大韓獸醫學會誌(1995) 第35卷 第3號
Korean J Vet Res(1995) 35(3): 635-641

Vitrification 방법에 의한 토끼수정란의 동결에 관한 연구*

최상용 · 이영락 · 노규진 · 이효종 · 박충생*
경상대학교 수의과대학, 농과대학*
(1995년 5월 8일 접수)

Cryopreservation of rabbit embryos by vitrification*

Sang-yong Choe, Young-rak Lee, Gyu-jin Rho, Hyo-jong Lee, Choong-saeng Park*
*College of Veterinary Medicine, and Agriculture** *Gyeongsang National University*
(Recevied May 8, 1995)

Abstract : The purpose of this study was to investigate the effects of developmental stage and equilibration time on survival of rabbit embryos following freezing by vitrification.

Adult New Zealand White female rabbits were superovulated with PMSG and hCG. The 8-cell stage embryos were collected from 40 to 45 hours after hCG injection by flushing oviducts with Dulbecco's phosphated buffered saline and *in vitro* cultured in TCM-199 containing 10% fetal calf serum(FCS).

Each embryos developed *in vitro* to 16-cell, compact morula and blastocyst was cryopreserved and cultured following thawing to examine their developmental potential to expanded blastocyst stage *in vitro*. The frozen-thawed-cultured embryos were stained with Hoechst 33342, and their nuclei were counted using a fluorescence microscope.

On the toxicity test of EFS solution as cryopreservation, the survival rates of 8-cell stage embryos was decreased in reverse to increasing of exposure time over 5 minutes.

The post-thaw survival rates of embryos on equilibration times was significantly($P < 0.05$) higher for 2 min. than for 5 or 10 minutes. From morula to blastocyst of rabbit embryos was more suitable than 8-cell stage for cryopreservation by vitrification. The higher post-thaw survival rate of embryos can be achieved by keeping the cryoprotectant at 4℃ than at 20℃.

The mean number of nuclei per embryo following freezing by vitrification and *in vitro* culture to expanded blastocyst at compacted morula and blastcyst was not significantly differ from fresh blastocyst.

Key words : rabbit, vitrification, equilibration time

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.
Address reprint requests to Dr Sang-yong Choe, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

서 론

수정란의 동결보존은 이식가능한 수정란을 낭비됨이 없이 유효하게 이용 가능하며, 계획적인 이식 프로그래밍을 설정할 수 있고, 후대검정을 하지 않은 수정란을 동결보존해 두었다가 후대검정에 의하여 우수한 수정란으로 판정되었을 때 이용할 수도 있다. 가축 동결보존수정란의 유통이 활발하게 되면 우량유전형질의 도입이 용이하여 세계적 규모로 확대가 가능하고, 특수동물의 종족 보존 또는 특정품종의 계통 유지가 저렴한 가격으로 공급될 수 있는 장점을 가지고 있다. 동결보존기술이 위와 같은 목적으로 이용되기 위해서는 동결수정란이 융해 후 생존율이 높아야 되며 또한 동결 · 융해방법이 간소화되어야 실용적인 가치가 있게 될 것이다.

Whittingham et al[22]과 Wilmut[24]는 완만동결법을 이용하여 생쥐수정란에서 동결을 성공시킨 이래, 동결과정을 간편화하고, 동결융해 후의 생존율 향상을 위하여 많은 연구가 진행되어 왔다[3,14,23,26].

Dimethylsulfoxide(DMSO), glycerol, 1.2-propanediol, ethanol 등과 같은 투과성 내동제로 세포내의 수분을 탈수시키는 완만동결법은 동결과 융해를 위해서 많은 시간이 소요되며 또한 동결과정 중에 세포 내부구조를 파괴시키는 빙정형성율이 높았다. 그러나 sucrose, raffinose, proteins 같은 비투과성 내동제를 동결액에 첨가하면 간단한 방법으로 수정란을 급속동결할 수 있게 되므로서 동결보존액 중 세포내부를 보호하는 투과성물질과 세포외부를 보호하는 비투과성물질의 이용에 대한 많은 연구가 진행되었다[5,7,12].

