

抗凍害劑의 種類가 凍結 생쥐胚의 生存性에 미치는 影響

盧煥喆 · 白雲和 · 李光旭* · 高大煥* · 鄭吉生*

斗山研究所

Effects of Various Cryoprotectants on the Survival of Frozen Mouse Embryo

Rho, H. C., U. H. Pek, K. W. Lee,* D. H. Koh* and K. S. Chung*

Doosan Research Laboratory

Summary

These experiments were carried out to clarify the effects of various kinds of cryoprotectants which were frequently used in freezing embryos of domestic animals on the survival of frozen-thawed mouse embryos. As cryoprotectant, glycerol, DMSO and methanol were used and the procedures of adding them in medium were practiced by one-step or six-step adding method. Morphologically normal mouse embryos developed to blastocyst by in vitro culture after freezing and thawing were transferred to pseudopregnant recipients by surgical procedures.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. The survival rates of the frozen-thawed 8-cell embryos, morulas and blastocysts following one-step addition of glycerol were 83.6, 80.3 and 70.3%, respectively, while following six-step addition of glycerol, 69.2, 56.3 and 66.7% respectively.
2. When glycerol, DMSO and methanol were used as cryoprotectant under the same condition of freezing and thawing, the survival rates of frozen-thawed embryos were 74.0, 76.1 and 37.6%, respectively.
3. The implantation rate of embryos transferred to pseudopregnant recipients after freezing and thawing was 49.2%.

I. 緒 論

受精卵의 凍結保存은 生産性이 높은 遺傳形質을 長期間 保存할 뿐아니라, 受精卵 移植時 發情同期化의 과정을 省略할 수 있게하고 家畜의 國際間輸送을 가능하게 하므로 産業의 측면에서 볼때 그 意義가 매우 크다. 그래서 Whittingham 등(1972)이 생쥐 受精卵을 凍結保存하는데 성공한 이래 各種동물에 있어서 受精卵의 凍結保存에 관한 시험이 다수 실시되어, 적절한 凍結-融解速度(Wilmot, 1972; Bank와 Maurer, 1974; Whittingham 등, 1979)와 적합한 抗凍害劑의 사용(Kasai 등, 1980, 1981)이 成功의 要諦라는 結論을 얻었다.

그 결과 이들 두가지 사항에 관한 연구가 집중적으로 수행되어 왔는데 初期에는 緩慢冷却과 緩慢融

解로만 가능하다고 믿었던 凍結方法(Whittingham 등 1972; Wilmot, 1972) 이 근래에는 緩慢冷却과 急速融解로 가능할 뿐아니라 急速冷却과 急速融解(Kasai 등 1980)로도 가능하다는 보고가 제출되고 있다.

한편, 抗凍害劑로는 DMSO가 널리 쓰여 왔으나(Whittingham, 1975; Whittingham과 Adams, 1976; Whittingham 등, 1972, 1979; Wilmot, 1972; Leibo 등, 1974; Bank와 Maurer, 1974; Tsunoda와 Sugie 1977) Kasai 등(1981)과 Rall 등(1983)은 glycerol이 DMSO보다 毒性이 적으며, 急速融解에 대한 效果가 크다고 보고하였다. 게다가 최근에는 融解後 抗凍害劑를 除去하지 않고 즉시 移植할 수 있는 methanol을 抗凍害劑로 사용하여 생쥐에서 良好한 결과를 얻었다는 보고도 있다(Rall 등, 1984).

이러한 연구결과들을 바탕으로 하여 本試驗에서

*建國大學校 畜産大學 College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University
註) 本 研究는 科學技術處 特定研究 開發課題의 研究結果임.

는 家畜受精卵의 凍結保存에 必要한 기초지식을 습득할 目的으로, 생쥐受精卵을 사용하여 抗凍害劑의 種類와 그 添加方法이 凍結受精卵의 生存性에 미치는 영향을 검토하였는바 그 결과를 보고한다.

