

## 제 2일째 생쥐 배아의 초자화동결과 초급속동결

대학 산부인과<sup>1</sup>, 성신여자대학교 자연과학대학 생물학과<sup>2</sup>

양정숙<sup>1</sup> · 손 철<sup>1</sup> · 배인하<sup>2</sup>

### Vitrification and Ultrarapid Freezing of Day 2 Mouse Embryos

Jung-Sook Yang<sup>1</sup>, Cheri Sohn<sup>1</sup>, In-Ha Bae<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Taehak Infertility Clinic, <sup>2</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences,  
Sungshin Women's University

**Objective:** The study was performed to compare the survival rate and the development of day 2 mouse embryos which had freezing procedures done.

**Methods:** We used three different vitrification solutions (EFS, VS14, DPS) and a ultrarapid freezing solution (UFS) for cryopreservation of day 2 mouse embryo.

**Results:** We tested toxicity by exposing embryos to vitrification solutions and a ultrarapid freezing solution. The survival rates are 100%, 97.8%, 95.6% and 100% (EFS, VS14, DPS and UFS). After cultured for 96 hours, hatching rates of each group are 93.5% (no freezing), 95.6% (EFS), 86.4% (VS14), 93.0% (DPS), and 93.0% (UFS). There is no significant differences among groups. The survival rates after thawing cryopreserved embryos are 80.2%, 91.7%, 69.5%, 0% and 91.8% (slow freezing, EFS, VS14, DPS and UFS). Also cultured for 96 hours, the hatching rates are 93.5% (no freezing), 84.1% (slow freezing), 93.9% (EFS), 48.5% (VS14) and 70.1% (UFS).

**Conclusion:** The survival rates of vitrification in EFS solution and ultrarapid freezing are higher than slow freezing ( $p < 0.05$ ). The hatching rate of vitrification in EFS solution cultured for 96 hours is highest, so vitrification of day 2 mouse embryos in EFS solution considered as more effective for cryopreservation.

**Key Words:** Day 2 mouse embryo, Vitrification, Ultrarapid freezing

포유류 배아의 동결보존에 영향을 미치는 요인은 항동해제의 종류와 농도,<sup>1</sup> 항동해제에 노출되는 시간, 노출시 온도,<sup>2,3</sup> 동결되는 배아의 세포주기<sup>4</sup> 그리고 동결되는 배아의 종 (species)<sup>5</sup>을 들 수 있다. 또한, 과냉각 (supercooled) 상태에서 식빙 (seeding)시에 생기는 결빙 형성 (ice crystallization)이 동결보존 후 융해시 생존율에 큰 영향을 미친다.<sup>6</sup>

생쥐 배아를 완만동결 후 완만융해 방법으로 동결보존에 성공한 Whittingham<sup>7</sup> 이후 동결보존에 관한 여러 가지 방법이 연구되어 왔다.

높은 생존율을 얻으면서 완만동결보다 시간, 노

력을 절약하기 위해 포유류 배아의 동결법을 변형하여 동결, 융해과정을 단순화하는 방법들이 보고되었다.<sup>8-10</sup> Rall과 Fahy<sup>11</sup>는 생쥐 배아를 액체질소에 바로 침지하여 결빙 형성이 일어나지 않게 하는 초자화동결법으로 동결보존에 성공하였다.

한편, Trounson 등<sup>12</sup>은 고농도의 dimethyl sulfoxide (DMSO) 용액과 sucrose를 사용하여 실온에서 생쥐 2세포 배아를 액체질소에 직접 침지하는 방법인 초급속동결법 (ultrarapid freezing)으로 동결보존에 성공하여 완만동결의 단점을 극복하였다.

본 연구는 초자화동결액 (vitrification solution)으로 세포내로의 투과성을 갖고 있는 ethylene glycol

과 Ficoll, 세포내로의 투과가 불가능한 sucrose를 사용한 EFS용액,<sup>13</sup> ethylene glycol과 sucrose 혼합용액인 VS14<sup>14</sup> 그리고 DMSO, propylene glycol과 sucrose를 기본으로 한 DPS용액<sup>15</sup>을 사용하였다. 또한, 초급속동결액 (ultrapid freezing solution; UFS)으로는 DMSO와 sucrose를 사용하여<sup>12</sup> 완만동결법과 비교, 제 2일째 생쥐 배아의 효율적인 동결보존법을 찾고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

