고 낮은 동결율은 세포내 빙정형성, chilling에 의한 상해를 초래하며, 융해 시 낮은 융해율은 세포의 생존율에 직접적인 영향을 준다. 이와 같은 여러 가지 제한요인을 갖고 있음에도 불구하고 난자의 초자화동결보존은 많은 이점을 갖고 있다.

최근 수정란 이식의 필요에 따른 수정란 수요의 증가와 수정란 보존의 필요성이 대두되고 있다. 수정란 이식시 발정동기화에 의해 수란우에서 난자의 회수 없이 동결보존된 수정란을 사용하여 편리하게 이식할 수 있으며, 우수한 유전자원과 복제란 등의 다량 확보에 의한 보존이 가능하며, 국제적 무역 시 우수한 유전자원의 수입과 수출에 반드시 필요한 기술로 여겨지고 있다. 또한 표 2에서 보는바와 같이 신선란에 비해 동결란의 이식시 수태율이 낮지만 앞으로의 연구에 의해 체외에서 생산한 수정란의 동결-융해 후 수정란 이식이 일반화 될 것으로 예상된다. 따라서 본고에서는 최근 일반적으로 사용되고 있는 소 체외수정란의 초자화동결법에 대해 간단히 소개하고자 한다.

표 1. 포유동물의 동결 용해 후 산자 생산

종 류	년 도	저 자
생 쥐	1971	Whittingham
소	1973	Wilmot and Rowson
토 끼	1974	Bank and Maurer
양	1974	Wiladsen et al.
쥐	1975	Whittingham
염 소	1976	Bilton and moore
말	1982	Yamamoto et al.
사 람	1983	Trounson and Mohr
돼 지	1991(a,b)	Kashiwazaki et al.

표 2. 한우 체외수정란의 젖소 수란우 이식 수태율

수 정 란	이식두수	임신두수	수태율 (%)
신선 체외수정란	15	10	67.0
동결 체외수정란	12	5	42.0

II. 체외 수정란의 생산

도축장에서 도축된 소로부터 회수된 난소를 0.9% 생리식염수에 담아 32~35℃의 온도로 짧은 시간 내에 실험실로 운반하여 채란에 사용한다. 채란 시 18gauge needle이 장착된 10ml의 주사기로 직경 2~6mm의 난포로부터 난포액을 흡입한 후 실체현미경을 사용하여 형태적으로 정상이며, 난구세포가 균일하게 붙어 있는 난자만을 선별하여 체외성숙에 사용한다. 이 때 난포의 크기가 너무 크거나 작은 난포를 흡입하여 실험에 사용하면 과성숙이 되거나 미성숙이 되어 양질의 난자를 얻을 수 없다. 난자의 성숙에 사용되는 배양액은

TCM-199에 10% FBS, 0.2mM Na-pyruvate, 0.2IU FSH, 500 μ g gentamycin, 10 μ g 17 β -estradiol을 첨가하여 사용하며, 체외수정은 Brackett와 Oliphant (1975)가 사용한 BO 배양액 내에서 실시한다. 배반포 생산에 사용된 배양액은 CR_{1aa}-BSA (Bovine Serum Albumin)와 CR_{1aa}-FBS (Fetal Bovine Serum)를 3일 간격으로 교체하여 사용한다. 난자는 incubator에서 5% CO₂, 39 $^{\circ}$ C의 조건 하에서 20~22시간동안 성숙배양 한다. 성숙배양 후 현미경으로 난구세포가 균일하게 확장된 난자만을 선택하여 체외수정에 사용한다. 체외수정에 사용되는 동결정액의 용해는 37 $^{\circ}$ C에서 30초간 용해 후 1500rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하며 재차 1200rpm에서 5분간 원심분리하여 난자당 정자가 5600개가 되도록 희석하여 수정을 실시한다. 수정 8시간 후 난자를 3~4회 세척하여 CR_{1aa}-BSA에서 3일간 배양한다. 이 때 수정된 난자는 2일째에 2~4세포기를 나타낸다. 3일간 배양한 다음 분할되지 않은 난자는 제거하고 분할된 난자는 다시 CR_{1aa}-FBS에서 추가 배양을 실시한다. 이 때 배양액은 3일 간격으로 교체하여 수정란의 발달에 충분한 영양분을 공급해 준다. 7~8일간 배양된 수정란은 초기 배반포와 확장배반포의 발달단계를 거치며, 형태적으로 정상적인 초기 배반포와 확장배반포 단계의 수정란만을 동결에 이용한다.