II. 材料 및 方法

1. 試驗材料

1) 供試動物

供試動物로는 生後 4~10주령, 體重 20~35g의 inbred ICR 계통의 생쥐를 사용하였다.

2) 培養液

受精卵의 回收, 保存 및 培養에 사용된 培養液은 Nutrient Mixture Ham's F 10(Gibco laboratories, U. S. A.)으로서 pH는 7.2~7.6, 삼투압은 290~300 mOsm로 조정하였으며, 사용직전에 0.2 μ m의 millipore filter로 慮過하여 제균을 실시하였다.

3) 供試受精卵

(1) 多排卵의 誘起

多排卵誘起를 위하여 PMSG(Folligon, Intervet, Holland)와 HCG(Chorulon, Intervet Holland)를 45~48시간 간격으로 首當 5IU씩 腹腔에 注射하였고 HCG주사후 10~11시간째에 1:1로 雄性생쥐를 合券시켜 交配를 실시하였다. 이어 翌日 아침에 腔檢의 有無를 確認하여 腔檢이 없는 個體는 採卵對象에서 除外시켰다.

(2) 受精卵의 回收

交尾後 적절한 시간(腔檢發見: 3일째, 8-細胞期; 3½일째, 桑實胚期; 4일째, 胚盤胞期)에 屠殺, 外科적으로 卵管과 子宮을 摘出하여 實體顯微鏡(Olympus, Japan)下에서 상기 保存液으로 灌流함으로써 受精卵을 回收하였다.

2. 試驗方法

1) 抗凍害劑의 添加와 除去

(1) Glycerol 1段階 添加法

直徑 30mm의 plastic petridish(Nunclon, Denmark)내에 미리 注入된 保存液 1.5ml에 受精卵을 옮긴 후, 다시 3M-glycerol 용액 1.5ml를 添加, 最終濃도가 1.5M이 되게 調整하였다. 이때 glycerol(Sigma, U. S. A.)의 平衡處理는 실온에서 30분간에 걸쳐 실시하였다. 또 glycerol의 除去는 상기의 petridish에 1.5M-glycerol농도의 保存液 0.1ml를 담은 후 融解된 受精卵을 넣고 그 위에 매10분마다 보존액 0.1, 0.2,

0.2, 0.4 및 0.4ml씩을 첨가함으로써 실시하였다. 最終添加後 10분이 지나서 모든 受精卵을 抗凍害劑가 전혀 없는 新鮮한 保存液으로 옮긴 후 2회 洗滌하여 培養을 실시하였다.

(2) Glycerol 6段階 添加法

保存液 0.1ml에 受精卵을 넣은 후 그 위에 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 및 1.25M-glycerol 용액을 각각 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 및 1.6ml씩 10분 간격으로 添加하고 最終添加 10분 후에 受精卵을 1.5M-glycerol 용액에 옮겨 다시 10분간 平衡을 실시한 다음 0.25ml straw에 注入하였고 glycerol의 除去는 상기 添加法의 逆順으로 실시하였다.

(3) DMSO 1段階 添加法

抗凍害劑로서 glycerol 대신 3M-Dimethyl sulphoxide(DMSO; Sigma, U. S. A.)를 사용하였으며 抗凍害劑의 添加 및 除去는 前記 (1) 항과 同一하게 실시하였다.

(4) Methanol 1段階 添加法

Glycerol대신 3M의 methanol(Merck, W. Germany)을 함유한 保存液으로 受精卵을 處理하였다. 凍結-融解된 受精卵은 融解後 1段階로 新鮮한 保存液으로 옮겨 2회 洗滌한 후 培養을 실시하였다.

2) 受精卵의 凍結

抗凍害劑로 處理된 受精卵을 0.25ml plastic straw (Fujihira industry co. Ltd., Japan)에 3~5개씩 注入하여 powder로 밀봉한 다음 programmable freezer(Planer R-204, U. K.)에 裝着하여 凍結하였다. 즉 실온에서 -6℃까지는 1℃/min의 速度로 緩慢 冷却하고 -6℃에서 植水(seeding)한 후 -6℃에서 -35℃까지는 0.5℃/min의 緩慢한 速度로 冷却시켰으며 -35℃에서 그대로 -196℃의 액체질소에 침지하여 동결하였다.