생후 5~8주의 B6CBA F1 (C57BL/6×CBA/N) 계통의 생쥐 암컷을 7.5 IU의 PMSG (Sigma)와 hCG (Sigma)를 47시간 간격으로 주사하여 과배란을 유도한 후 수컷과 합사시켰다. 다음 날 질전이 확인된 암컷을 제 1일로 하여 2일째 (hCG 주사 후 48시간)에 난관을 10% FBS가 함유된 dPBS (Gibco)용액으로 관류하여 2세포 배아를 수집하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 동결액 (freezing solution)

10% FBS가 함유된 dPBS를 모든 처리액의 기본액으로 사용하였다. 대조군인 완만동결은 1.5 M 1,2-propanediol (PrOH)과 0.1 M sucrose를 첨가하였다.

초자화동결액의 EFS는 ethylene glycol 40% (v/v), Ficoll (molecular weight 70,000) 30% (w/v), 0.5 M sucrose를 기본액에 혼합하였고, VS14용액은 5.5 M ethylene glycol, 1.0 M sucrose를 혼합하였으며, DPS용액은 2.75 M의 DMSO와 propylene glycol 그리고 1.0 M sucrose를 녹여 사용하였다. 또한 초급속동결액 (ultrapid freezing solution; UFS)은 3.5 M DMSO와 0.25 M sucrose를 혼합시켰다. 모든 용액은 여과 멸균 후 사용하였다.

#### 2) 융해액 (thawing solution)

완만동결의 경우 기본액에 0.4 M sucrose를 넣었고 EFS, VS14, DPS 그리고 UFS용액은 각 0.5 M, 1.0 M, 0.3 M, 0.25 M의 sucrose를 녹여 여과 멸균 후 사용하였다.

#### 3) 동결액의 독성실험 (test of toxicity of freezing solution)

수집된 배아를 EFS, VS14, DPS 그리고 UFS용액에서 각 2분, 1분, 0.5분, 2.5분씩 탈수화 시간

(dehydration time)동안 상온에서 노출시킨 후 각 용해액에서 EFS 실험군은 5분, VS14, DPS, 그리고 UFS 실험군은 10분간 처리한 다음 기본액으로 충분히 세척하여 배양하였다.

### 4) 동결방법

#### (1) 완만동결 (slow freezing, S/F)

수집된 배아를 동결액에 10분간 탈수화 (dehydration)하는 동안 straw (IMV)에 동결액과 함께 10~15개의 배아를 넣은 후 straw powder와 capillary tube sealer (Critoseal)로 straw 끝을 막았다. Ethanol bath automatic freezer (IWAKI, Japan)로 10℃에서 시작하여 -6℃에 식빙 (seeding)한 후 -0.25℃/분의 속도로 -30℃까지 냉각 후 straw를 서서히 액화질소 (-196℃)에 침지하였다.

#### (2) 초자화동결과 초급속동결 (vitrification and ultrapid freezing)

수집된 배아를 완만동결과 같은 방법으로 straw에 넣은 후 각 동결액의 탈수화 시간에 맞추어서 질소통에 옮겨 서서히 액화질소에 침지하였다.

### 5) 융해 및 배양

#### (1) 완만동결의 융해 (thawing of slow freezing)

24시간 이상 냉동보존 하였던 straw를 상온에서 10초간 약하게 흔들었다. 멸균된 거즈로 straw밖의 수분을 닦고 가위로 양 끝을 자른 후 배아를 수집하여 융해액에서 8분간 방치하였다. 기본액으로 충분히 세척한 후 배아의 생존여부를 확인하여 배양하였다.

#### (2) 초자화동결의 융해 (thawing of vitrification)

EFS 실험군의 straw는 액체질소에서 꺼내 20℃ 수조에서 동결액이 액체화되는 것을 확인하여 완만동결군과 같은 방법으로 배아를 수집한 후 융해액에 5분간 방치 후 기본액으로 충분히 세척하여 배양하였다. DPS 실험군은 40℃ 수조에서 1분, VS14 실험군은 25℃ 수조에서 6~10초 동안 straw의 동결액이 액체화 된 것을 확인하고 완만동결군과 같은 방법으로 융해액에 10분 동안 방치 후 세척, 배양하였다.