III. 소 배반포의 동결과 용해

1. 동결액

가축이나 실험동물의 난자와 초기배의 동결보존시에 동결에 의한 손상을 막기 위해 보존액에 첨가하는 물질을 동결보호제라 하는데, 이들 물질은 세포가 동결하는 과정에 생기는 세포내 전해질의 농축이나 삼투압의 상승과 세포내외의 빙정형성 등 생존에 불리한 상태를 완화하거나 조절하는 작용을 갖는 것으로 생각되고 있다. 동결보호제는 세포내성 동결보호제와 세포외성 동결보호제로 나뉘며, 이것들을 혼합하여 만든 것을 동결액이라 한다. 세포내성과 세포외성 동결보호제의 분자량은 표 3에 나타났다.

세포내성 동결보호제는 글리세롤, 프로필렌글리콜 (1,2-propanediol), 에틸렌

글리콜 (ethylene glycol) 및 DMSO 등이 있다. 이들은 분자량 100이하로 속일성 (coligative propertices) 또는 수화성이 강하고, 전해질이나 유기산의 용매가 된다. 또 세포막을 자유롭게 통과하여 강한 염류의 완충작용을 하고 있다. 이들 동결보호제는 물분자와 강력히 결합하여 빙정에 흡수되는 세포수의 비율을 줄이고, 용질의 농축을 최소한으로 줄이는 능력을 갖고 있다. 빙결정이 저하하여 공정점 (eutectic point)에 달하고 그대로 동결하게 된다. 특히 글리세롤은 그 성질이 현저하다. DMSO는 독성이 강하나 글리세롤보다는 투과성이 높고 또한 공정점이 매우 낮다 (-132℃). 이것은 시료중의 빙정형성이 매우 적다는 것을 의미한다.

세포외성 동결보호제는 덱스트란(dextran), PVP, 라피노스(raffinose), sucrose, 난황, 혈청 알부민 등이 있다. 이들은 분자량이 큰 동결보호제이다. 세포막 투과가 곤란하며 작용의 기작에 대해서는 확실치 않으나 특정의 세포에 대해 동결보호작용이 인정되고 있는데 동해방지 효과는 세포내성 동결보호제 보다는 떨어지고 있다.

세포내성과 세포외성 동결보호제는 수정란이 급속하게 동결할 때 세포내외에서 난자의 손상을 저하시키며 빙결정 형성을 줄여 생존율을 높여주는 역할을 하며, 세포내성과 세포외성 동결보호제는 적정 농도로 혼합한 동결액내에서 높은 생존율을 나타내는 것으로 알려져 있다. Ishimori (1993)등은 세포내성 동결보호제로 ethylene glycol과 DMSO를, 세포외성 동결보호제로 sucrose를 사용하였고, Sommerfeld 와 Niemann (1999)은 소 수정란을 세포내성 동결보호제로 ethylene glycol과 세포외성 동결보호제로 PVA (polyvinyl alcohol)을 사용하였다. Mtango (2001)등은 ethylene glycol, 세포외성으로는 trehalose 과 PVP등을 사용하여 소 배반포의 동결에 이용하여 높은 생존율을 얻었다. 최근에는 ethylene glycol과 sucrose를 많이 사용하고 있으며, DMSO와 glycerol등도 많은 연구자들에 의해 연구되고 있다.