1985년 Rall과 Fahy[11]는 20.5% DMSO, 15.5% acetamide, 10% propylene glycol 및 6% polyethylene glycol이 포함된 혼합액을 동결보호제로 이용한 빙정이 형성되지 않는 vitrification 방법을 보고하였으나 높은 삼투압 및 화학적 독성에 의한 세포질의 파괴와 저온(4℃)에서 조작하여야 하는 단점이 제기되었다. Szell과 Shelton[14,15]은 동결보존액에 비투과성 동결보호제인 10-20% sucrose를 첨가하여 급속동결 하였을 때 높은 생존율을 얻었다고 보고하였고, Scheffen et al[13]은 높은 삼투압 및 화학적 독성의 영향을 줄이기 위하여 실온에서 세포내 초자화용액으로 평형시킨 후 저온의 세포외 초자화용액으로 수정란을 옮겨 최소한의 시간이 경과한 다음 액체질소에 침적하는 방법을 개발하였다. Kasai et al[2]은 생쥐 수정란을 실온에서 40% ethylene glycol과 30% Ficoll, 0.5M sucrose가 첨가된 EFS 용액을 이용하여 동결 · 융해 했을 때 높은 생존율을 얻었으며, 이때 사용한 Ficoll 은 초자화를 촉진시키는 거대분자에 속하며, sucrose는 비투과성동결보호제로서 세포내부의 수분이나 융해시 내부세포에 투과되어 있던 동결액을 제거시키는 역할을 하며 이 용액은 독성이 적어 수정란 평형을 위하여 전냉각이 필요하지 않으며 비교적 용이하게 현장에서 응용할 수 있다고 보고한 바 있다.

본 실험에서는 토끼를 모델로 EFS 용액을 이용하여 vitrification 방법으로 동결하면서, 동결 · 융해후 생존율에 대한 EFS 용액의 온도와 평형시간의 영향을 조사하고, 세포 발달단계별로 동결 · 융해후 생존율과 각각의 할구수를 조사하여 vitrification 방법에 의한 수정란의 동결보존에 관한 최적의 조건을 확립하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시동물 및 사양관리 : 본 실험에 사용된 토끼는 New-Zealand White 종으로서 암컷은 생후 3-6개월령의 체중 2.5-3.0Kg인 것을, 수컷은 생후 8개월령 이후의 체중 3.0-4.0Kg인 것을 공시하였고, 농후사료를 1일 2회로 나누어 급여하였으며, 물과 조사료는 자유로이 급식하였다.

과배란유기 및 수정란의 채란 : 성숙된 암토끼에 PMSG(Peamax, Japan) 100IU를 근육주사하고 72시간 후에 2회 이상 반복 자연교배를 실시함과 동시에 hCG (Puberogen, Japan) 75IU를 이정맥주사하여 과배란을 유기하였다. 수정 후 40-45시간에 암토끼를 chloropromazine HCl 0.5mg/Kg을 근육주사하여 전마취를 실시하고, ketamine HCl 0.5mg/Kg을 이정맥주사하여 전신마취시킨 다음 개복수술하여 자궁난관접합부에서 난관누두부로 10% fetal calf serum(FCS)이 함유된 Dulbecco's phosphated buffered saline(D-PBS)을 역관류시켜 8-세포기에 있는 수정란을 회수하여 도립현미경하에서 형태가 정상적인 수정란을 선별하여 사용하였다.

수정란의 체외배양 : 수정란의 관류, 세척 및 동결전처리에는 기본배양액인 D-PBS를 사용하였고, 조작 및 배양액은 56℃ 수조에서 30분간 비동화 처리된 10% FCS 가 첨가된 TCM-199액을 pH 7.2-7.4로 조정하여 0.2μm filter 로 여과한 후 사용하였다. 수정란은 미소적 배양법에 따라 체외배양을 실시하였으며, 배양액은

37℃의 5% CO_2, 대기압 및 포화습도상태인 CO_2 배양기에서 실험 전 2시간 동안 평형시킨 후 사용하였다.

동결보호제(EFS 용액)의 독성검사 : 본 실험에 사용된 동결보호제는 EFS 용액으로 D-PBS(10% FCS)에 40% ethylene glycol(v/v), 18% Ficoll(w/v) 및 0.3M sucrose를 융해 조성하였다. 이와 같이 제조된 EFS 용액에 8-세포기 수정란을 20℃에서 5, 10, 15 및 20 분 동안 각각 평형시킨 후 0.5M sucrose 용액에 5 분간 희석하여 EFS 용액을 제거하고 TCM-199액에 48시간 배양한 후 배반포기까지의 발달여부로 생존율을 관찰하여 독성을 확인하였다.