#### (3) 초급속동결의 융해 (thawing of ultrapid freezing)

액체질소에서 꺼낸 straw를 37℃ 수조에서 동결액의 액체화를 확인 후 완만동결과 같은 방법으로 10분간 융해액에 방치 후 배아를 수집, 배양하였다.

#### (4) 0.4% BSA가 함유된 HTF (human tubal fluid) 배양액에서 수집된 배아를 mineral oil로 덮은 mi-

crodroplet 방법으로 배양하여 72시간, 96시간 후에 관찰하였다. 관찰 결과는 2세포배-8세포배 (2C~8C), 상실배 (morula; MO), 포배 (blastocyst; BL), 부화중인 포배 (hatching embryo; Hng), 부화된 포배 (hatched embryo; Hed) 그리고 퇴화된 배 (degenerated embryo; Deg)로 분류하였다.

6) 통계처리

대조군과 실험군의 통계적 유의성은 spss/pc\* (version 3.0)을 이용하여 student t-test로 하였다.

결 과

1. 초자화동결액과 초급속동결액의 독성실험

1) Figure 1은 EFS, VS14, DPS 그리고 UFS (ultra-rapid freezing solution)용액에 각각의 탈수화 시간 (dehydration time) 동안 노출시킨 후 각 용해액에 재수화 시간 (rehydration time)동안 처리하여 세척한 후의 생존율이다. EFS, UFS 실험군은 45개, 43개가 모두 생존하여 100.0%의 생존율을 보였고,

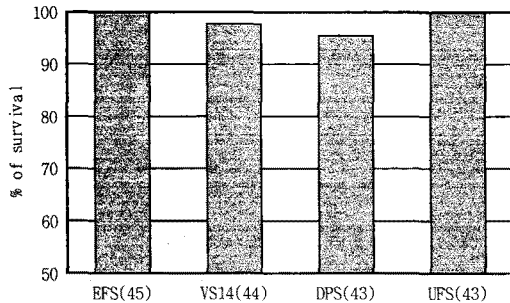


Figure 1. Survival rate of exposed embryos in various solutions. The results were obtained by four replicates. ( ) ; number of embryos.

VS14 실험군은 45개 중 44개가, DPS 실험군은 45개 중 43개가 생존하여 각각 97.8%와 95.6%의 생존율을 보였다.

2) Table 1은 생존한 배아를 96시간 동안 배양한 결과이다. EFS 실험군은 부화기까지 (Hng-Hed) 95.6%를 보였고, DPS와 UFS 실험군은 모두 93.0%의 부화율을 보여 동결액을 처리하지 않은 대조군의 93.5%와 비슷한 발생율을 보였다. VS14 실험군은 86.4%의 낮은 부화율을 보였지만 역시 다른 실험군과 유의한 차이는 없었다.

2. 초자화동결과 초급속동결

1) Figure 2는 동결 후 용해중의 회수율 결과이다. 대조군인 완만동결군 (S/F)은 95.6%, EFS와 VS14 실험군은 90.5%, DPS 실험군은 90.0%, 그리고 UFS 실험군은 92.4%의 회수율을 보여 각 군과 유의한 차이는 없었다.

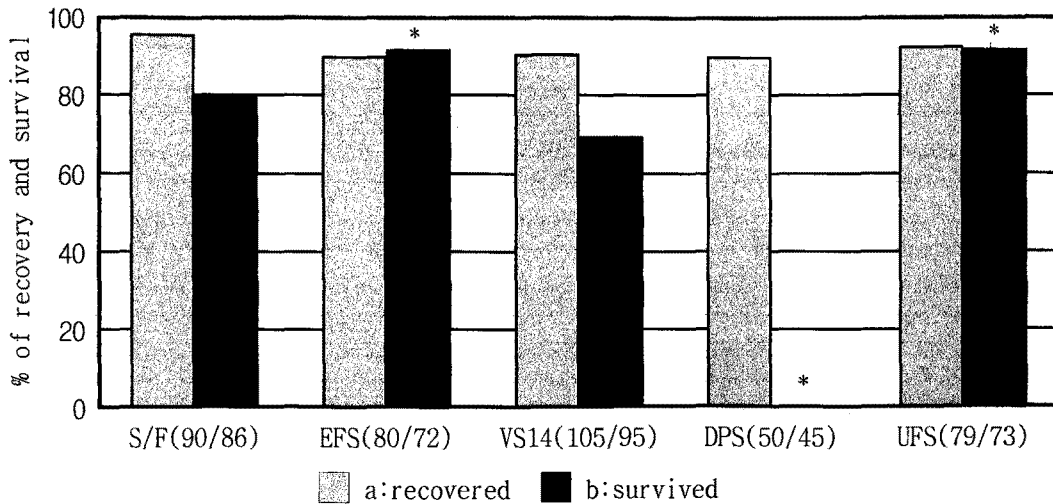
2) Figure 2는 회수된 배아중 생존한 비율이다. 대조군인 완만동결군은 80.2% (69/86)를 보였다. EFS와 UFS 실험군은 91.7% (66/72), 91.8% (67/73)를 보여 대조군보다 높은 생존율을 보였다 (control vs. EFS, UFS;  $p < 0.05$ ). VS14 실험군은 69.5% (66/95)의 생존율을 보였으나 대조군과 유의한 차이는 없었다. DPS 실험군은 회수된 배아 45개중 생존한 배아는 없었다 (Figure 3A).