표 3. 동해보호제의 분자량

동해보호제	분자량
DMSO	78.13
글리세롤	92.10
프로필렌글리콜	76.10
에틸렌글리콜	62.07
1,2-panediol	76.10
glucose	181.1
sucrose	342.3
trehalose	378.3

여기서는 Saito (1994) 등의 방법을 수정하여 사용하였다. 동결액은 표 4에 나타낸 것과 같다. 기본 배양액으로 D-PBS를 사용하였으며, straw에 사용되는 완충제는 D-PBS (Dulbecco's-Phosphate Buffered Saline)에 20% FBS (Fetal Bovine Serum)를 첨가한 배양액에 0.5M sucrose를 첨가하여 S-PBS로 사용하였다. 또한 sugar solution은 sucrose 8.022g/25ml, glucose 4.225g/25ml을 D-PBS에 첨가하여 사용하였으며, 세포내성 동결보호제로는 glycerol과 ethylene glycol을 사용하였으며, 세포외성 동결보호제로는 sucrose와 glucose를 사용하였다.

2. 용해액

용해액은 용해시 동결액을 제거하여 주는 역할을 하며 수정란을 형태학적으로 회복시켜 주는 작용을 해준다. 동결 수정란의 용해시 용해액에 따라서 수정란의 생존율이 변화하며 연구자들에 따라서 용해액의 구성에 차이를 나타낸다.

현재, 여러 종류의 용해액이 사용되고 있지만, sucrose와 glucose를 대부분 사용하고 있다. 이들 물질은 농도가 높은 세포외성 동결보호제로서 세포외에 높은 농도를 주어 세포내에 잔존하고 있는 세포내성 동결보호제를 제거해 주는 역할을 한다. 여러 용해액들은 용해시 농도에 따라 여러 단계로 나누어 사

용되고 있으며, 이것은 용해 방법에 따라 달라질 수 있다. 여기서는 Saito (1994)등이 사용한 방법을 수정하여 사용하였으며 용해액은 표 5에서 나타냈다.

표 4. 동해보호제 농도

시 약	농 도 (ml)		
	VS 1	VS 2	VS 3
D-PBS	8.5	5	0
Sugar solution	2	4	6
Glycerol	1.5	1.5	3
Ethylen glycol	0	1.5	3
FBS	3	3	3

VS : Vitrification Solution

D-PBS : Dulbecco's-Phosphate Buffered Saline

FBS : Fetal Bovine Serum

표 5. 용해액 농도

시 약	농 도	
	TM 1	TM 2
Sucrose	0.5M	0.25M
D-PBS	10ml	10ml
FBS	20%	20%

TM : Thawing Medium

D-PBS : Dulbecco's-Phosphate Buffered Saline

FBS : Fetal Bovine Serum

3. 동결과 융해과정

1) 동결과정

수정란의 동결은 동해보호제의 처리와 straw 제작 및 액체질소내 보존으로 분류된다.

① 동해보호제의 처리

체외에서 생산된 소 수정란은 수정 후 7~8일이 경과한 배반포기배를 사용한다. 배반포기배는 형태적으로 정상적이며, 양질의 수정란만을 선별하여 동결에 사용하며, 정상적이지 않을 때는 동결, 융해 후 생존율이 저하되므로 양질의 수정란의 선별은 동결전 배반포의 선택에 있어 중요하다.

선별된 수정란은 20% D-PBS에서 3회 세척 후 동결액에 옮긴다. 동결전 동결보호제 처리시간은 수정란의 생존율과 직접적인 관련이 있으므로 처리 시간을 엄수해야 한다. 동결전 처리시간이 너무 길면 과도한 동결액의 침투로 삼투압 등에 의한 손상을 입게 되고, 너무 짧으면 세포내의 많은 수분이 동결시 빙정을 형성하여 세포사의 원인이 된다. 이것은 동결속도가 너무 빨랐을 때도 비슷한 현상이 일어나며, 마찬가지로 동결 속도가 너무 느리면 삼투압과 저온에 의한 손상으로 인해 세포사의 원인이 될 수 있다. 동결과정은 그림 1에서 나타냈다.

