

생쥐 體外受精卵의 超急速凍結 및 移植에 關한 研究
Ⅲ. 생쥐 體外受精卵의 超急速凍結-融解卵의 移植에 關하여

張奎泰 · 閔觀植 · 吳錫斗* · 姜大珍 · 尹昌紘
慶尙大學校 農科大學

Studies on Transfer of *In Vitro* Fertilized Mouse Embryos
Following Ultrarapid Freezing
Ⅲ. A Study on Transfer *In Vitro* Fertilization Mouse Embryos
Following Ultrarapid Freezing-Thawing

Chang, K.T., K.S. Min, S.D. Oh*, D.J. Kang and C.H. Yun
College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

These studies were carried out to investigate on the transferred embryo development following ultrarapid frozen for 8-cell and morula of *in vitro* fertilization mouse embryos. The post-thaw embryo survival was evaluated and compared by cell stage of embryos and by equilibration time before ultrarapid freezing.

The results obtained were summarized as follows:

1. The effects of equilibration time of 3 vs. 6 minutes before ultrarapid freezing and after thawing on the morphological survival and the viability of 8-cell and morulas embryos were not significant.
2. When the ultrarapid frozen-thawed 32 eight-cell and 33 morula embryos, and 30 fresh blastocysts were transferred to pseudopregnant recipient mice, the number of normal offsprings produced were 9(28.1%), 14(42.4%) and 18(60.0%), respectively.

From the above results, it was concluded that the optimal conditions of pH osmolality of the media for mouse IVF and embryo culture, and the period of sperm preincubation might be 7.1, 310 mOsm and 120 min., respectively, and somewhat high conception rate might be resulted from transfer of frozen embryos of morula stage and fresh embryos of blastocyst stage.

(Key words: IVF, 8-cell, morulae, blastocyst, ultrarapid freezing, vitrification solution, embryo transfer)

I. 緒 論

생쥐 受精卵은 Whittingham(1971)이 처음으로

凍結 保存을 成功한 以後로 多數의 研究 結果가 報告
되었다(Wilmot, 1972; Whittingham等, 1972;
Wood와 Farrant, 1980; Kasai等, 1980; Miyamoto

*晉州農林專門大學(Chinju Nat'l Agriculture & Forestry Junior College)

와 Ishibashi, 1986; Szell과 Shelton, 1986; 1987; Kono와 Tsunoda, 1987; Friedler等, 1988; Cosby等, 1990). 凍結 受精卵의 融解後 生存率에 미치는 主要 要因으로서의 東害保護劑 凍結 및 融解速度 등 여러 要因들이 關聯 되어 있다. 이들 各 要因들과 受精卵의 生存率과의 相互關係가 物理的, 化學的으로 證明됨으로써 動物의 種과 受精卵 自體의 發育 段階에 따른 各種 凍結 및 融解方法들이 提示 되어지고 있다 (Parkening等 1977; Kasai等, 1981; Schmide等, 1985; Miyamoto와 Ishibashi, 1986; Biery等, 1986).