수정란의 동결 및 융해 : 수정란의 동결은 실온에서 EFS 용액에 2, 5 및 10분간 평형을 실시한 후 0.25ml plastic straw 에 8-10개씩의 수정란을 주입하여 30 초 이내에 -196℃의 액체질소에 침지하였다. 동결된 수정란의 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 20℃의 물에 넣어 10-20초간 흔들면서 융해를 실시하였고, 융해된 수정란을 0.5M sucrose 용액에 5분간 정치시켜 EFS 용액을 제거한 후 TCM-199액으로 3-5회 세정한 다음 배양에 사용하였다.

동결 수정란의 생존성 판정 : 동결 · 융해된 8-, 16-, 상실배기 및 배반포기의 수정란을 토끼 난관상피세포가 단층을 형성하고 있는 TCM-199액에서 8-세포기 수정란은 48시간, 16-세포기 수정란은 36시간, 상실배기 수정란은 24시간 및 배반포기 수정란은 12시간 37℃, CO_2 배양기내에서 체외배양시켜 배반포기까지 발달한 것을 생존한 것으로 판정하였고, Pursel et al[8]의 방법에 의해 배반포기 수정란을 Hoechst 33342(Sigma Chem Co, USA)로 염색하여 형광현미경하에서 핵의 수를 헤아렸다.

통계학적 분석 : 실험결과의 통계학적 분석은 x^2-test 및 Student's t-test 를 실시하여 각 시험군간의 유의차를 검정하였다.

결 과

EFS 용액내에서의 평형시간에 따른 8-세포기 수정란의 생존성 : EFS 용액의 온도를 20℃로 고정하고 평형시간에 따른 8-세포기 수정란이 배반포기 수정란까지 발달한 것의 생존율을 조사한 결과는 Table 1 에서 보는 바와 같다. 평형시간을 5분으로 하였을 때는 95.2%의 생존율을 보였으나, 10, 15 및 20분간 평형시켰을 때는 75.0, 70.0 및 15.0%의 생존율을 보여 5 분간 처리군에서의 생존율과는 유의적($P < 0.05$)인 차이를 보였다. 이와 같은 결과로 보아 EFS 용액에서의 평형시간은 5분 이상 경과하면 생존성이 떨어짐을 알 수 있었다.

Table 1. *In vitro* development of 8-cell embryos exposed to EFS solution for various times at 20℃

Equilibration time(min)	No of embryos	No(%) of embryos developed to	
		Blastocyst	Degenerated
5	21	20(95.2)[a]	1
10	20	15(75.0)[b]	5
15	20	14(70.0)[c]	6
20	20	3(15.0)[c]	17

* Values with different superscripts were significantly($P < 0.05$) different.

EFS 용액내에서의 평형시간에 따른 8-세포기 수정란의 동결 후 생존성 : 토끼 8-세포기 수정란을 EFS 용액에서 2, 5 및 10 분간 평형시킨 다음, vitrification방법으로 동결 · 융해하고 체외에서 48시간 배양하여 그 생존율을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

평형시간 2분에서는 88.2%로 5분(71.2%)과 10 분(61.4%)의 생존율과는 유의적($P < 0.05$)인 차이를 보였다. 이는 평형시간이 2분이상 경과하면 생존율이 낮아지는 경향을 나타내어 향후의 실험은 EFS 용액의 평형시간을 2분으로 고정하여 실시하였다.

Table 2. Effect of equilibration times on *in vitro* development of 8-cell embryos following crypreservation and thawing by vitrification method

Equilibration time(min)	No of embryos	No(%) of embryos developed to	
		Morula & blastocyst	Degenerated
2	76	67(88.2)[a]	9
5	66	47(71.2)[b]	17
10	70	43(61.4)[c]	27

* Values with different superscripts were significantly($P < 0.05$) different.

수정란의 발달단계별 동결 · 융해후 생존성 : 수정란을 발달단계별로 동결 · 융해하여 배반포 형성율을 조사한 결과는 Table 3 에서 보는 바와 같다. 8-, 16-, 상실배기 및 배반포기에서 확장배반포기로의 발달율은 각각 79.0, 83.0, 85.0 및 81.3%의 생존율이 관찰되었다. 이러한 결과로서 16-세포기, 상실배기 및 배반포기에는 80% 이상의 높은 생존율을 나타내어 8-세포기에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높은 생존율을 보였다.