- ▶ 제 1 동결보호제 : 제 1 동결액 (VS 1)에 옮긴 난자는 $50\mu\text{l}$ drop에 옮겨 3회 세척을 거친 후 VS 1 $300\mu\text{l}$ drop에 옮겨 동결액이 세포내에 잘 스며 들도록 세척한다. VS 1 내에서는 5분 동안 처리를 하며, 동결액 처리 시간이 짧거나 초과되면 세포의 수분의 제거가 불충분하거나, 삼투압 작용에 의해 손상을 주게 된다. 이 때 난자는 삼투압 차이 때문에 세포내 수분이 빠져나가 응축됨을 볼 수 있으며, 응축이 되지 않은 수정란은 세포막이 깨지므로 동결에 사용할 수 없다.
- ▶ 제 2 동결보호제 : VS 1에서 처리된 배반포는 제 2 동결액 (VS 2) $50\mu\text{l}$ drop에 옮겨 세척을 실시한 다음 $300\mu\text{l}$ drop에 옮겨 5분간 처리를 한다. 이 때 계속적으로 세척을 실시해야 하며, 응축된 배반포는 다시 원상태로 회복된다.

- ▶ 제 3 동결보호제 : 원상태로 회복된 배반포는 제 3 동결보호제 (VS 3) 500 μ l에 옮긴다. VS 3에서는 처리시간과 straw에 loading되는 시간이 1분 이내에 이루어져야 하므로 신속한 처리가 요구된다.

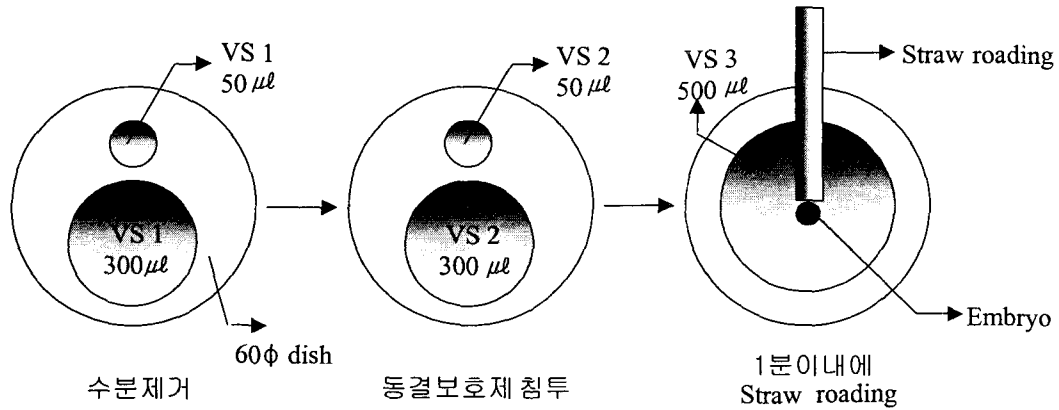


그림 1. 동결과정

② Straw의 제작

동해보호제의 처리가 완료된 수정란은 straw에 loading되는 과정을 거쳐 액체질소에서 동결된다. straw의 제작과정은 그림 2에서 나타냈다.

수정란을 5분 동안 VS 1 처리하는 시간을 활용하여 straw를 작성한다. straw에 200 μ l pipette을 사용하여 완충제인 S-PBS (Sucrose-Phosphate Buffered Saline) column이 7cm (150 μ l)가 되도록 흡입 후 air (5~10mm)를 형성, 계속해서 VS 3를 1~2mm 흡입하여 straw를 준비한다. 제작된 straw는 VS 3 처리 시 빠른 시간 내에 straw에 loading 되어야 하므로 straw 제작 시 숙련된 기술이 필요하다. 먼저 제작된 straw에 수정란이 들어 있는 VS 3 column (7~8mm, 15 μ l)를 넣은 후, S-PBS (2~3cm, 40~60 μ l)를 넣어 먼저 넣은 S-PBS가 straw의 끝 면봉 부위에 닿아 고정되도록 하며, 반대 쪽 끝은 알콜램프에 접자를 가열하여 heating plug를 실시한다. 즉, straw에 들어가는 medium은 완충제로 S-PBS, VS 3 동결보호제, air등을 순서대로 만들어 straw를 제작한다.

