

Mouse 受精卵의 急速凍結에 關한 研究
第 I 報 耐凍劑 濃度가 Mouse 受精卵 急速凍結時
生存率에 미치는 影響

姜萬鍾·金瑩勳·文星浩·金重柱

濟州大學校 農科大學

Studies on the Rapid Freezing of Mouse Embryo
I. Effects of Cryoprotectants Concentration on the Mouse
Embryo Survival of the Rapid Freezing

Kang, M.J., Y.H. Kim, S.H. Moon and J.K. Kim

College of Agriculture, Che Ju National University

SUMMARY

Studies were conducted to seek reasonable methods of rapid freezing of mouse embryos using liquid nitrogen. The effects of the cryoprotectants concentration and the substitution of raffinose to sucrose in freezing and dilution medium on mouse embryo survival rates were determined using the FDA-test. The summarized results are as follows :

1. When 0.3 M of sucrose was added into the freezing and dilution medium, FDA scores of embryos were 1.48(1.5 M), 3.81(3.0 M) and 4.10(4.5 M). Higher FDA scores of embryos were obtained in 3.0 M and 4.5 M glycerol concentrations ($P < 0.05$).
2. With the addition of 0.3 M raffinose to the freezing and dilution medium, FDA scores of embryos did not significantly differ between glycerol levels : 3.97(1.5 M), 4.11(3.0 M) and 3.54(4.5 M). Higher scores of embryos existed in 3.0 M glycerol concentration.
3. Concentration of sucrose or raffinose in freezing and dilution medium affected FDA scores of embryos. When sucrose concentrations of 0.3, 0.5 and 1.0 M were added to the freezing medium, FDA scores of embryos were 3.12, 2.38 and 0, respectively. However, when the same concentrations of raffinose were added to freezing medium, the FDA scores were 4.21, 2.91 and 0. In both cases, better FDA scores of embryos were attained in 0.3 M of sucrose or raffinose ($P < 0.01$).

I. 緒 論

受精卵의 凍結은 耐凍劑를 사용하여 凍結時 細胞內 自由水의 脫水에 依한 氷形成을 減少시키는 理論을 基礎로 하여 주로 緩慢凍結方法으로 遂行되어 왔다(Whittingham et al, 1972; willmut, 1972; Leibo와 Mazur, 1978; Mazur, 1977; Kasai et al, 1980).

한편, 1980 年代에 들어서면서 低温生物學의 發達에 따라 凍結前 受精卵으로부터 自由水を 脫水시킴으로써 凍結時 害를 적게 하고, 신속히 凍結할 수 있는 急速凍結에 대한 研究가 進行되고 있다(Williams와 Johnson, 1986; Chupin과 Reviere, 1986; Rall et al, 1987; Sze'll과 Shelton, 1986 ab, 1987).

急速凍結에 있어서 耐凍劑의 濃度는 緩慢凍結보다 增加되는 傾向이 있으며, 주로 glycerol 2 M~5 M 과 sucrose 0.25 M~0.5 M 의 범위로 耐凍劑가 사용되어 왔다. 이러한 急速凍結 方法은 여러 가지 耐凍劑를 混合한 vitrification solution 을 利用한 것과 두 가지 耐凍劑(glycerol 과 sucrose)를 使用한 方法으로 區分할 수 있다. Vitrification solution 을 利用할 경우는 細胞內外 氷晶形成이 防止되며, 受精卵을 脫水 收縮된 狀態로 凍結시키는 것이 必須條件이라고 Fahy et al(1984)은 指摘하였고 Hsu et al (1986)은 mouse 受精卵에서 53~93%의 生存率을 報告하였다.

또한, 두 가지 耐凍劑를 高濃度로 利用한 Szeffill과 Shelton(1987)은 5.0 M glycerol 과 0.5 M sucrose 를 添加한 凍結液에서 95%의 生存率을 얻었다고 하였으며, glycerol 濃度가 2.0 M 에서 5.0 M 로 增加할수록 生存率이 높아지는 傾向이 있다고 報告하고 있다.