Table 3. Effect of cell stages of embryos on *in vitro* development following freezing and thawing by vitrification method

Cell stage	No of embryos frozen	No(%) of embryos developed to			
		8-cell	Morula	Blastocyst	Degenerated
8-cell	76	2	7	60(79.0)[b]	7
16-cell	53	-	4	44(83.0)[a]	5
Compact morula	40	-	3	34(85.0)[a]	3
Blastocyst	32	-	-	26(81.3)[a]	6

* Values with different superscripts were significantly($P < 0.05$) different.

EFS 용액의 온도에 따른 16-세포기 수정란의 동결 · 융해후 생존성 : 토끼 16-세포기 수정란을 vitrification 방법으로 동결할 때 EFS 용액의 온도가 생존율에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사한 결과는 Table 4 에서 보는 바와 같다. 저온인 4℃에서 생존율은 90.2%로 20℃의 81.7%보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다.

Table 4. Effect of temperatures of cryoprotectant on survival of 16-cell embryos following freezing and thawing by vitrification method

Temperature of cryoprotectants (℃)	No of embryos frozen	No of embryos cultured	No(%) of embryos developed to		
			Morula	Blastocyst	Degenerated
4	45	41	1	37(90.2)[a]	3
20	62	60	3	49(81.7)[b]	8

* Values with different superscripts were significantly($P < 0.05$) different.

수정란의 발달단계별 동결 · 융해후 체외배양한 배반포기 수정란의 할구수 : 수정란의 발달단계에 따른 동결 · 융해과정이 할구에 미치는 손상여부를 확인하기 위하여 동결 · 융해후 배반포기까지 발달한 수정란을 Hoechst 33342 염색을 실시하여 형광현미경하에서 할구수를 헤아린 결과는 Table 5 에서 보는 바와 같다. 동결을 실시하지 않은 신선한 배반포기 수정란(대조구)의 평균 할구수는 144.2±10.8개 였으며, 8-, 16-세포기, 상실배기 및 배반포기 수정란을 동결 · 융해한 후 배반포기까지 체외발달시킨 수정란의 평균할구수는 각각 83.0±6.7, 112.0±5.5, 125.3±8.0 및 143.4±6.6개로서 8-, 16-세포기에서 동결한 수정란에서의 할구수는 동결하지 않은 수정란, 상실배기 및 배반포기에서 동결한 수정란보다 유의적($P < 0.05$)으로 적었다.

Table 5. Number of nuclei of embryos following cryopreservation by vitrification at different developmental stages and *in vitro* culture to blastocyst

Cell stage of embryos frozen	No of embryos used	No of nuclei/blastocyst (mean±SE)
8-cell	16	83.0± 6.7[c]
16-cell	20	112.0± 5.5[b]
Compact morula	44	125.3± 8.0[a,b]
Blastocyst	34	143.4± 6.6[a]
Unfrozen IVC blastocyst	40	144.2±10.8[a]

* Values with different superscripts were significantly($P < 0.05$) different.

고 찰

수정란의 급속동결시 수정란사멸은 평형시간, 결빙형성에 주원인이 있으며, 동결과 융해시 세포외부에서 생성되는 결빙은 세포질에 물리적 압력을 가하므로서 세포질이 파괴되어 수정란이 사멸하는 것으로 알려져 오고 있다[9,10,19,25]. 평형시간은 동결액의 투과성물질과 세포내의 수분이동이 끝날때까지 소요되는 시간에 의하여 결정되며, 동결전 동결보호제와 세포내의 수분이동에 필요한 시간과 융해후 세포내의 동결보호제 이동이 세포의 발달에 큰 영향을 미치게 되므로서 동결융해후의 생존율에 큰 영향을 미친다.