③ 액체질소의 보관

제작된 Straw는 액체질소 보관 통에 수직으로 넣어 동결을 실시한다. 처음에는 straw의 배반포가 있는 위치까지 침적하였다가, 5초 후에 straw 전체를 액체질소에 침적한다 (그림 3). 침적 후 동결이 잘 이루어져 있는지 확인을 위해 straw의 동결상태를 보면 투명한 유리처럼 유리화됨을 확인할 수 있을 것이다. 이렇게 동결된 straw는 다시 보관용 container에 옮겨 장기간 보존한다

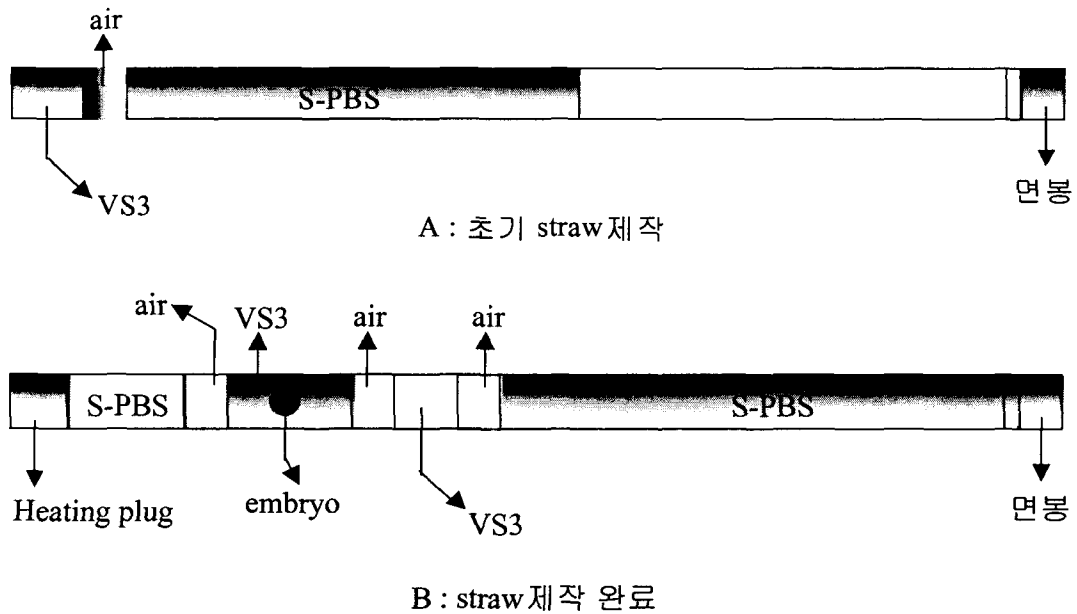


그림 2. straw 제작

2) 용해과정

액체질소내에서 동결보존된 수정란은 용해 후 이용될 수 있으며, 이 때 수정란의 생존율에 커다란 영향을 미치기 때문에 동결방법과 동해보호제의 농도에 따라 용해액 조성을 조절하여야 한다.

① 용해액 처리

동결된 수정란은 37℃의 water bath 내에서 급속하게 용해를 실시한다.

이 때 straw의 용해는 빠른 시간내에 이루어져야 하며, 용해된 straw는 straw cutter를 사용하여 신속하게 절단 후 straw 내용물 (수정란, VS 3, S-PBS)을 dish에 옮긴다. 이 때 수정란은 straw 내용물과 혼합되어 있으므로 빠른 시간내에 용해액에 옮겨 처리한다. 용해과정은 그림 4에서 나타냈다.