植水은 액체질소로 미리 冷却된 錦子를 straw에 접촉시켜 실시하였다(Elsden과 Seidel, 1982).

3) 凍結受精卵의 融解

액체질소내에서 1~30日間 保存한 Straw内の 受精卵을 Straw에 넣은채로 35℃의 恒溫槽에 침지함으로써 500℃/min의 速度로 急速融解하였다.

4) 凍結-融解後의 培養

組織培養用 Petridish에 25 μ l의 培養液을 滴下시킨 후 액체 Paraffin으로 덮어 5% CO₂, 95% Air, 37℃ 條件의 CO₂培養器에 넣어 2時間동안 방치함으로써 CO₂의 平衡을 실시하였다. 이어 培養液 小

適當 3~4 개의凍結-融解된 受精卵을 넣어 上記와 同一한 培養條件下에서 12~36時間동안 培養한 후 受精卵의 發達狀態를 현미경하에서 觀察하였다.

5) 凍結受精卵의 移植

融解後의 培養에 의하여 後期胚盤胞 段階에까지 發達한 受精卵을 골라 偽妊娠 4 일째인 受卵생쥐의 양쪽 子宮角에 各各 6~10개씩 外科的으로 移植하였다.

이때 偽妊娠은 정관을 절제한 雄性생쥐를 雌性생쥐와 合숙시켜 自然交尾를 유도함으로써 유기시켰으며 交尾 다음 날 膣栓이 있는 개체만을 골라 受卵생쥐로 사용하였다. 移植된 受精卵의 着床率은 移植후 15일째에 屠殺하여 着床部位를 確認함으로써 算出하였다.

III. 結果 및 考察

本 試驗에서 얻어진 結果를 항목별로 요약하여 고찰하면 다음과 같다.

1. 抗凍害劑의 添加方法과 凍結受精卵의 生存性

抗凍害劑인 glycerol을 1 段階方法과 6 段階方法에 의하여 添加하고 -35°C 까지는 緩慢하게 冷却시킨 다음 그 온도에서 -196°C 의 액체질소에 침지함으로써 急速凍結을 실시한 후 이어 急速融解를 실시한 受精卵의 生存性은 Table 1에서 보는 바와 같았다. 이 표에 의하여 알 수 있는 바와 같이 8-細胞期胚, 桑實胚 및 胚盤胞의 凍結-融解後의 生存率은, gly-

cerol 6 段階添加의 경우 各各 69.2, 56.3 및 66.7 %로 평균 65.0%였으며 1 段階添加의 경우는 各各 83.6, 80.3 및 70.3%로 평균 76.1%였다.

이러한 결과는 glycerol을 添加할 때 6 段階添加보다는 1 段階添加法이 더 좋은 結果를 가져올 수 있다는 것을 시사한다. 즉 各이 抗凍害劑를 段階的으로 添加하지 않아도 좋은 성적을 올릴 수 있다는 것을 알 수 있다. Willadsen(1977)과 Willadsen 等(1978)은 滲透壓의 變化에 의한 衝擊을 줄이고 受精卵內에 함유되어 있는 自由水를 충분히 脫水시키기 위하여 抗凍害劑의 6 段階添加法을 提唱하였다.

그러나 Leibo 등(1974)은 自由水의 脫水는 抗凍害劑添加後 5 분이면 충분하며 그것은 이 기간 동안에 抗凍害劑가 受精卵內에 浸透하여 細胞內外의 平衡이 이루어지기 때문이라고 報告하였다. 이러한 報告를 토대로 하여 Rall과 Polge(1984)는 抗凍害劑의 1 段階添加法을 시도, 좋은 성적을 얻었다. 또 Bilton과 Moore(1977)는 牛受精卵에서도 같은 結果를 얻고 있다.