3) Table 2는 동결-용해 후 생존한 배아를 72시간 배양한 결과이다. 대조군인 동결하지 않은 군 (N/F), 완만동결군, EFS 실험군 그리고 UFS 실험군은 비슷한 발생을 보였다. VS14 실험군은 2세포기에서 8세포기에 정지한 배아가 있고, 부화율 (Hng-Hed)이 낮은 반면 퇴화율이 높아 대조군과 유의한 차이를 보였다 (control vs. VS14;  $p < 0.05$ . Figure 3B, C, D).

Table 1. Developmental rate of exposed embryos in various solutions\*

	No. of embryos	No. of developed embryos (%)			
		BL	Hng	Hed	Deg
N/F	62	1 (1.6)	33 (53.2)	25 (40.3)	3 ( 4.8)
EFS	45	1 (2.2)	27 (60.0)	16 (35.6)	1 ( 2.2)
VS14	44	0 (0.0)	15 (34.1)	23 (52.3)	6 (13.6)
DPS	43	2 (4.7)	23 (53.5)	17 (39.5)	1 ( 2.3)
UFS	43	1 (2.3)	22 (51.2)	18 (41.9)	2 ( 4.7)

N/F; no freezing, \*; 96 hr culture



**Figure 2.** Recovery rate and survival rate of cryopreserved embryos in various solutions. The results were obtained by six replicates. a; recovered/vitrified embryos, b; survived/recovered embryos. \*;  $p < 0.05$ , Significantly differs from the control (S/F). ( ) ; number of embryos.

**Table 2.** Developmental rate of cryopreserved embryos after thawing\*

	No. of embryos	No. of developed embryos (%)					
		2C~8C	MO	BL	Hng	Hed	Deg
N/F	62	0 ( 0.0)	0 (0.0)	14 (22.6)	41 (66.1)	4 ( 6.5)	3 ( 4.8)
S/F	69	0 ( 0.0)	1 (1.4)	16 (23.2)	34 (49.3)	14 (20.3)	4 ( 5.8)
EFS	66	0 ( 0.0)	0 (0.0)	10 (15.2)	49 (74.2)	6 ( 9.1)	1 ( 1.5)
VS14	66	10 (15.2)	4 (6.1)	14 (21.2)	25 (37.9)	1 ( 1.5)	12 (18.2) <sup>†</sup>
UFS	67	0 ( 0.0)	1 (1.5)	25 (37.3)	29 (43.3)	5 ( 7.5)	7 (10.4)

The results were obtained by six replicates.