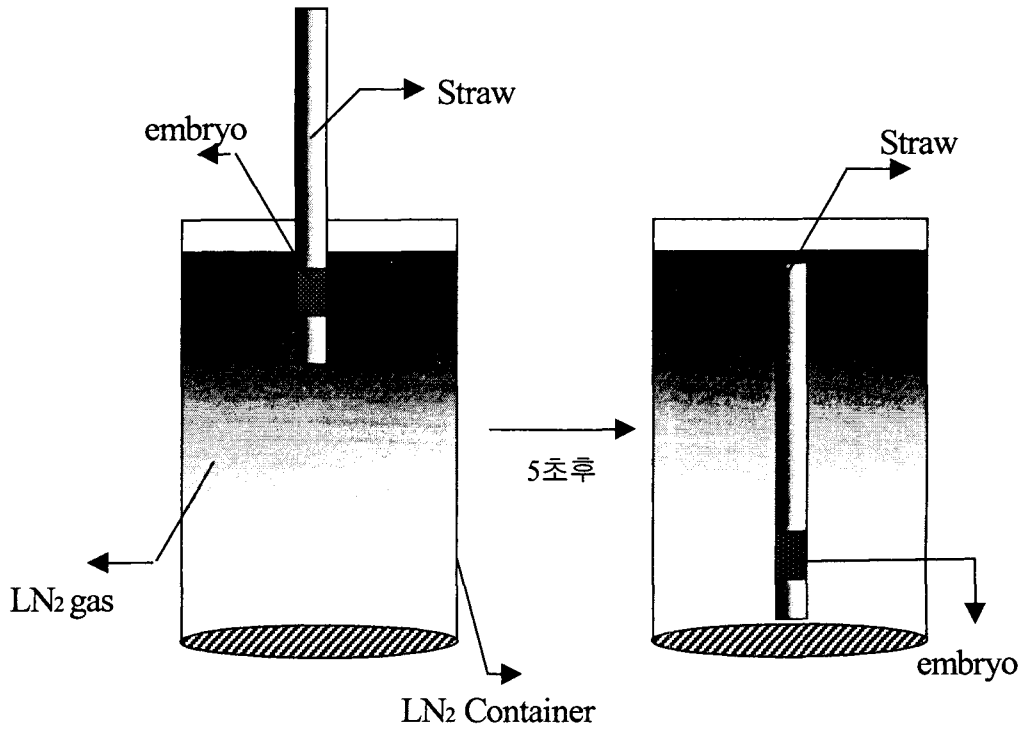


그림 3. straw 동결과정

- ▶ 제 1 용해액 : 제 1 용해액 (TM 1)에서는 용해된 straw로부터 회수된 수정란을 옮겨 0.5M sucrose에서 처리한다. 이 때 수정란은 동결액 처리 시와 같이 응축된 상태를 나타낸다. 수정란의 응축은 세포내에 존재하는 동결보호제를 제거하여 주는 역할을 하며, 동결액을 제거하기 위해서는 동결액처리시와 같이 용해액 내에서 지속적인 세척이 필요하다.

- ▶ 제 2 용해액 : 0.25M sucrose가 첨가된 용해액을 사용하여 처리한다. 제2 용해액 (TM 2) 처리 시 응축된 수정란은 어느 정도 형태적으로 회복이 되며, 처리시간이 지날수록 원래의 배반포 형태를 나타낸다. 이때도 TM 1처리시와 같이 지속적인 세척이 필요하며, 처리동안 형태적으로 이상유무를 확인 할 수 있다.