한편 Fahy等(1984)과 Rall과 Fahy(1985)에 의하여 처음으로 Vitrification 凍結 方法(초자화 동결방법)이 提示 되었으며, 이 凍結方法은 20.5%의 DMSO+15.5% acetamide+10% propyleneglycol +6% polyethylene glycol이 含有된 凍結保存液을 使用하여 常溫(25% VS₁)과 4℃(75% VS₁, 90% VS₁ 溶液)에서 생쥐의 8細胞 受精卵을 段階的脫水에 依한 方法으로 LN₂에 浸漬한 結果 融解後 87.4%의 아주 높은 生存率을 얻을 수 있었고, 그後 Rall(1987)은 이러한 方法을 追試한 結果 VS₁의 初期胚 凍結에는 有毒性이 強하여 높은 生存率을 얻을 수가 없다고 하였고, VS₃(6.5M glycerol + 6.0M polyethylene glycol)를 開發하여 初期胚에서 높은 生存率과 體外 發生率(85% 以上)을 報告 하였다. VS₁ 方法을 利用한 凍結方法으로 Scheffen等(1986)과 Kono等(1988)은 생쥐 및 家兔의 8細胞卵을 利用하여 胚盤胞까지의 높은 生存率을 報告함으로써, VS₃의 凍結方法이 높은 生存率을 얻을 수 있는 招急速凍結方法으로 재차 確認 되었고, Smorag等(1989)은 이러한 方法으로 1細胞 및 2細胞卵을 凍結한 結果 各各 20%와 43.8%로서 VS₃의 限界域을 報告하여 多少 相異한 結果를 報告하였다. 또한 Massip等(1986)은 생쥐胚와 牛의 胚를 10% glycerol과 20% 1,2propanediol로 製造된 凍結保存液을 利用하여 常溫에서 脫水過程을 實施하는 vitrification법으로 높은 體外 發生率(80%; 53.8%)과 受胎率(39.1%)을 얻을 수 있었다고 報告 하였다. 그러나 最近 Trounson等(1987)은 생쥐 2細胞胚를 效率的으로 凍結할 수 있는 招急速凍結(Ultrarapidly freezing)法을 提示 하였는데 3.5M

sucrose溶液을 利用하여 常溫에서 2~2.5分間 平衡을 實施한 後 LN₂에 바로 浸漬하는 方法으로 融解後 65%의 生存率과 62%의 胚盤胞期까지 發達하는 좋은 成績을 얻을 수 있다고 하였고, 이러한 結果는 初期胚의 緩慢 凍結方法을 實施한 成績과 差異가 없다고 하였다. 이러한 凍結方法으로 Boone等(1988)에 依하여 追試 되었던바 胚盤胞胚까지의 發達이 52%로 報告됨으로써 硝子化 凍結方法이 생쥐 初期胚 凍結保存에 效果的인 方法으로 그 可能性이 再確認 되었으며, 그에 따라 Trounson等(1987)은 이러한 方法을 약간 變更(凍害保護劑 種類, straw loading方法 및 液體 窒素 浸漬方法)하여 생쥐 桑實胚 境遇 아주 높은 生存率(96%)과 體外 發生率(95%)을 報告하였다. 凍結-融解한 胚를 移植한 報告로서는 Whittingham等(1972)이 凍結-融解한 생쥐胚를 118마리에 移植하여 77(65%)마리가 受胎되었으며 13마리에서는 120餘個의 凍結融解한 胚가 着床하여 57(48%)마리의 產存을 얻을 수 있었고, Kasai等(1980)은 생쥐胚를 急速凍結-融解한 26個의 桑實胚를 移植하여 11마리의 產存量, Miyamoto와 Ishibashi(1986)는 118個의 胚盤胞를 9마리에 移植하여 4마리가 受胎되어 36(31%)마리의 產存量, Reichenbach와 Rodrigues(1988)는 桑實胚 및 初期 胚盤胞胚를 凍結 融解後 移植하여 47%의 受胎率을 얻을 수 있었다고 各各 報告 하였다. 반면 體外 受精後 凍結 融解를 實施한 胚의 移植에 關한 報告는 그다지 많지 않으나, Massip等(1984)은 體外 受精後 1細胞 또는 2細胞期까지 培養한 생쥐의 受精卵을 凍結 融解하여 移植한 結果 40% 및 53%의 受胎率을 얻을 수 있었다고 報告 하였다.

따라서 本 實驗은 ICR系統 생쥐 體外受精卵의 8細胞胚와 桑實胚를 招急速凍結-融解하여 體外培養後 胚盤胞胚까지 發生된 胚를 偽妊娠 된 受卵쥐에 移植하였을 때 受胎率 및 產存 生産에 어느정도 影響을 미치는 지를 檢討코져 本 實驗을 進行하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 供試材料의 準備

本 實驗에 使用된 供試動物은 ICR系統 F₁ 생쥐로써 供卵 생쥐는 4~6週齡의 (體重 15~20g), 受卵 생쥐

C	SD	A	****	A*	SP
---	----	---	------	----	----

Fig. 1. Ultrarapidly freezing apparatus with straw loaded as indicate:

C:Cotton plug **SD:**0.5M sucrose diluent(7.0cm)

A:Air bubble(0.5cm) ******:**Embryos in VS₃(1.5cm)

A*:Air bubble(1.0cm) **SP:**Straw powder(0.5cm).