동결보호제인 EFS 용액에서 평형시간에 따른 토끼 8-세포기 수정란의 체외발달율을 조사한 결과, 5분간 평형시켰을 때는 95.2%의 발달율을 보였고 10분에서는 75.0%를 보였으나, 20분에서는 15.0%로 급격히 감소했다. 이는 수정란이 동결보호제내에서 5분 이상 침지되어 있으면 삼투압 변화와 동결보호제의 화학적독성에 의하여 손상을 받는다고 주장한 Rall 과 Fahy[11]의 견해를 재확인하는 것이며, Kasai et al[1]이 토끼 수정란 동결에서 10분간 평형을 실시하여 80%의 생존율을 보고한 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

토끼 8-세포기 수정란을 vitrification 방법으로 동결할 때, 평형시간이 2분 이상 경과하면 할 수록 생존율이 낮아지는 경향이었다. 이는 Tachikawa et al[17]이 배반포기 수정란을 2분간 평형시켜 90%의 생존율을 보고한 것과 비슷한 결과를 보이고 있다. Rall과 Fahy[11]는 세포내부로 동결보호제를 과다하게 투과하는 것은 수정란의 동결보존에 치명적 손상이 된다고 보고하였으며, 고농도의 EFS 용액의 노출시간을 짧게하면 세포내 동결보호제의 독성을 줄여 줌으로써 동결이 성공될 수 있다고 하였다. 동결보존에 있어서 손상의 주요인은 동결 · 융해시에 세포내 · 외부에서 생성되는 결빙형성과 관계가 깊다[14,15].

발달단계별 동결 · 융해후 수정란의 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과, 초기수정란이 후기수정란보다 동결 · 융해 과정에서 손상을 더 많이 받는 것으로 사료되며, Neiman et al[6]이 초기수정란에서는 할구내의 소포

체와 세포소기관 등의 용적이 크기 때문에 동결 · 융해 시 세포내 결빙형성의 원인이 되어 초기수정란에서 생존율이 저하된다고 보고한 결과와 같았다. 또한, 상실배기보다 배반포기의 생존율이 다소 낮은 이유는 배반포기가 다른 발달단계의 수정란보다 내부세포괴, 영양막층 및 포배강 등의 구조가 복잡하고, 대사활동 및 동결보호제의 투과성에 차이가 있어 이에 따라 생존율의 저하가 일어난다고 하였다[20,21].

동결보호제의 온도가 생존율에 어떠한 영향을 미치는지를 조사한 결과, 4℃의 생존율은 90.2%로, 20℃의 81.7%보다 좋은 성적을 얻었으며 이러한 결과는 평형시 동결보존액의 온도가 동결 · 융해후 생존성에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 동결보존액의 온도가 높으면 수정란은 삼투압과 동결보호제에 대한 독성의 영향이 온도가 낮을 때보다 훨씬 많이 받는 것으로 추정된다.

동결 · 융해과정에서 할구의 손상여부를 판단하기 위하여, 신선한 배반포기 수정란과 동결 · 융해후 배반포기까지 발달한 수정란의 할구수를 조사한 결과, 신선한 배반포기 수정란의 할구수는 144개, 8-세포기는 83, 16-세포기는 112, 상실배기는 125 그리고 배반포기는 143개였다. 이러한 결과에서 동결보존을 함으로써 융해후 다소 할구수가 적게 나타나는 경향을 볼 수 있는데, 이는 동결 · 융해과정에서 할구의 손상 및 체외배양조건 등에 기인된 것으로 사료되며, 동결에 의한 할구의 손상때문에 생존세포수가 감소된다고 한 Lehn-Jensen[4] 및 Tekeli et al[18]의 보고와 일치되는 경향을 보였으며, 8-세포기의 할구수가 유의적으로 낮게 나타나고 있는 것은 초기수정란일수록 동결 · 융해 과정에서 할구의 손상을 많이 받아서 배반포기로 발달한 수정란의 할구수에도 영향을 미치고 있는 것으로 판단된다.

결 론

토끼 수정란을 vitrification 방법에 의한 동결보존시 수정란의 발달단계별 생존성과 평형시간에 따른 생존성을 조사하기 위하여, 8-세포기에 있는 수정란을 회수하여 체외배양을 실시하고 발달단계에 따른 동결융해후 배반포기까지 체외발달율과 핵의 수를 헤아린 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EFS용액의 평형시간에 따른 토끼 8-세포기 수정란의 생존성은 5분 평형시간에서 95.2%의 배반포기 발달율을 보였으나, 10, 15 및 20분간의 평형시간에서는 배반포기 발달율이 75.0, 70.0 및 15.0%로 낮았다. 이와 같은 결과에서 EFS 용액의 노출시간은 5분 이하의 시간이 적당한 것으로 관찰되었다.