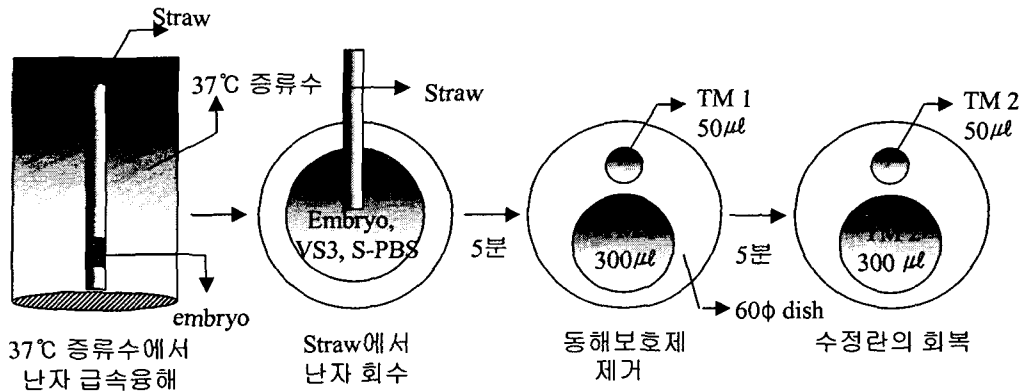


그림 4. 용해과정

② 용해 후 추가 배양

용해가 완료된 배반포는 배양액내에서 추가 배양을 실시한다. Vajta (1997)등이 보고에서 수정란의 초미세구조를 전자현미경으로 관찰한 결과 4시간 배양시 mitochondria와 세포의 미세구조가 파괴된 상태를 나타냈지만, 24시간이 지난 후에 mitochondria의 회복과 blastocoele의 약간의 손상을 보일 뿐 용해 후 4시간에서 보다 높은 세포의 회복이 나타났다. 이런 결과에 따라 배반포 단계의 동결은 용해 후 24시간 동안 추가 배양 후 생존을 판정이 요구되며, 용해직 후 세포의 손상이 보이더라도 회복될 수 있음을 나타내고 있다. 또한 용해 후 배양 조건에 따라서 생존율에 차이를 나타낸다. Kaidi (1998)등의 보고에 따르면 BRL cell (buffalo rat river cell)과 granulosa cell을 공배양시 더 높은 생존율을 나타냈지만, 동결, 용해 과정을 통한 세포 손상이 생존율에 더 많이 관여 할 것이라고 보고하였다.

③ 배반포의 생존과 수정란 이식

배반포의 생존성 판단은 융해 후 동결하기전 배반포의 형태를 나타내는 것과 추가 배양 이후 확장배반포, 탈출배반포 단계까지 발달된 것을 생존한 수정란으로 판단한다.

동결-융해 후 수정란의 질을 판단하기 위해서는 현미경하에서 세포막과 세포질의 변화를 관찰하여야 하며, 배양 24시간 후 형태학적으로 회복된 배반포만을 선택해 수정란 이식에 사용해야 할 것이다.

IV. 최근 개발된 동결방법

현재 초자화동결법 이외에도 Open Pulled Straw (OPS) vitrification, EM grid, cryo-loop 동결법 등이 개발되어 높은 생존율을 얻고 있다. vitrification 법은 기존에 사용하는 0.25ml straw에서 수정란이 들어가는 부분을 늘려 적은 양의 동결보호제와 동결 straw의 두께를 얇게 개선하여 동결율과 융해율을 높인 방법으로 소 수정란과 돼지 수정란에서 높은 생존율을 나타내고 있다. EM grid는 microscopy에 사용되는 EM grid를 이용한 것으로 적은 양의 동결보호제와 액체질소가 직접 난자와 접촉하여 동결율과 융해율을 높였으며, 소 배반포 단계와 미 수정란에서 높은 생존율을 나타내고 있다. cryo-loop은 nylon-loop라고도 하며, 나일론을 고리처럼 만들어 난자만을 nylon-loop에 넣어 EM grid와 같은 조건하에서 동결율과 융해율을 높였다. 이런 새로운 동결 방법들은 동결율과 융해율을 높이는데 초점이 맞춰져 있으며, 동결되는 방법에 따라 동결보호제를 선택함으로써 높은 생존율을 얻을 수 있다. 그러나 급속동결법에 따른 동결율과 융해율은 조절할 수 없기 때문에 여러 가지 문제점을 나타내고 있다. 한편 미 수정란의 동결시 세포의 변화와 염색체의 손실이 일어나 이것을 방지하기 위한 Taxol 처리나 cycloheximide등을 처리하여 미 수정란까지도 동결에 성공하고 있다.

