

Mouse 受精卵의 超急速凍結에 있어서 Vitrification Solution 開發에 關한 研究

II. Vitrification Solution內의 非透過性 物質(Ficoll, sucrose)과 平衡時間이 超急速凍結·融解後 mouse morulae의 生存率에 미치는 影響

高敬來, 金重柱, 康珉秀, 張德支, 梁柄哲
濟州大學校 農科大學

Studies of the Improvement of Vitrification Solution in Mouse Embryos by Ultrarapid Freezing.

II. Effects of the Addition level of non-Permeable Cryoprotectants (Ficoll, sucrose) in Vitrification Solution and Equilibration Time on the Survival of Vitrofied Mouse Embryos.

College of Agriculture, Cheju National Univ.

Ko. G.R., J.K. Kim, M.S. Kang, D.G. Chang, B.Ch. Yang

SUMMARY

This study was carried out to study effects of the addition level of acetamide and non-permeable cryoprotectants(Ficoll, sucrose) in VS(20% glycerol + 10% ethyleneglycol) and equilibration time on the survival of vitrified mouse morulae.

The results are summarized as follows:

1. When 10, 15 and 20% of acetamide were added to the new vitrification solution(20G 10E), FDA-scores of embryos were 4.4(control), 4.4(10%), 3.6(15, 20%), respectively. The addition of acetamide did not affect the survival of frozen-thawed morulae.

2. The survival between 5 min(3.5) and 10 min(4.6), 10 min(4.6) and 20 min(3.2) of equilibration in 10% sucrose, and 20 min(3.2) and 5 min(4.0), or 10 min(4.3) in 20% sucrose was significantly different($P < 0.05$). The highest survival(4.6) was obtained in mouse morulae equilibrated in VS(20G10E) containing 10% sucrose for 10 minutes.

3. FDA-score of morulae frozen in the new vitrification solution containing 0, 10, 20 and 30% Ficoll was 4.5, 4.2, 4.4 and 4.6, respectively and had no significant effect among concentrations of Ficoll.

The development rate after culture(24h) was 89%(20% Ficoll) and 93% (30% Ficoll), respectively.

本 研究는 1990年度 韓國科學財團研究費지원에 의하여 수행되었음

I. 緒 論

최근 Rall과 Fahy(1985)에 의해서 氷晶이 형성되지 않는 vitrification방법이 개발되어 동결음해후의 생존율향상에 크게 기여하였으나 높은 滲透壓에 의한 細胞質 파괴와 4°C에서 조 작하여야 하는 단점이 있었다.

哺乳動物의 초기의 동결은 緩慢凍結로서 DMSO, glycerol과 같은 透過性 耐凍劑에 의해서만이 세포내의 水分을 脫水할수 있었기 때문에 시간이 많이 걸리는 번거로움이 있었지만, 내부세포의 수분을 탈수시키는 sucrose를 凍結液이나 稀釋液에 첨가 하였을 때 간단한 방법으로 受精卵을 急速凍結할 수 있게 되므로서 凍結保存液中 세포내부를 보호하는 透過性 物質과 세포외부를 보호하는 非透過性 物質의 종류와 농도, sucrose 첨가수준, 平衡時間에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kasai 등., 1980; Nguyen 등., 1984; Renard 등., 1984; Takeda 등., 1984; Leibo, 1984; 김 등., 1988). 특히, sucrose의 효과는 농도와 平衡時間 뿐만 아니라 溫度에도 좌우된다(Kasai 등., 1980, 1982; Szell 과 Shelton, 1986ab, 1987; Miyamoto 와 Ishibashi, 1986, 1989).

Szell과 Shelton(1986ab)은 凍結保存液에 10-20% sucrose를 첨가하였을 때 4°C에서 20분, 20°C에서 10분간의 平衡時間後 急速凍結하였을때 75%의 생존율을 얻었다고 보고하였으며, Trounson등(1987)은 2-cell 생쥐수정난을 10% sucrose를 첨가한 동결액에서 10분간의 평형시간후에 높은 생존율을 얻었다고 보고하였다. Kasai(1990)등은 실온에서 40% ethylene glycol과 비투과성 물질로서 30% Ficoll과 20% sucrose를 사용하여 98%의 생존율을 얻었다고 보고한 바 있다.

受精卵의 急速凍結時 세포사멸의 주원인으로 서 平衡時間, 氷晶形成을 들 수 있는데 동결과 융해시 세포내외부에서 생성되는 氷정형성은 細胞質에 物理的 壓力을 가하게 되므로서 세포질이 파괴되어 세포가 사멸하게 된다. 平衡時間은 동결액내의 투과성 물질과 세포내의 水分移動이 끝날 때까지 걸리는 시간으로 規定되는데 동결전 내동제와 세포내의 水分移動에 걸리는 적절한 시간과 融解後 세포내의 耐凍劑 移動이 세포의 발달에 큰 영향을 미치게 되므로서 凍結融解後의 生存率에 큰 영향을 미친다.