2. EFS 용액의 평형시간에 따른 토끼 8-세포기 수정란의 동결 · 융해 후 생존성은 평형시간 2, 5 및 10분간에서 88.2, 71.2 및 61.4%의 배반포기 발달율로서 2분에서 가장 높은 생존율을 보였다.

3. 발달단계별 동결 · 융해후 생존성을 조사한 결과 8-, 16-세포기, 상실배기 및 배반포기에서 각각 79.0, 83.0, 85.0 및 81.3%의 배반포기 발달율이 관찰되었다.

4. EFS 용액의 온도에 따른 토끼 16-세포기 수정란의 동결 · 융해후 생존성은 저온인 4℃에서 90.2%, 20℃에서 81.7%로 나타났다. 따라서 동결보존시 EFS 용액의 온도는 실온일 때보다 저온일 경우 더 높은 생존율을 보였다.

5. 발달단계별 동결 · 융해후 체외배양한 배반포기 수정란의 평균할구수는, 8-, 16-세포기, 상실배기 및 배반포기에서 각각 83.0±6.7, 112.0±5.5, 125.3±8.0 및 143.4±6.6개로 나타났다.

이상의 결과에서 토끼 수정란의 동결보존시 EFS 용액에서 2분간 평형시키는 것이 적합하며, 동결보존액의 온도는 4℃로 유지하고, 수정란 발달단계는 상실배기 및 배반포기에서 vitrification을 실시 하는 것이 가장 높은 생존율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kasai M, Hamaguchi SE, Zhu T, et al. High survival of rabbit morulae after vitrification in an etylene glycol-based solution by a simple method. *Biol Reprod* 1992; 46: 1042-1046.
2. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fert* 1990; 89: 91-97.
3. Kasai M, Niwa K, Iritani A. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J Reprod Fert* 1980; 59: 51-56.
4. Lehn-Jensen H. Cryopreservation of bovine embryos: An evaluation of factors influencing the survival of day 6 1/2-7 1/2 embryos during freezing and thawing. A/S Carl Fr.Morten, Co-

penhagen, 1986; 17.
5. Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC. Factors effecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exptil Cell Res* 1984; 89: 79-88.
6. Neiman H, Sacher B, Schilling E, et al. Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method. *Theriogenology* 1982; 17: 102 abstr.
7. Nguyen BX, Heyman NY, Renard JP. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. *Theriogenology* 1984; 22: 389-400
8. Pursel VG, Wall RJ, Rexroad Jr CE, et al. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 1985; 24: 687.
9. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiol* 1987; 24: 387-402.
10. Rall WF, Reid DS, Polge C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical method. *Cryobiol* 1984; 21: 106-121.
11. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196℃ by vitrification. *Nature 1985; 313: 573-575.*
12. Renard JP, Nguyent BX, Garnier V. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J Reprod Fert* 1984; 71: 573-580.
13. Scheffen B, van Der Zwalmen P, Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letter* 1986; 7: 260.
14. Szell A, Shelton JN. Sucrose dilution of glycerol from embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J Reprod Fert* 1986a; 76: 401-408.
15. Szell A, Shelton JN. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J Reprod Fert* 1986b; 78: 699-703.
16. Szell A, Shelton JN. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on day-3 mouse embryos. *J Reprod Fert* 1987; 80: 309-316.
17. Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, et al. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Mol Reprod Develop* 1993; 34: 266-271.
18. Tekeli T, Kweon OK, Kanagawa H. The viability of deep-frozen aggregated mouse embryos. *Jpn J Vet Res* 1987; 35: 283.
19. Trounson AO, Peura A, Kirby C. Ultrarapidly freezing: A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987; 48: 843-850.
20. Valdez C, Abas A, Mazni O, et al. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenolgy* 1990; 33: 627.
21. van der Zwalmen P, Gaurois B, Ecotors FJ, et al. Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenolgy* 1988; 30: 1177.
22. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196℃ and -296℃. *Science* 1972; 178: 411-414.
23. Willadsen S, Polge C, Rowson LEA. The viability of deep-frozen cow embryos. *J Reprod Fert* 1978; 52: 391-393
24. Wilmut U. The effects of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Science* 1972; 11: 1071-1079.
25. Wilton LJ, Shaw JM, Trounson AO. Successful single cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril* 1989; 51(3): 513-517.
26. Wood MJ, Farrant J. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiol* 1980; 17: 178-180.