Each vitrification solution[6.5M glycerol + 6.0%(wt/vol)polyethylene glycol(PEG)] contains concentration of a D-PBS(3mg/ml BSA) and in adjusted pH 7.8 to 8.0.

는 10~12週齡(體重 15~35g) 僞妊娠用 수컷 생쥐는 10~12週齡(體重 30~35g)의 생쥐를 供試 하였다. 飼育管理는 一般慣行法(溫度: 21~24℃, 點燈: 14時間, 消燈: 10時間)에 따라 管理 하였으며 飼料와 물은 自由給食 시켰다. 한편, 過排卵 誘起 및 卵자의 回收, 受精液의 製造, 精자의 準備와 受精能獲得과 體外受精 및 受精卵의 判定은, 本報 생쥐 體外受精卵의 超急速凍結 및 移植에 關한 研究(I. pH, 滲透壓 및 精子 前培養處理가 생쥐 體外受精率이 미치는 影響)에 記載된 材料 및 方法에 準하였다.

2. 招急速凍結保存液의 組成

凍結液의 組成은 Rall과 Fahy(1985)의 方法에 準하여 凍害保護劑의 濃度는 6M의 glycerol+6.5%(w/v)의 polyethylene glycol(PEG)을 基準液 D-PBS(3mg/ml BAS 包含)에 混合하였고, sucrose 濃度는 0.5M이 되게 調劑하였으며, 使用直前 0.2 μ m Syringe filter(Gelman Sci. 美國)로 濾過 滅菌한 다음 使用하였다.

3. VS₃에 依한 受精卵의 招急速凍結 및 融解方法

體外受精後 發育되어진 생쥐의 8細胞 및 桑實胚를 VS₃에 依한 平衡 時間은 3分 과 6分으로 區分하였고 straw內의 受精卵 및 保護劑의 loading은 Fig. 1과 같은 方法으로 straw當 8~10個씩 受精卵을 注入한 後, LN₂에 浸漬되어져 있던 canister hole內의 上端部位에서 液體窒素 蒸氣에 2~3秒間 靜置한 後 바로 LN₂(liquid nitrogen)에 浸漬하는 方法으로 凍結을 實施하였다. 融解는 straw를 液體窒素에서 꺼낸 即時

40℃溫水 water bath內에서 15秒間 實施 하였는데, 浸漬 即時 서서히 흔들면서 急速融解 하였다. 融解가 끝난 straw는 straw powder 部分이 아래로 向하게 한 後 切斷하고, straw 內容物을 watch glass에 收集하여 新鮮한 培養液으로 2回 洗滌하여 培養에 供試 하였다.

4. 凍結 및 融解卵의 生存性 判定 및 培養

凍結 融解한 胚는 watch glass에서 實驗區別로 平衡을 維持한 다음 形態學的으로 正常的이며 透明帶內의 細胞(割球)가 완전한 8細胞 및 桑實胚를 選別하여 新鮮한 培養液(D-PBS+3mg/ml BSA 包含)으로 2回 洗滌後 37℃의 CO₂培養器內에서 胚盤胞까지의 發育狀態를 調査하였다.