本 研究는 mouse 受精卵을 利用하여 LN₂ container 內에서 急速凍結의 效率의인 方法을 提示하기 위하여 耐凍劑(glycerol, sucrose, raffinose)濃度의 決定과 外部 細胞膜을 保護하는 耐凍劑인 sucrose 의 代用으로 raffinose 의 利用 可能性을 檢討하는데 그 目的이 있다.

II. 材料 및 方法

供試動物은 5 週齡(體重 20~30 g)의 雌性 ICR mouse 를 使用하였고, 配合飼料과 물을 自由採食시켰으며, 日照時間은 14 h/day 로 調節하였다.

過排卵 誘起을 위하여 13:~14:00 時 사이에 PMSG(三共社, 日本) 5~7 IU 를 腹腔內에 注射하고, 48 時間 後 同量의 HCG(三共社, 日本)를 注射하여 同一系의 雄性 mouse 를 1:1 로 合舍, 自然交尾를 誘導하였다. 翌日 아침 腔栓(coital plug)을 確認하였으며, 確認되지 않은 個體는 試驗에서 除外시켰다.

受精卵의 採卵은 HCG 注射後 72~75 時間에 屠殺하여 卵管과 子宮을 切取한 후 m-PBS(modified Dulbecco's phosphate buffered saline)로 子宮을 灌流하여 桑實胚期의 受精卵을 回收하였다. 回收된 受精卵은 實體顯微鏡에서 形態의으로 優秀한 桑實胚期 受精卵을 選別 凍結에 利用하였다.

凍結液의 製造는 glycerol 과 sucrose, raffinose 을 耐凍劑로 하여 다음과 같이 製造하였다.

- (1) 1.5, 3.0 4.5 M glycerol+0.3 M sucrose+20% serum+m-PBS.
- (2) 1.5, 3.0, 4.5 M glycerol+0.3 M raffinose+20% serum+m-PBS.
- (3) 3.0 M glycerol+0.3, 0.5, 1.0 M sucrose+20% serum+m-PBS.
- (4) 3.0 M glycerol+0.3, 0.5, 1.0 M raffinose+20% serum+m-PBS.

凍結液에 添加된 血清은 本大學校 牧場에서 飼育 중인 7 個月齡 Holstein 犏牛(♀)의 血液을 採取 製造하였다. 採取한 血液은 3,000 rpm 으로 10 分間 遠心分離(2 回)하여 血清을 分離하였으며, 56°C 恒溫器에서 30 分間 非働化 시킨 後 -20°C 에 保存, 凍結液을 製造하여 使用하였다. 凍結液과 血清은 使用前 0.22 μm membrane filter 로 濾過하였다.

凍結液의 添加는 採卵된 受精卵을 新鮮한 m-PBS 로 2 回 洗滌한 後 直接 凍結液으로 옮겨서 實施하는 one-step 方法(Leibo, 1983)에 의하여 15 分間 行하였다. 凍結液 添加가 끝난 受精卵은 0.25 ml straw 內에 5~12 個씩 1 ml 注射器로 吸入하여 Fig. 1 과 같은 one-step straw 를 製造하였다.

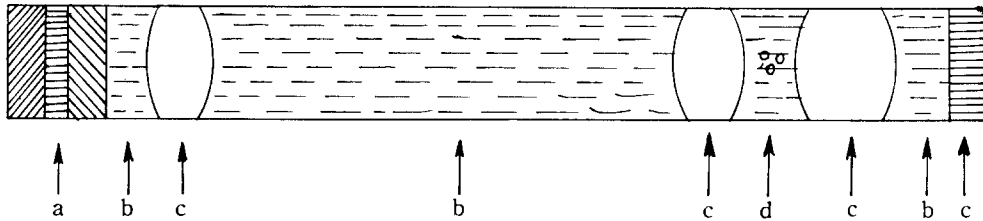


Figure 1. Diagrammatic representation of 0.25 ml straw loaded with freezing medium and dilution medium for the one-step dilution procedure.

a) cotton plug b) dilution medium c) air bubble d) freezing medium+embryos e) straw powder plug

受精卵의 凍結은 liquid nitrogen 을 이용하여 liquid nitrogen container (Union Carbide, U.S.A) 內에서 實施하였다. 凍結時 straw 의 位置는 cotton plug 가 밑으로 향한 垂直狀態에서 行하였으며, 凍結方法은 straw 를 常溫에서 1分 以內에 liquid nitrogen 表面 2~3 mm 까지 下降시킨 다음 ($-36 \pm 7.5^{\circ}\text{C}$) 5分間 停滯後 ($-188.8 \pm 3.3^{\circ}\text{C}$) liquid nitrogen 에 浸漬 1~2 週間 保管하였다.