V. 결 론

체외 배양기술의 발달과 수정란 이식의 수요도가 높아짐에 따라 수정란의 보존은 절실히 필요하게 되었다. 이러한 보존기술은 체외에서 사용되는 생명공학기술과 부합되어 발전되었고, 생명공학 기술의 상업적인 활용을 위해서 많은 연구가 진행되어 왔으며, 현재 생명공학 기술의 한 부분으로서 자리 잡게 되었다. 동결보존 기술은 초자화동결을 사용해 보다 간편하고 실용적이며, 누구나 사용할 수 있는 상업적인 기술로 발전되고 있지만, 동결율과 융해율에 따른 조절의 어려움과 동결보호제 처리시 세포 독성에 따른 세포상해, 제작자에 따른 생존율의 차이를 나타내고 있어 아직 까지 완전한 기술로 확립되고 있지 못하고 있다. 따라서 초자화 동결보존법은 보다 간편하며, 누구나 사용할 수 있는 기술로 발전시켜야 하며, 사용자간에 동일한 생존율을 나타낼 수 있는 기술로 개선해야하며, 수정란 이식시 보다 간편한 방법과 재료를 개발해야만 할 것이다.

VI. 참고문헌

- Bank H and Maurer R.R. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Exper. Cell Res.*, 89:188-196.
- Bilton R.J and Moore N.W. 1976. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. *Aus. J. Biol. Sci.*, 29:125-129.
- Brackett B.G and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12:260-274.
- Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka j, Miki Y, Seike N and Kainuma H. 1993. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylen glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, 45:427-433.
- Kaidi S, Donnay I, Van Langendonck A, Dessy F and Massip A. 1998. Comparison of two co-culture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. *Anim. Reprod. Sci.*, 52:37-50.

- Kashiwazaki N, Ohtani S, Nagashima H, Yamakawa H, Cheng W.T.K, Lin A-C, Ma R.C-S and Ogawa S. 1991a. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C . *Theriogenology*, 35:221.
- Kashiwazaki N, Ohtani S, Miyamoto K and Ogawa S. 1991b. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C . *Veterinary Record*, 128:256-257.
- Luyet B.J. 1937. The vitrification of colloids and protoplasm. *Biodynamica*, 1:1-14.
- Massip A, Mermillod P, Van Langendonck A, Touze J.L and Dessy F. 1995. Survival and viability of fresh and frozen-thawed in vitro bovine blastocysts. *Reprod. Nutri. Dev.*, 35:3-10.
- Mtango N.R, Varisanga M.D, Dong Y.j, Otoi T and Suzuki T. 2001. The effect of Prefreezing the diluent portion of the straw in a step-wise vitrification process using ethylene glycol and polyvinylpyrrolidone to preserve bovine blastocysts. *Cryobiology*, 42:135-138.
- Rall W.F and Fahy G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Saito N, Imai K and Tomizawa M. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 41:1053-1060.
- Suzki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H and Oe M. 1993. Pregnancy rate and survival in culture of in vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology*, 40:651-659.
- Sommerfeld V and Niemann H. 1999. Cryopreservation of bovine in vitro produced Embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38:95-105.
- Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T and Kasai M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocytes, derived by in vitro maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:266-271.
- Thibier M. 1995. Statistics of the worldwide embryo transfer industry. *IETS Embryo Transfer Newsletter*, 13:18-21.
- Trounson A.O and Mohr L. 1983. Human pregnancy following cryopreservation,

- thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305:707-709.
- Vajta G, Hyttel P and Callesen H. 1997. Morphological changes of in-vitro -produced bovine blastocysts after vitrification, in-staw direct rehydration, and culture. *Mol. Reprod. Dev.*, 48:9-17.
- Whittingham D.G. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233:125-126
- Whittingham D.G. 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. fertil.*, 43:575-578.
- Willadsen S.M, Polge D, Rowson L.E.A and Moor R.M. 1974. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 11:560.
- Wilmot I and Rowson L.E.A. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record*, 92:686-690.
- Wurth Y.A, Reinder J.M.C, Rall W.F and Kruip Th.A.M. 1994. Developmental potential of in vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology*, 42:1275-1284.
- Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y and Hachinohe Y. 1982. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 32:399-403.
- Zang L, Barry D.M, Denniston R.S, Bunch T.D and Godke R.A. 1993. Birth of live calves after transfer of frozen-thawed bovine embryos fertilised in vitro. *Verterinery Record*, 132:247-249.