5. Recipient의 處理 및 胚의 移植

移植에 使用되어진 胚는 胚盤胞까지 正常的으려 發育한 胚만을 選別하여 實施하였고, 移植을 爲한 僞妊娠의 誘起는 vasectomized된 숫놈과 1:1로 同居시키고 翌日 午前 plug가 確認된 個體를 僞妊娠 第1日로 定하였으며, 僞妊娠 4.0~4.3日째 ether로 吸入 麻醉시키고 左右側 옆구리에 1.0cm가량 切開하여 子宮을 露出 시킨 後, 27 1/2 guage needle로 子宮角 先端部位에 小孔을 만든 後 內徑이 110~130 μ m의 크기로 製作된 mouth tube가 달린 paster pipette으로 胚를 移植 하였다. 胚의 移植은 8~13個의 胚를 3~5 μ l의 培養液과 함께 注入하고 移植時에는 pipette內의 空氣層이 注入되지 않게 培養液 + 胚 만을 子宮內에 注入하였다. 注入後 子宮을 還元시키고 縫合 및 消毒

을 하였다. 過排卵 誘起를 한 생쥐의 卵자의 回收로부터 移植까지 모든 實驗過程을 無菌箱子(Biological Safety Cabinet, Howorth Air Engineering, Cless II, 英國)內에서 實施하였다.

6. 受卵쥐의 管理 및 産存數 調査

凍結-融解胚 및 正常胚를 移植 받은 생쥐는 cage當 1마리씩 넣어 慣行法따라 飼育管理를 하였으며 分娩後 産存數를 調査하였다.

7. 統計學的 分析

體外受精卵의 招急速凍結-融解後의 胚 生存性 그리고 胚의 移植等에 關한 모든 處理群들의 data는 Minitab Computer Statistical Program Package(Minitab Inc. 1989)를 利用하여 χ^2 -Test에 依한 有意性($p < 0.05$)檢定하였다.

III. 結果 및 考察

1. 8細胞胚 및 桑實胚의 招急速 凍結-融解後 發生率

體外受精 後 8細胞 및 桑實胚까지 體外培養되어진 胚를 Vitrification(VS₃)方法에 依하여 招急速 凍結 및 融解를 實施 하여 凍結時 平衡時間이 胚盤胞까지 體外發生에 미치는 影響은 Table 1에서 보듯이와 같다. 8細胞에서 平衡時間에 따른 生存率은 56.7% 및 58.1%였고, 胚盤胞까지의 體外 發生率은 47.1% 및 50.0%로 有意差($P > 0.05$)는 認定되진 않았으며 또한 桑

實胚의 境遇는 平衡時間에 따라 凍結-融解後 生存率은 55.9% 및 60.0%였고, 胚盤胞까지의 體外 生存率은 54.5% 및 55.6%로서 또한 有意差($P > 0.05$)는 認定되지 않았다. 그러나 本 實驗에서 8細胞 및 桑實胚를 招急速凍結-融解時 平衡時間에 따라서는 共히 3分보다는 6分의 平衡時間이, 그리고 8細胞胚보다는 桑實胚를 凍結-融解 하였을 때 多少 良好한 成績을 얻을 수 있었다. 本 實驗에서 體外受精卵의 招急速凍結-融解後 얻은 生存率은 Rall(1987)이 Vitrification方法으로 85%의 生存率의 結果보다는 훨씬 낮은 成績이었고, 또한 Trounson等(1987)이 招急速凍結 및 融解를 實施 하여 얻은 成績 보다는 多少 낮은 成績 이었다. 또한 Smorag等(1989)도 8細胞 및 桑實胚를 招急速凍結-融解하여 90%以上の 生存率을 얻을 수 있었으나, 初期胚에서는 아주 낮은 成績(20~40%)이었다고 報告 하였다. 本 實驗에서 얻은 結果와 報告 되어진 成績들에 對한 差異는 本 實驗에서는 體外受精卵을 凍結時에 供試 함으로서 오는 原因으로 推測된다. Leibo等(1974)은 受精卵 細胞막의 傳道性과 溫度 常數에 依하여 크게 影響을 받는다고 하였고 Willadsen等(1978)은 凍結速度 및 最終 冷却溫度에 依하며, Leibo等(1974)과 Rall等(1984)은 凍結速度와 融解速度間의 相互關係가 絕對的 影響을 미칠수 있다고 各各 報告하였다. 그러나 Trounson等(1987)은 招急速凍結 方法과 凍害保護劑의 種類 및 助成이 影響을 크게 미친다고 하였고, Wilton等(1989)과 Biery等(1986)은 凍害保護劑의 種類 및 straw loading方法, 그리고 平衡