受精卵의 融解는 38°C 溫水에서 straw 를 천천히 흔들며 氷結晶이 사라질 때까지 하였고, 所要時間은 約 10秒 程度였다.

融解後 耐凍劑의 除去는 straw 內의 除去液과 受精卵이 들어있는 凍結液 사이의 air bubble 을 中指로 가볍게 튕겨 除去液과 凍結液을 混合하는 方法으로 耐凍劑를 除去하였고, 除去時間은 10分 程度 所要되었다 (Fig. 1 참조). 耐凍劑 除去液은 m-PBS 에 0.3, 0.5, 1.0 M 의 sucrose 또는 raffinose 를 添加하여 製造하였으며 0.22 μm membrane filter 로 濾過시켜 使用하였다.

受精卵의 生死判定은 FDA 液 (3', 6'-diacetyl fluorescence 1 mg 을 acetone 1 ml 에 融解시킨 後 m-PBS 液에 600,000 : 1 로 稀釋製造)에 耐凍劑가 除去된 受精卵을 넣고 常溫에서 3分 동안 培養한 後 FDA 가 없는 m-PBS 液에 옮겨 位相差螢光顯微鏡 (Nicon, TMD-diaphat, Japan) 100 倍에서 觀察, score 를 決定하였다. Score 는 6 段階로 區分하였고 이를 處理別 平均 score 로 換算하였다.

Positive-5 : 受精卵의 分割球 全體가 綠色螢光을

強하게 發散하는 것 (5點 : 100%).

Positive-4 : 受精卵 分割球중 80% 以上 綠色螢光을 띠거나 positive-5 보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는 것 (4點 : 80%).

Partial-3 : 受精卵 分割球중 60% 以上 綠色螢光을 띠는 것 또는 positive-4 보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는 것 (3點 : 60%).

Partial-2 : 受精卵 分割球의 40% 以上이 螢光을 發散하거나 또는 partial-3 보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는 것 (2點 : 40%).

Partial-1 : 受精卵 分割球의 20% 以下가 綠色螢光을 發散하는 것 (1點 : 20%).

Negative-0 : 綠色螢光이 전혀 띠지 않는 受精卵 (0點 : 0%).

平均 score 算出方法 :

Score =

$$\frac{(a \times 5) + (b \times 4) + (c \times 3) + (d \times 2) + (e \times 1) + (f \times 0)}{N}$$

a : positive-5 의 生存 受精卵數

b : positive-4 의 生存 受精卵數

c : partial-3 의 生存 受精卵數

d : partial-2 의 生存 受精卵數

e : partial-1 의 生存 受精卵數

f : negative-0 의 受精卵數

N : 凍結 融解後 回收된 受精卵數

統計處理는 分散分析과 t-檢定에 의하였고 分散分析後 有意성이 認定된 境遇에는 最少有意性 (L.S.D)에 의하여 各 處理間의 有意성을 檢定하였다.

Table 1. Effects of glycerol concentration and 0.3 M sucrose addition on embryo survival of rapid freezing

Glycerol concentration (M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	N	
1.5	35	25(71.4)	3 (12.0)	4 (16.0)	2 (8.0)	0 (0)	0 (0)	16 (64.0)	1.48 ^a
3.0	45	36(80.0)	19 (52.8)	8 (22.2)	2 (5.6)	1 (2.8)	2 (5.6)	4 (11.1)	3.81 ^b
4.5	49	40(81.6)	23 (57.5)	10 (25.0)	3 (7.5)	0 (0)	0 (0)	4 (10.0)	4.10 ^b

Freezing medium : 1.5, 3.0, 4.5 M glycerol + 0.3 M sucrose + 20% serum + m-PBS

Dilution medium ; 0.3 M sucrose + m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P₅ ; Positive-5 P₄ ; Positive-4 P₃ ; Partial-3

P₂ ; Partial-2 P₁ ; Partial-1 N ; Negative-0

Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.05).