본 시험의 結果는 Leibo 등(1974)이나 Rall과 Polge(1984) 및 Bilton과 Moore(1977)의 연구 結果를 뒷받침하는 것이었다.

2. 抗凍害劑의 種類와 凍結受精卵의 生存性

抗凍害劑는 凍結과 融解處理에 대한 受精卵의 感應度에 지대한 영향을 미친다. Table 2는 冷却速度($0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$)와 融解速度($500^{\circ}\text{C}/\text{min}$)를 통일하고 抗凍害劑의 種類만을 달리하여 생쥐 受精卵을 凍結-融解했을 때의 8-細胞期胚, 桑實胚 및 胚盤胞의

Table 1. Effect of glycerol adding procedures on the survival of mouse embryos frozen and thawed.

Adding procedure	Embryo stage	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered (%)	No. of embryos developed to blastocyst (%) *
6-step	8-cell embryo	37	26(70.3)	18(69.2)
	Morula	20	16(80.0)	9(56.3)
	Blastocyst	26	18(69.2)	12(66.7)
	Total or mean	83	60(72.3)	39(65.0)
1-step	8-cell embryo	67	55(82.1)	46(83.6)
	Morula	112	76(67.9)	61(80.3)
	Blastocyst	155	128(82.6)	90(70.3)
	Total or mean	334	259(77.6)	197(76.1)

* Embryos were cultured for 12-36 hours.

Table 2. Effects of various cryoprotectants on the survival of mouse embryos frozen and thawed.

Cryoprotectants	Embryo stage	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered (%)	No. of embryos developed to blastocyst (%) *
1.5 M-DMSO	8-cell embryo	35	25(71.4)	19(76.0)
	Morula	38	34(89.5)	25(73.5)
	Blastocyst	24	18(75.0)	13(72.2)
	Total or mean	97	77(79.4)	57(74.0)
1.5 M-Glycerol	8-cell embryo	67	55(82.1)	46(83.6)
	Morula	112	76(67.9)	61(80.3)
	Blastocyst	155	128(82.6)	90(70.3)
	Total or mean	334	259(77.6)	197(76.1)
3.0 M-Methanol	8-cell embryo	32	21(65.6)	9(42.9)
	Morula	44	35(79.6)	15(42.9)
	Blastocyst	52	37(71.2)	11(29.7)
	Total or mean	128	93(72.7)	35(37.6)

*Embryos were cultured for 12-36 hours.

生存率을 나타내고 있다. 이 표에 의하여 알 수 있는 바와 같이 1.5M-DMSO를 添加했을 때의 8-細胞期胚, 桑實胚 및 胚盤胞의 生存率은 各各 76.0, 73.5 및 72.2%로서 平均 74.0%라는 높은 生存率을 보이고 있다. 이러한 성적은 같은 抗凍害劑를 사용하여 얻은 Leibo 등(1974), Miyamoto와 Ishibashi(1983, 1984), Tsunoda 등(1981) 및 Willadsen(1977)의 성적과 대체로 一致하는 것이었다. 特記할 것은 DMSO를 사용하였을 경우 凍結-融解後의 胚의 生存性이 供試된 胚의 發達段階에 따라 큰 차이가 없다는 점이다.

이에 대하여 glycerol을 抗凍害劑로 사용하였을 경우 凍結-融解後에 있어서 8-細胞期胚, 桑實胚 및 胚盤胞의 生存率은 各各 83.6, 80.3 및 70.3%로서 平均 76.1%였다. 이러한 結果는 同一한 抗凍害劑를 사용하여 얻은 Rall과 Polge(1981, 1984), Kasai 등(1981), Lehn-Jensen과 Rall(1983) 및 Smorag 등(1981)의 보고와 그 경향을 같이 하는 것이었다. Glycerol을 사용하였을 때의 平均 生存率은 DMSO添加區보다 良好하나 胚盤胞의 성적은 DMSO添加區보다 오히려 떨어졌다. 이러한 結果는 桑實胚와 그 이전의 段階에 있는 受精卵를 凍結할 경우에는 抗凍害劑로서 glycerol을 사용하고 桑實胚期 이후의 段階에 있는 受精卵를 凍結할 경우에는 DMSO를 사

용하는 것이 좋은 성적을 가져올 수 있다는 것을 시사한다.