Table 1. In vitro development to blastocysts after ultrarapid freezing and thawing in VS₃ fo in vitro fertilized mouse embryos of 8-cell and morula stage

Cell stage	No. of embryos	Time in VS ₃ (min)	No. of normal embryos after freezing-thawing	No. of embryos blastocysts
8-cell	122	3	34(56.7) ^a	16(47.1) ^a
		6	36(58.1) ^a	18(50.0) ^{ab}
Morula	119	3	33(55.9) ^a	18(54.5) ^{ab}
		6	36(60.0) ^a	20(55.6) ^b
Control	95	—	—	34 / 95(35.8)

():Percentage.

1) Equilibration time.

Figures in columns with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

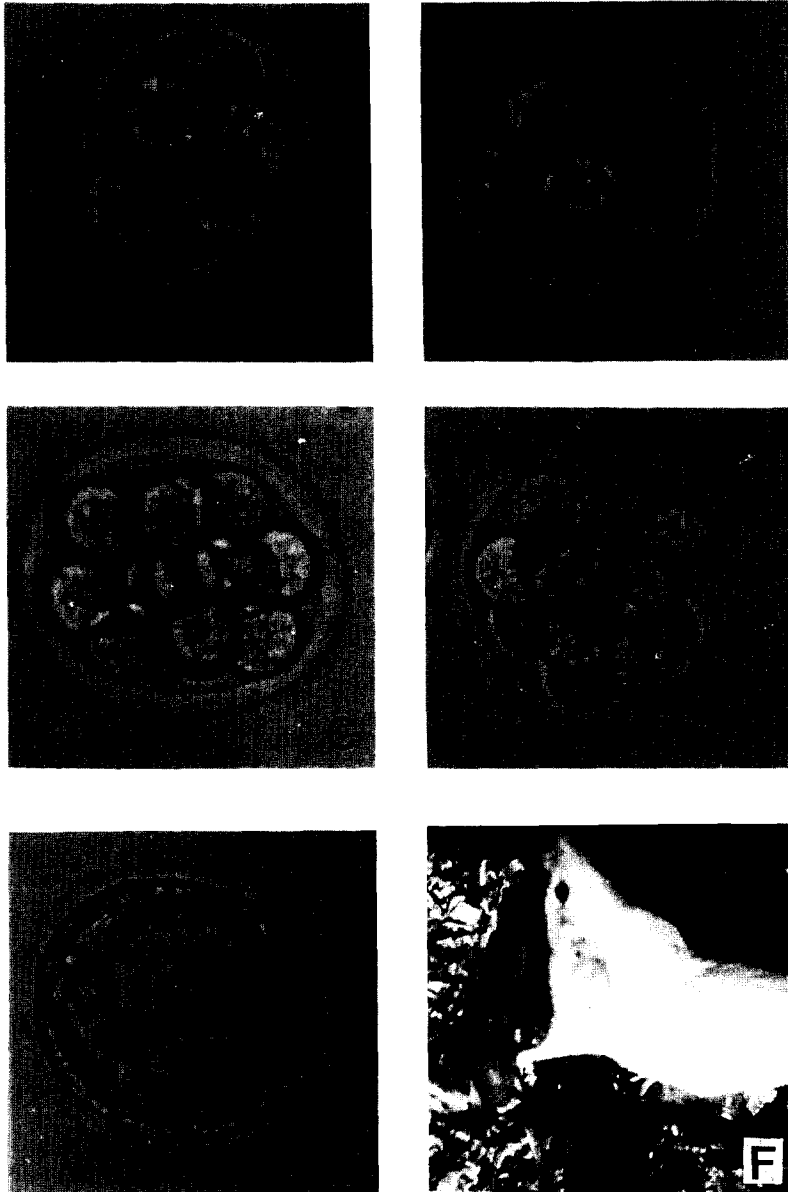


Fig. 2 A and B) An 8-cell and morulae embryos before ultrarapid frozen, C) and D) an 8-cell and morulae embryos after ultrarapid frozen-thawed, E) a blastocysts embryos after ultrarapid frozen-thawed and *In vitro* cultured F) an offspring produced by transfer of ultrarapid frozen-thawed embryos to recipient(A,B,C,D, and E $\times 200$).