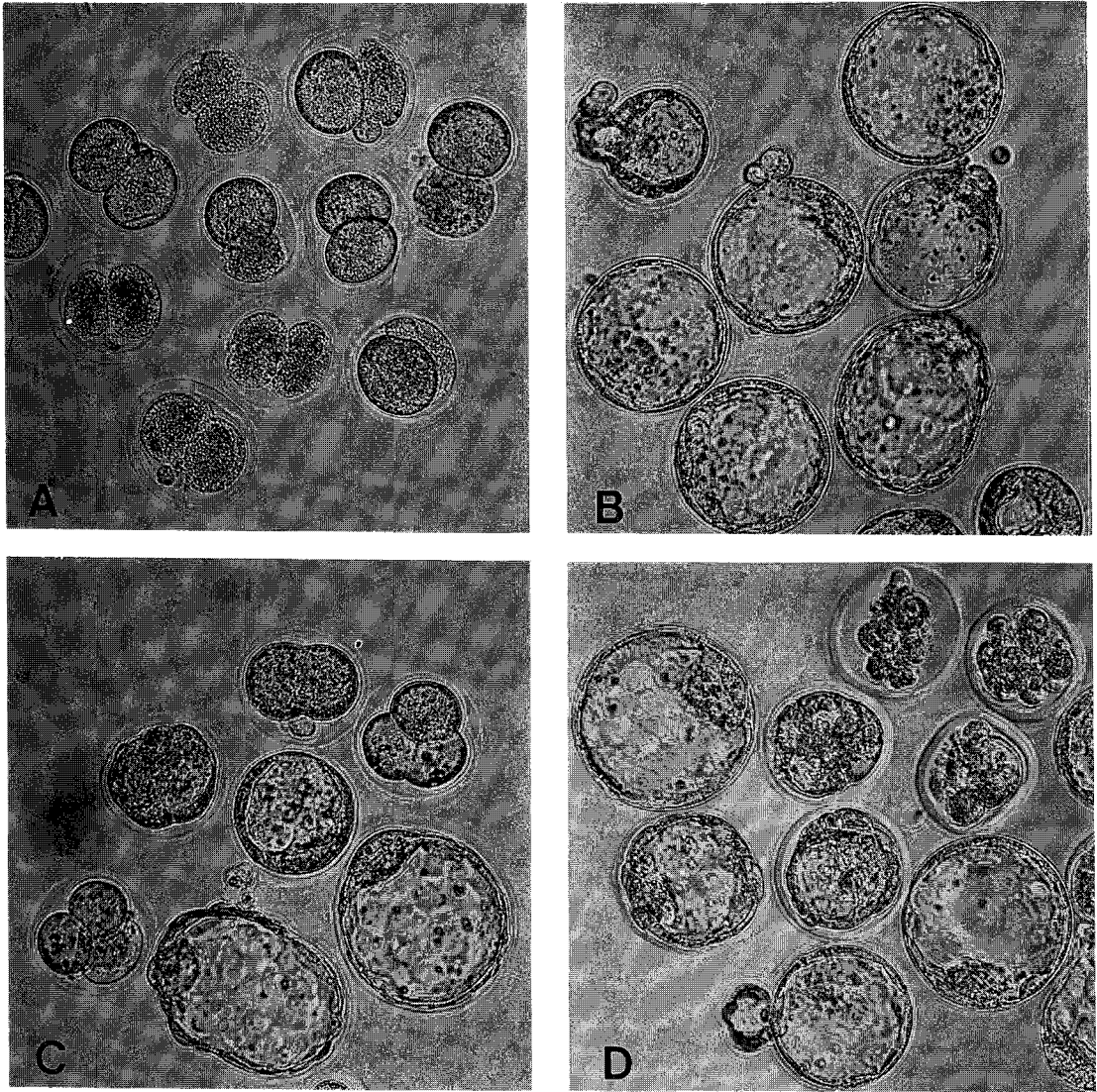
N/F; no freezing, \*; 72 hr culture, <sup>†</sup>;  $p < 0.05$ , Significantly differs from the control (N/F)

**Table 3.** Developmental rate of cryopreserved embryos after thawing\*

	No. of embryos	No. of developed embryos (%)				
		MO	BL	Hng	Hed	Deg
N/F	62	0 (0.0)	1 (1.6)	33 (53.2)	25 (40.3)	3 ( 4.8)
S/F	69	0 (0.0)	6 (8.7)	18 (26.1)	40 (58.0)	5 ( 7.2) <sup>†</sup>
EFS	66	0 (0.0)	1 (1.5)	32 (48.5)	30 (45.5)	3 ( 4.5)
VS14	66	4 (6.0)	2 (3.0)	24 (36.4)	8 (12.1)	28 (42.4) <sup>†</sup>
UFS	67	0 (0.0)	3 (4.5)	26 (38.8)	21 (31.3)	17 (25.4) <sup>†</sup>

The results were obtained by six replicates.

N/F; no freezing, \*; 96 hr culture, <sup>†</sup>;  $p < 0.05$ , Significantly differs from the control (N/F)



**Figure 3.** Embryos after frozen-thawed in DPS slouction (A). Embryos cultured for 72 hours after frozen-thawed in EFS (B), VS14 (C), UFS (D). X400.