Glycerol이나 DMSO를 抗凍害劑로 사용하였을 경우, 移植하기 전에 抗凍害劑를 除去해야 한다는 빈 거로움이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Rall과 Polge(1984)는 抗凍害劑로서 methanol을 사용하여 50%이상의 生存率을 얻었다고 보고한 바 있다. Methanol은 어떤 種類의 細胞에 대해서도 매우 빨리 透過되고 빨리 除去되며(Collander, 1954; Wright와 Diamond, 1969; Naccache와 Sha'afe, 1973; Morris, 1980) 凍結과 融解에 대한 충격으로 부터 細胞를 保護하는 강력한 효과를 가지고 있다(Lovell, 1954; Polge와 Soltys, 1960; Meryman, 1968; Rapatz, 1973; Ashwoodsmith와 Lough, 1975; Morris, 1980; James, 1980; Harvey 등 1982). 그러나 본 시험의 결과를 보면 3.0M-methanol을 抗凍害劑로 사용하여 8-細胞期胚, 桑實胚 및 胚盤胞를 凍結-融解했을 때의, 胚生存率은 各各 42.9, 42.9 및 29.7%로서, 平均 37.6%에 지나지 않았다(Table 2).

이러한 結果는 DMSO나 glycerol을 抗凍害劑로 사용했을 때의 성적인 74.0%나 76.1%와는 비교도 안되는 저조한 성적이었다. 이러한 結果들을 綜合하여 考察할 때 적어도 緩慢冷却(0.5°C/min)과 急

速融解(500°C/min)를 연결시켰을 경우 가장 效果的인 抗凍害劑는 역시 glycerol과 DMSO라고 결론을 내릴 수 있다. Methanol을 항동해제로 사용하면 凍結-融解後 移植할 때에 除去하지 않아도 좋다는 見解가 있어 크게 기대되기는 하나 實用的으로 應用하기 위해서는 添加濃度나 冷却速度 및 融解速度 등에 關하여 別도의 구체적인 검토가 있어야 할 것으로 생각된다.

3. 凍結受精卵의 移植成績

抗凍害劑로서 1.5M의 glycerol을 사용하여 凍結한 8-細胞期胚, 桑實胚 및 胚盤胞를 融解한 다음 in vitro에서 24시간 培養, 後期胚盤胞 段階에 까지 發達한 것만을 골라 偽妊娠 3~4 일째의 受卵생쥐에 外科的으로 移植하였을 때의 成績은 Table 3에서 보는 바와 같았다. 즉 8-細胞期胚에서 凍結된 受精卵 27개를 2수의 受卵생쥐에 移植하였으나 그중 1수에서 1번 妊娠이 이루어졌으며, 妊娠 15일째에 屠殺하여 관찰한 結果 着床된 것은 8수로서 移植한

受精卵에 대해서는 61.5%에 해당하는 것이었다. 또 桑實胚와 胚盤胞段階에서 凍結된 胚의 着床率은 各 各 60.0%와 33.3%였으며 전체의 평균은 49.2%에 지나지 않았다. 한편 桑實胚를 凍結, 融解하여 培養한 후 9개를 移植하여 2(22.2%)수의 産子를 얻었다. 이러한 성적은 Whittingham 등(1979)의 성적인 75.3~77.2%보다는 현저하게 저조한 것이었으며 Table 1 과 Table 2에 표시된 生存率 77.6%나 76.1%와 대비할 때에도 큰 차이가 있다. 이러한 차이가 어디서 기인하는지는 명확하지 않으나 凍結-融解에 의한 손상도 하나의 원인이 겠지만 移植과정에서 일어나는 기술상의 미숙이 더 큰 작용을 했을 것으로 생각된다.