III. 結果 및 考察

急速凍結時凍結液과 除去液에 sucrose 을 添加한 境遇 glycerol 濃度가 mouse 受精卵의 FDA-score 에 미치는 影響을 比較 調査한 結果는 Table 1 과 같다.

Mouse 受精卵의 凍結融解後 FDA-score 는 glycerol 濃도에 따라 差異를 나타내고 있었으며, 3.0 M, 4.5 M 區가 1.5 M 區에 비해 有意的으로 높은 FDA-score 를 나타내고 있었다(P<0.05). P₅ 와 P₄의 分布는 1.5 M의 境遇 28.0%, 3.0 M : 75.0%, 4.5 M : 82.5%로서 glycerol 濃度가 增加됨에 따라 生存受精卵의 比率는 높아지는 傾向을 나타내었다.

Schilling et al(1982)은 FDA-test 에서 3等級(positive, partial, negative)으로 分類하여 培養했을 때 positive에서 86.4%, partial : 13.8%, negative : 0%가 發育하였다고 報告하였으며, 本實驗의 P₁~P₃(partial)에 있어서도 培養하면 發育할 可能性이 있을 것으로 생각된다.

Sucrose 를 凍結液에 添加하지 않고 mouse 受精卵를 two-step 으로 凍結했을 때 glycerol 濃度 1.5~4.0 M 에서는 受精卵의 生存率이 不良하였으나, sucrose 를 함께 添加했을 때는 높은 受精卵의

生存率을 얻을 수 있었다고 Miyamoto 와 Ishibashi (1983, 1986)는 報告하였다. 또한, 受精卵 生存率은 2.0~3.0 M glycerol 보다 4.5 M 일때 低下되는 傾向을 나타낸다고 하여 本實驗 結果와 다소 差異를 나타내고 있었다.

Williams 와 Johnson(1986)은 mouse 受精卵를 凍結했을 때 0.25 M sucrose 와 2.0 M glycerol 을 凍結液에 增加하였을 경우 受精卵 生存率이 가장 높다고 하였으며(67%), 4.0 M 에서는 역시 生存率이 떨어진다는 Miyamoto 와 Ishibashi(1986)와 같은 結果를 報告한 바 있다. 그러나 0.5 M sucrose 를 凍結液에 添加하여 glycerol 濃도에 따라 急速凍結을 試驗한 Szeffill 과 Shelton(1986 a)은 4.0 M 보다 3.0 M glycerol 의 生存率이 優秀하였다고 報告하였다.

이상의 報告을 綜合하여 볼 때 mouse 受精卵 凍結에서 sucrose 의 添加는 대부분이 優秀한 生存率을 나타내는 한편, glycerol 은 1.5 M 보다 2.0~3.0 M 에서 受精卵 生存率이 良好하였는데 本實驗에서는 3.0~4.5 M 에서 높은 生存率을 나타내었다.

凍結液에 sucrose 代用으로 0.3 M raffinose 을 利用하여 mouse 受精卵를 急速凍結할 때 glycerol 濃도에 따른 受精卵의 FDA-score 는 Table 2 에 보여준 바와 같다.

Table 2. Effects of glycerol concentration and 0.3 M raffinose addition of embryo survival of rapid freezing

Glycerol concentration(M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	N	
1.5	32	30(93.8)	13 (43.3)	12 (40.0)	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	2 (6.6)	3.97
3.0	32	28(87.5)	19 (67.9)	4 (14.3)	1 (3.6)	0 (0)	1 (3.6)	3 (10.7)	4.11
4.5	29	28(96.6)	11 (39.3)	8 (28.6)	3 (10.7)	1 (3.6)	1 (3.6)	4 (14.3)	3.54

Freezing medium ; 1.5, 3.0, 4.5 M glycerol + 0.3 M raffinose + 20% serum + M-PBS

Dilution medium ; 0.3 M raffinose + m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P₅ ; Positive-5 P₄ ; Positive-4 P₃ ; Partial-3

P₂ ; Partial-2 P₁ ; Partial-1 N ; Negative-0

Raffinose를凍結液에添加했을 때 FDA-score는 3.0 M glycerol에서 가장 높은 score(4.11)를 나타낸 반면 4.5 M에서는 3.54로 가장 낮은 score를 나타내었으나各濃度間에統計的인有意差는 없었다.