時間等이 招急速凍結時 受精卵의 生存率에 絶對的 影響을 미친다고 報告하였다. 비록 本 實驗에서 體外 受精卵의 招急速凍結 및 融解時에 얻은 生存率은 正常卵에 比하여 낮지만 充分한 平衡時間과 浸透性 및 非浸透性 凍害保護劑의 濃度를 알맞게 調節하고 또한 straw loading 方法을 提高하여 追試 한다면 良好한 成績을 期待할 수 있을것으로 思料 되어진다.

2. 招急速凍結-融解에 따른 胚 移植後 産存 生産

體外 受精後 8細胞 및 桑實胚를 招急速凍結-融解後 胚盤胞까지 體外發生된 胚를 受卵귀에 移植 하였을때 産存 生産 結果는 Table 2에서 보는 바와 같다. 8細胞 및 桑實胚에서 各各 32個와 33개를 融解後 胚盤胞까지 體外 發生된 胚를 各各 3匹의 受卵귀에 나누어 移植하여 9匹(28.1%) 및 14匹(42.4%)의 産存를 正常的으로 分娩 하였고, 凍結을 實施치 않고 胚盤胞까지 體外 發生된 30個의 胚를 3匹의 受卵귀에 移植 하였을때는 18匹(60.0%)의 産存을 얻을 수 있어 各 處理區間에 有意差($P < 0.05$)가 認定 되었다. 本 實驗에서 얻은 成績은 Nakagata(1989)가 vitrification 方法에 依하여 未受精卵를 凍結 融解後, 體外 受精을 實施하고 體外 發生된 胚를 移植하여 40~60%의 受胎率을 얻은 結果와 거의 類似한 成績이었고, Massip等(1984)이 생쥐의 卵子를 體外 受精後 培養, 凍結 過程을 거치면서 移植 하였을때의 成績(50%程度)과도 類似한 成績이었다. 그러나 Kono와 Tsunoda(1987)는 생쥐의 桑實胚와 胚盤胞胚를 vitrification 方法으로 凍結-融解하여 移植하여 얻은 植時 높은 受胎率을 얻을 수 있었다고 報告하였으며, Nagashima等(1984)은 생쥐의 桑實胚를 分割하여 凍結 融解後 移植 하였을때 25~30%의 受胎率 成績보다는 本 實驗에서 多少 높은

受胎率을 얻을수 있었다.

IV. 摘要

本 實驗은 ICR系統 생쥐 體外 受精卵의 8細胞胚와 桑實胚를 招急速 凍結-融解하여 體外 培養後 胚盤胞胚까지 發生된 胚를 爲妊娠 된 受卵귀에 移植하였을때 受胎率 및 産存 生産에 어느정도 影響을 미치는지를 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 體外 受精後 8細胞胚 및 桑實胚까지 體外 發生된 胚를 招急速凍結-融解하는 方法으로 平衡時間을 3分과 6分을 實施하여 生存率을 檢討하는 한편, 胚盤胞胚까지의 體外 發生率을 調査한 結果 큰 差異가 없었다.

2. 8細胞胚 및 桑實胚를 招急速凍結-融解後 體外 培養하여 正常的으로 胚盤胞胚까지 발달되어진 胚를 爲妊娠된 受卵귀에 移植하였을때 成績은 各各 9匹(28.1)과 14匹(42.4%)이, 그리고 正常 胚盤胞의 移植時는 18匹(60.0%)이 正常 分娩되어 各 處理區間에 有意差($P < 0.05$)가 認定 되었다.