이상 생쥐受卵卵의 凍結과 融解 및 移植에 대한 一連의 시험 結果를 綜合하여 檢討할 때 凍結을 위한 抗凍害劑의 添加는 1段階添加로도 무방하며 抗凍害劑로서는 桑實胚와 그 이전의 胚에 대해서는 glycerol이, 桑實胚이후의 胚에 대해서는 DMSO가 적절한 것으로 생각된다.

Table 3. Pregnancy rate following transfer of embryos frozen with 1.5M glycerol and cultured to blastocyst after thawing.

Embryo stage at freezing	Total No. of embryos transferred* (No. of recipients)	No. of recipients maintaining pregnancy (No. of embryos transferred)	No. of implantations+ (%)
8-cell embryo	27(2)	1 (13)	8(61.5)
Morula	43(3)	2 (25)	15(60.0)
Morula	9(1)	1 (9)	2(22.2)++
Blastocyst	22(2)	1 (12)	4(33.3)
Total or mean	101(8)	5 (59)	29(49.2)

*Only blastocysts with normal morphology after culture were transferred into the uterus of a recipient on Day-3 or -4 of pseudopregnancy.

+ At autopsy on day 15 or of pregnancy.

++ Offspring

IV. 摘 要

本 試驗은 家畜受卵卵을 凍結保存할 때 자주 사용되는 各種 抗凍害劑의 종류와 그들의 添加方法이 凍結-融解된 生쥐受卵卵의 生存性에 미치는 影響을 규명하기 위하여 實施하였다.

抗凍害劑로는 DMSO, glycerol 및 methanol을 사용하였으며, 이들의 添加는 1段階法과 6段階法에 의하여 실시하였다. 凍結, 融解된 受卵卵은 in vitro

에서 培養하였으며 정상적인 발달을 보인 일부를 移植하였다. 本 試驗에서 얻어진 結果를 요약하면 다음과 같다.

1. Glycerol을 1段階添加法에 의하여 添加하였을 경우 8-細胞期胚, 桑實胚 및 胚盤胞의 凍結-融解後의 生存率은 各 各 83.6, 80.3 및 70.3%였다. 이에 대하여 glycerol을 6段階添加法에 의하여 添加했을 때의 그것은 各 各 69.2, 56.3 및 66.7%였다.

2. 凍結速度와 融解速度를 통일하고 抗凍害劑로

서 DMSO, glycerol 및 methanol을 添加했을 때에 있어서 凍結-融解受精卵의 生存率은 各各 74.0, 76.1 및 37.6%였다.

3. 凍結-融解後 in vitro培養에 의하여 後期胚盤胞期까지 發達한 受精卵만을 골라 受卵생쥐에 移植한 결과 49.2%에 해당하는 受精卵이 정상적인 着床을 보였다.