Raffinose添加效果를 sucrose(Table 1 참조)와比較할 때相異한結果를 나타내어 sucrose는 4.5 M glycerol에서 score가 높았으나 raffinose의境遇는 도리어 4.5 M보다 3.0 M에서 높은 score를 보였다. P₅와 P₄의生存受精卵比率은 glycerol 1.5, 3.0, 4.5 M에서各各 83.3%, 82.2%, 67.9%를 나타내어 1.5 M과 3.0 M이 높았으나 P₅의比率만을 볼 때 3.0 M에서 67.9%로他濃度보다優秀하게 나타나고 있었다.

이러한結果로 볼 때凍結液에添加되는 sucrose와 raffinose는 glycerol濃度에 따라受精卵의生存率에 미치는影響이 다른 것으로 思料된다.

急速凍結에 있어서凍結液과除去液에添加된 sucrose濃度에 따른 mouse受精卵의 FDA-score는 Table 3에提示한 것과 같다.

受精卵의 FDA-score는 sucrose濃度가增加됨에 따라 점차 떨어졌고(0.3 M : 3.12, 0.5 M : 2.28, 1.0 M : 0), P₅와 P₄의生存受精卵比率은 0.3, 0.5 및 1.0 M sucrose에서各各 64.7%, 25.0% 및 0%의比率을 나타냈다.

이러한結果로 볼 때 sucrose의濃度는受精卵의生存率을增加시키는데 중요한役割을 하며, Whilliams와 Johnson(1986), Chupin과 Reviere(1986)는 0.5 M sucrose를添加했을 때生存率이 가장 높았다고報告하였고, 1.0 M 일 때에는 도리어受精卵의生存率은低下된다는 것이 Chupin과 Reviere(1986)에 의하여 일러졌다. 또한, sucrose의效果는 glycerol濃度에 따라生存率에差異를 보이고 있어 Szeffill과 Shelton(1987)은 5.0 M glycerol 일 때에는 0.5 M sucrose를, 3.0 M glycerol 일 때에는 0.25 M sucrose의添加가 가장 높은生存率을 얻을 수 있다고指摘하였다.

本實驗에서도 이와類似한結果를 나타내어 3.0 M glycerol에서 0.3 M sucrose添加는受精卵生存率을向上시켰다.

急速凍結에 있어凍結液과除去液에添加된 raffinose의濃度에 따른 mouse受精卵의 FDA-score을比較한 것은 Table 4와 같다.

Raffinose濃度가增加할수록 낮은 FDA-score를 보였으며(0.3 M : 4.26, 0.5 M : 2.91, 1.0 M : 0), P₅와 P₄의生存受精卵比率도 0.3 M : 84.2%, 0.5 M : 43.4%, 1.0 M : 0%順으로 나타나고 있었다.

이와 같은結果를 sucrose處理(Table 3 참조)와比較하여 보면,濃度가增加할수록 FDA-score가 떨어지는傾向은一致하였으나,全般的으로 raffin-

Table 3. Effects of sucrose concentration in the freezing and dilution medium on embryo survival of rapid freezing

Sucrose concentration(M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	N	
0.3	22	17(77.3)	2 (11.8)	9 (52.9)	2 (11.8)	0 (0)	1 (5.9)	3 (17.6)	3.12 ^b
0.5	19	16(84.2)	4 (25.0)	0 (0)	2 (12.5)	3 (18.8)	6 (37.5)	1 (6.3)	2.38 ^b
1.0	23	22(95.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	0.00 ^a

Freezing medium : 3.0 M glycerol+0.3, 0.5, 1.0 M sucrose + 20% serum + m-PBS

Dilution medium : 0.3, 0.5, 1.0 M sucrose + m-PBS

Percentage of embryos in parentheses

P₅ : Positive-5 P₄ : Positive-4 P₃ : Partial-3

P₂ : Partial-2 P₁ : Partial-1 N : Negative-0

Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.01).