4) Table 3은 동결-융해 후 생존한 배아를 96시간 배양한 결과이다. 대조군인 동결하지 않은 군과 EFS 실험군의 부화율 (Hng-Hed)이 93.5%, 93.9%로 비슷했지만 완만동결군, VS14 실험군, UFS 실험군은 84.1%, 48.5%, 70.1%로 낮은 부화율을 보였다. VS14 실험군의 퇴화율이 가장 높았으며 대부분 상실배 이전의 단계에서 퇴화한 것이다 (control vs. S/F, VS14, UFS;  $p < 0.05$ ).

## 고 찰

포유류 배아의 동결보존은 항동해제에 적당한 시간동안 노출, 빙점이하로 냉각시킨 후 액체질소에 보존, 해동 후에 마지막으로 항동해제를 희석하여 생리적 환경에 적합하게 만들어서 발달을 이루어지게 하는 과정으로 이루어진다.

1972년 Whittingham 등<sup>7</sup>은 생쥐 배아를 동결-융해하는데 성공하였고, 이후로 방법을 최소화 하면

서 동결보존 결과 생존율을 높이기 위한 방법이 연구되었다.<sup>8~10</sup>

Rall과 Fahy<sup>11</sup>는 초자화동결법으로 생쥐 배아의 동결에 접근, 급속한 냉각으로 액체상태의 분자 배열 그대로 고체화되어 결빙이 일어나지 않으므로 물리적 손상이 적다는 것을 보고하였다. 포유류 배아를 냉동할 때 보통 저온에서 과냉각 (supercooled)되기 때문에 응해되는 동안에 결빙이 이루어질 수 있어 세포파괴를 초래할 수 있고, 이런 결빙을 막기 위해서 고농도의 항동해제를 사용하였다.<sup>16</sup> Rall과 Fahy<sup>11</sup>는 세포막 투과성인 DMSO, acetamide, propylene glycol과 비투과성인 polyethylene glycol을 사용하였지만, 이러한 항동해제는 높은 점성을 갖고, 항동해제의 독성을 최소화하기 위해 낮은 온도 (4°C)에서 실시해야 했다. 그러나 1990년 Kasai<sup>13</sup>는 ethylene glycol과 점성이 낮으면서 응해가 잘되어 응해시 결빙을 방지하는 동시에 ethylene glycol의 독성을 감소시키는 Ficoll, 그리고 응해시 세포내 항동해제 제거를 위해 sucrose를 사용한 EFS용액으로 생쥐 상싹배를 상온 (20°C)에서 동결하는데 성공하였다.

Ali와 Shelton<sup>14</sup>은 ethylene glycol과 glycerol을 포함한 VS1과 VS11 그리고 ethylene glycol과 sucrose를 포함한 VS14를 착상전 초기 발생시기의 배아에 적용하여 상온에서 동결-응해시켜 생존율과 발생율을 얻었다. VS14는 가장 독성이 약한 것으로 Swiss Outbred 2세포 배아를 독성실험한 결과 81%, 동결-응해 후 71%의 생존율을 보고하였다. 본 실험에서는 독성 노출 실험결과 100%의 생존율을 보여 B6CBA F1계통의 2세포 배아가 Swiss Outbred계통의 배아보다 높은 비율을 보였고, 동결-응해 후 69.5%의 생존율은 Swiss Outbred계통의 배아와 비슷한 결과를 나타내었다. 또한, VS14 실험군을 본 실험의 다른 실험군과 비교할 때 가장 낮은 생존율과 발생율을 보였다.

한편, 비투과성인 sucrose만 존재하는 항동해제로 빠르게 유리화 시켜서 높은 생존율을 얻을 수 없으므로 투과성 항동해제의 필요성이 보고되었고,<sup>17,18</sup> Tada<sup>15</sup>는 투과성인 glycerol이나 propylene glycol을 포함한 용액은 독성을 감소시키지만, 비투과성인 sucrose가 없는 DP용액 (DMSO와 propylene glycol solution)에서는 생존율이 낮다고 보고하였다. 따라서, DP용액에 sucrose를 첨가한 DPS 용액으로 B6C3F1 2세포 배아를 상온에서 동결-응해 후 생존율과 포배 형성율 82%를 얻었다.