V. 引用 文 獻

- Ashwood-Smith, M.J. and P. Lough. 1975. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with methanol. *Cryobiology* 12: 517-518.
- Bank, H. and R.R. Maurer. 1975. Survival of frozen rabbit embryos. *Expl. Cell Res.* 89: 188-196.
- Bilton, R.J. and N.W. Moore. 1977. Successful transport of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. *J. Reprod. Fert.* 50: 365-364.
- Collander, R. 1954. The permeability of Nitella cells to non-electrolytes. *Physiol. Plant.* 7: 420-445.
- Elsden, R.P. and G.E. Seidel Jr. 1982. Embryo transfer procedure for cattle. *Theriogenology* 14: 251-256.
- Harvey, B., R.N. Kelly and M.J. Ashwood-Smith. 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. *Can. J. Zool.* 60: 1867-1870.
- James, E.R. 1980. Cryopreservation of *Schistosoma mansoni* Schistosomula using 40% v/v (10 M) methanol and rapid cooling. *Cryo-Letters* 1: 535-544.
- Kasai, M., Niwa, K. & Iritani, A. (1980) Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.* 59,51-56.
- Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotectants on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 63: 175-180.
- Lehn-Jensen, H. and W.F. Rall. 1983. Cryomicroscopic observation of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology* 19: 263-277.
- Leibo, S.P., P. Mazur and S.C. Jackowski. 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Expl. Cell Res.* 89: 79-99.
- Lovelock, J.E. 1954. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem. J.* 56: 265-270.
- Meryman, H.T. 1968. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature, London.* 218: 333-336.
- Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various protectants. *J. Expl. Zool.* 226: 123-127.
- Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1984. Survival of epididymal spermatozoa of the goat and sheep, and mouse and rat embryos after direct transfer into liquid nitrogen from preliminary freezing temperature. *Jpn. J. Artif. Insem.* 6(1): 1-3.
- Morris, G.J. 1980. Plant cells. In *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, pp. 253-283. Eds. M.J. Ashwood-Smiths and J. Farrant. Pitman Medical, Tunbridge Wells.
- Naccache, P. and R.I. Sha'afi. 1973. Patterns of non-electrolyte permeability in human red blood cell membrane. *J. Gen. Physiol.* 62: 714-736.
- Polge, C. and M.A. Soltys. 1960. Protective action of some neutral solutes during the bull spermatozoa and trypanosomes. In *recent research in freezing and drying*, pp. 87-100. Eds. A.S. Parkes and A.U. Smith. Blackwell Scientific, Oxford.
- Rall, W.F. and C. Polge. 1981. Rapid- and slow-warming survival of mouse embryos in glycerol. *Cryobiology* 18: 619 Abstr.
- Rall, W.F., P. Mazur and J.J. McGrath. 1983. Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethylsulfoxide. *Biophys. J.* 41: 1-12.
- Rall, W.F. and C. Polge. 1984. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J. Reprod. Fert.* 70: 285-292.
- Rall, W.F., M. Czlonkowski, S.C. Barton and C. Polge. 1984. Cryoprotection of Day-4 mouse embryos by methanol. *J. Reprod. Fert.* 70: 239-

- 300.
23. Rapatz, G. 1973. Cryoprotective effect of methanol during cooling of frog hearts. *Cryobiology* 10: 181-184.
 24. Smorag, Z., L. Katska and S. Wierzbowski. 1981. Some factors affecting the success of embryo-freezing storage before freezing, superovulation rate, PBS concentration, cooling and thawing rates. In *Frozen Storage of Laboratory Animals*, pp. 21-23. Ed. G.H. Zeilmaker. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
 25. Tsunoda, Y., T. Soma and T. Sugie. 1981. The survival of rabbit morulae preserved in liquid nitrogen after rapid thawing. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 27(3-4): 157-160.
 26. Tsunoda, Y. and T. Sugie. 1977. Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen at different developing stages. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 25(4): 189-193.
 27. Whittingham, D.G. 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.* 43: 575-578.
 28. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 178: 411-414.
 29. Whittingham, D.G. and C.E. Adams. 1976. Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 47: 269-274.
 30. Whittingham, D.G., m. Wood, J. Farrant, H. Lee and J.A. Hasely. 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C . *J. Reprod. Fertil.* 56: 11-21.
 31. Willadsen, S.M. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing. In *the mammalian embryos (Ciba Fndn. Symp. no. 52)*. pp. 175-189. Eds. K. Elliott and J. Whelan. Elsevier North Holland, Amsterdam.
 32. Willadsen, S.M., C. Polge, L.E.A. Rowson. 1978. In vitro storage of cattle embryos. In *control of reproduction in the cow*. Ed. J. Sreenan. European Economic Community, Luxembourg.
 33. 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*. 11: 1071-1079.
 34. Wright, E.M. and J.M. Diamond. 1969. Patterns of non-electrolyte permeability. *Proc. R. Soc. B.* 172: 227-271.