Table 4. Effects of raffinose concentration in the freezing and dilution medium on embryo survival of rapid freezing

Raffinose concentration(M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	N	
0.3	29	19(65.5)	14 (73.7)	2 (10.5)	1 (5.3)	0 (0)	0 (0)	1 (5.3)	4.26 ^b
0.5	28	23(82.1)	3 (13.0)	7 (30.4)	5 (21.7)	2 (8.7)	5 (21.7)	1 (4.3)	2.91 ^b
1.0	25	10(40.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0.00 ^a

Freezing medium : 3.0 M glycerol+0.3, 0.5, 1.0 M raffinose + 20% serum + m-PBS

Dilution medium : 0.3, 0.5, 1.0 M raffinose + M-PBS

percentage of embryos in parentheses

P₅ : Positive-5 P₄ : Positive-4 P₃ : Partial-3

P₂ : Partial-2 P₁ : Partial-1 N : Negative-0

Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.01).

ose 處理에서 높은 FDA-score 를 보여주었다. 또한 1.0 M sucrose 와 raffinose 에서 生存受精卵이 없었던 것은 凍結前 受精卵 内部에 있던 水分의 지나친 脫水(Wood 와 Farrant, 1980)와 凍結融解後 glycerol 를 除去할 때 受精卵 内部와 除去液間의 滲透壓差에 의한 影響인 것으로 思料된다.

IV. 摘 要

本 試驗은 mouse 受精卵을 利用하여 液體窒素 (container 內)에서 效率的인 急速凍結方法을 提示 하기 위하여 耐凍劑 濃度와 sucrose 代用으로서 raffinose 의 利用 可能性을 檢討하였으며, 그 結果

를 요약하면 다음과 같다.

1. 凍結液과 耐凍劑 除去液에 sucrose 0.3 M 를 添加할 境遇 glycerol 濃度에 따른 FDA-score 는 1.5, 3.0, 4.5 M 에서 各各 1.48, 3.81, 4.10 으로서 1.5 M 과 4.5 M 間에는 有意差가 있었다($P < 0.05$).

2. Raffinose 0.3 M 를 凍結液과 耐凍劑 除去液에 添加할때 glycerol 濃度에 따른 FDA-score 는 1.5 M 에서 3.97, 3.0 M : 4.11, 4.5 M : 3.54 로서 各 處理間 有意差는 없었다.

3. 凍結液과 除去液에 添加한 sucrose 또는 raffinose 의 濃度에 따른 FDA-score 는 sucrose 處理에서 0.3 M : 3.12, 0.5 M : 2.38, 1.0 M : 0 을 나타내었고, raffinose 處理에서는 各各 4.21, 2.91, 0 를 보여, sucrose 와 raffinose 에서 0.3 M 이 優秀 하였으며, 1.0 M 과 他處理間에는 有意差가 認定되었다($P < 0.01$).

V. 引用文獻

1. Chupin, D. and M. M. De Reviere 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26 : 159-166.
2. Fahy, G.H., D.R. MacFarlane, C.A. Angell, H.T. Meryman. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*,
3. Hsu, T.T., H. Yamakawa, J. Yamanoi and S. Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 32 : 29-32.
4. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59 : 51-56.
5. Leibo, S.P. 1983. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. *Cryo-Letters.*, 4 : 387-400.
6. Leibo, S.P., P. Mazur. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. Academic Press, New York : 179-197.
7. Mazur, P. 1977. Slow freezing injury in mammalian cells. in : The freezing of mammalian embryos. Ciba Foun Symp. No. 52 : 19-45.
8. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Solid CO₂ freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 471-478.
9. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 471-478.
10. 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.
11. Schilling, E., H. Nieman and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15 : 245-248.
12. Szeffill, A. and J.N. Shelton. 1986 a. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapid in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76 : 401-408.
13. Szeffill, A. and J.N. Shelton. 1986 b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 699-703.
14. Szeffill, A. and J.N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80 : 309-316.
15. 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.
16. Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23 : 235.
17. Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 26 : 125-133.
18. 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.