以上과 같이, 생쥐 體外 受精卵를 招急速凍結-融解하여 移植하였을때 미치는 影響을 調査 하였으나, 體外 受精液의 最適 條件은 pH 7.1, 滲透壓 310 mOsm 및 精子 前培養 處理時間 120分으로 나타났으며, 體外 受精後 8細胞胚와 桑實胚를 招急速凍結-融解하는 方法으로 胚盤胞胚까지 體外 培養하여 移植하였을때 結果는 8細胞胚 보다는 桑實胚가 良好한 成績을 얻을수 있었다.

V. 引用文獻

1. Biery, K.A., G.E. Seidel, Jr. and R.P.

Table 2. Viability of *in vitro* development to blastocysts after ultrarapidly freezing-thawing in VS₃ when transferred to pseudopregnant recipient

Treatment group	No. of recipients	No. of embryos transferred	No. of recipient pregnant	No. of fetuses
8-cell	3	32	2	9(28.1) _a
Morulae	3	33	3	14(42.4) _b
Control	3	30	3	18(60.0) _c

- Elsden, 1986. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into LN₂. *Theriogenol.* 25:140(Abstr.).
2. Boone, W.R., C.A. Brown, Z.M. Vasquez and S.S. Shapiro. 1988. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programmable freezer. *Fertil Steril.* 50(2):348-354.
 3. Cosby, N.C. and W.R. Dukelow. 1990. Microencapsulation of single, multiple and zona pellucida free mouse preimplantation embryos in sodium alginate and their development *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 90:19-24.
 4. Fahy, G.M., D.R. MacFarlane, C.A. Angell and H.T. Merymen. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiol.* 21:407-426.
 5. Friedler, S., L.C. Giudice and E.J. Lamb. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril.* 49(5):743-764.
 6. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 61:175-180.
 7. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.* 59:51-56.
 8. Kono, T. and Y. Tsunoda. 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33:77-81.
 9. Kono, T., O. Suzuki and Y. Tsunoda. 1988. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiol.* 25:170-173.
 10. Ldibo, S.P., P. Mazur and S.C. Jackowski. 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp. Cell Res.* 89:79-88.
 11. Massip, A., P. Van Der Zwalmen, B. Scheffen and F. Ectors. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letter.* 7:270-273.
 12. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 78:471-478.
 13. Nagashima, H., K. Matsui, T. Sawasakai and Y. Kono. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fert.* 70:357-362.
 14. Nakagata, H. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.* 87:470-483.
 15. Parkening, T.A., Y. Tsunoda and M.C. Chang. 1977. 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.
 16. Rall W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiol.* 24:387-402.
 17. Rall, W.F. and G.M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Cryobiol.* 24:387-402.
 18. Rall, W.F., D.S. Reid and C. Polge. 1984. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical method. *Cryobiol.* 21:106-121.
 19. Reichenbach, H.D. and J.L. Rodrigues. 1988. Survival of mouse morulae and early blastocysts after direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenol.* 29:294(Abstr.).
 20. Scheffen, B., P. Van Der Zwalmen and A. Massip. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letter.* 7:260-269.
 21. Schmidt, P.M., M.C. Schiewe and D.E. Wildt. 1985. Variables influencing post-thaw

- embryo survival rates in mouse. *Theriogenol.* 23:229(Abstr.).
22. Smorag, Z., B. Gajda, B. Wiczork and J. Jura. 1989. Stage-dependant viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenol.* 31:1227-1231.
 23. Szell, A. and J.N. Shelton. 1986. Sucrose dilution of glycerol from embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.* 76:401-408.
 24. Szell, A. and J.N. Sheton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 80:309-316.
 25. Trounson, A.O., A. Peura and C. Kirby. 1987. Ultrarapidly freezing: A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril.* 48:843-850.
 26. Whittingham, D.G. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. (Suppl).* 14:7-21.
 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.
 28. Willadsen, S., C. Ploge and L.E.A. Rowson. 1978. The viability of deep-frozen cow embryos. *J. Reprod. Fert.* 52:391-393.
 29. Wilmut, I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Science.* 2:1071.
 30. Wilton, L.J., J.M. Shaw and A.O. Trounson. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril.* 51(3):513-517.
 31. Wood, M.J. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiol.* 17:178-180.