본 실험에서는 동결-응해 후 생존율이 0%를 나타내어 Tada의 실험결과와 다른 양상을 보여 생쥐 계통에 따른 결과라고 생각되며 이에 대한 항동해제의 수정, 보완과 동결방법에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

또한, Trounson 등<sup>12</sup>은 고농도의 DMSO를 이용하여 상온에서 생쥐 2세포 배아를 액체질소에 침지하여 성공적인 생존율과 발생율을 보인 초급속 동결법 (ultrarapid freezing)을 보고하였고, Wilson과 Quin<sup>19</sup>은 다단계 응해법으로 DMSO가 서서히 세포로부터 나오고 수분이 세포내로 서서히 들어가 (rehydration) 삼투압에 의한 충격 (osmotic shock)과 세포응축을 감소시켜 87%의 높은 생존율을 얻었다. 또한, 사람의 착상전 초기 배아를 초급속 동결법으로 동결-응해하여 정상적인 생존과 발달이 보고되었고,<sup>20</sup> 완만동결시 일어나는 수정란의 투명대 손상이 초급속동결법으로 감소한다고 보고된 바 있다.<sup>21</sup>

본 실험에서는 초자화동결액 3종류 EFS, VS14, DPS 그리고 초급속동결액 UFS로 생쥐 2세포 배아를 고속 동결-응해하여 완만동결군과 비교, 가장 효과적인 방법을 찾고자 하였다.

동결-응해 후 초자화동결액 EFS와 초급속동결액 UFS는 완만동결군의 생존율보다 유의하게 높은 비율을 보였고 ( $p < 0.05$ ), 72시간 배양결과 대조군과 유의성을 보이지 않아 초자화동결법과 초급속동결법의 효율성을 시사하였다. 96시간 배양결과 초급속동결액 UFS는 퇴화율이 대조군과 완만동결군보다 높게 보였지만, 초자화동결액 EFS는 대조군과 비슷한 발달을 보였다. 특히, EFS 실험군의 부화율 (Hng-Hed)은 완만동결군보다 높아 초고속동결액 중 가장 효과적임을 알 수 있었다. 따라서, 생쥐 2세포 배아 동결보존에 EFS용액을 이용한 초자화동결법이 유용하다고 사료된다.

## 참고 문헌

1. Kasai M, Niwa K, Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1981; 63: 175-80.
2. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988; 49: 743-64.
3. Nowshari MA, Nayudu PL, Hodges JK. Effect

- of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Hum Reprod* 1995; 10(12): 3237-42.
4. Balakier H, Zenzes M, Wang P, MacLusky NJ, Casper RF. The effect of cryopreservation on the development of S- and G<sub>2</sub>-phase mouse embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1991; 8: 89-95.
  5. Friedler S, Shen E, Lamb EJ. Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification: methodologic studies. *Fertil Steril* 1987; 48: 306-14.
  6. Szell A, Shelton JN. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1986; 78: 699-703.
  7. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryo frozen to -196 °C and -296 °C. *Science* 1972; 178: 411-4.
  8. Wood MJ, Farrant J. Preservation of mouse embryo by two-step freezing. *Cryobiology* 1980; 17: 178-80.
  9. Gordts S, Roziers P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril* 1990; 53: 469-72.
  10. Dinnyes A, Wallace GA, Rall WF. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 429-35.
  11. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos and at -196 °C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
  12. Trounson A, Peura A, Kerby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987; 48: 843-50.
  13. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 91-7.
  14. Ali J, Shelton JN. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 459-65.
  15. Tada N, Sato M, Amann E, Ogawa S. A simple and rapid method for cryopreservation of mouse 2 cell embryos by vitrification: beneficial effect of sucrose and raffinose on their cryosurvival rate. *Theriogenology* 1993; 40: 333-44.
  16. Arav A, Shehu D, Mattioli M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 353-8.
  17. Szell A, Shelton JN. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J Reprod Fertil* 1986; 76: 401-8.
  18. Szell A, Shelton JN. Osmotic and cryoprotective effect of glycerol sucrose solution on day 3-mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1987; 80: 309-16.
  19. Wilson L, Quin P. Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. *Hum Reprod* 1989; 4: 86-90.
  20. Trounson A, Sjoblom P. Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. 1988; 50(2): 373-6.
  21. Tsunoda Y, Soma T, Sugie T. Effect of post-ovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morulae. *J Reprod Fertil* 1982; 65: 483-7.