본 실험실에서는 超急速凍結에 있어서 vitrification Solution개발과 FDA生死判定이 受精卵의 培養과 移植後 着床에 미치는 影響에 대한 研究중 제1보에서 溫度와 滲透壓을 극복할 수 있는 새로운 VS(G20E10)를 발표한 바 있다.

본 연구는 vitrification內的 acetamide와 非透過性 物質(Ficoll, sucrose)의 添加水準과 平衡時間이 超急速凍結融後의 mouse morulae의 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실행되었다.

II. 材料 및 方法

1. 受精卵 採取

본 실험에 사용된 ICR mouse 受精卵은 무작위로 교배한 5-8주령된 mouse에서 얻어졌다. 過排卵 誘起를 위해서 PMSG 6 I.U.를 皮下注射 후 48시간째 HCG 6 I.U.를 皮下注射하였고 HCG 주사후 암컷을 수컷과 일대일로 합사하였으며 다음날 아침 vaginal plug검사를 하였다. 수정난은 HCG 주사후 70-75시간째 flushing media로 난관을 관류하여 신선한 m-PBS에서 두번 세척하였으며 형태적으로 정상적인 것만

실험에 사용하였다.

2. 玻璃化 溶液(vitrification solution(VS))

凍結保存液의 vitrification test에서 빙정이 형성되지 않은 혼합용액을 vitrification solution으로 간주 하였으며, 본 동결실험에서 생존율이 가장 높은 20G10E(20% glycerol + 10% ethylene glycol)를 vitrification solution으로 정하였다. acetamide, sucrose, Ficoll의 효과를 조사하기 위해서 각각 다른 농도로 VS(G20E10)에 稀釋하였고, sucrose처리에서 7-10개의 受精卵를 실온의 VS에 5, 10, 20분 동안 平衡시켰으며, 본 연구에서 사용된 vitrification solution의 組成은 다음과 같다.

New vitrification solution(20G10E)에 대한 acetamide 첨가 ;

- (1) 20G10E + 10% sucrose + m-PBS with 20% BSA : Control
- (2) 20G10E + 10% sucrose + 10% acetamide + m-PBS with 20% BSA
- (3) 20G10E + 10% sucrose + 15% acetamide + m-PBS with 20% BSA
- (4) 20G10E + 10% sucrose + 20% acetamide + m-PBS with 20% BSA

New vitrification solution(20G10E)에 대한 sucrose 첨가 ;

- (1) 20G10E + 10% sucrose + m-PBS with 20% BSA : control
- (2) 20G10E + 20% sucrose + m-PBS with 20% BSA

New vitrification solution(20G10E)에 대한 Ficoll 첨가 ;

- (1) 20G10E + 10% sucrose + m-PBS with 20% BSA : control

(2) 20G10E + 10% sucrose + 10% Ficoll + m-PBS with 20% BSA

(3) 20G10E + 10% sucrose + 20% Ficoll + m-PBS with 20% BSA

(4) 20G10E + 10% sucrose + 30% Ficoll + m-PBS with 20% BSA

각 용액은 membrane filter로 濾過한 후 4°C에서 보관하였다.

3. 超急速 凍結過程(vitrification procedures)

vitrification solution은 1ml주사기가 연결된 0.25ml plastic straw에 PS(PBS + sucrose), air bubble, PS를 주입하여 준비하였다. 본 실험에 사용된 수정란의 발달단계는 morula이며 petridish에 50ml의 VS drop에 浮遊한 후에 다른 drop에 한번 옮겼다. 수정란을 함유한 drop을 미리 준비된 straw에 주입한 후 air bubble, PS순으로 주입하여 straw powder로 封入하였다. 실온에서 5, 10, 20분 동안 평형 후 즉시 LN₂ container에 침적하여 7-15일 동안 저장하였다.

4. 生死 判定

1~2주동안 液體窒素에 저장하였던 straw를 38°C water bath에서 천천히 흔들면서 融解시켰으며, 실온의 신선한 PS로 옮겨 2분후에 受精卵를 PBS로 세번 세척한후 FDA/ml acetone의 stock solution을 1:400,000의 비율로 PBS에 稀釋한 FDA용액에 1분동안 배양한 후 m-PBS로 세번 세척하였으며 螢光顯微鏡으로 生死를 判定하거나, 24시간 전배양시킨 Ham's F10培養液(+20% FCS) drop에 옮긴 후 24, 48시간동안 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 培養한후 發達率을 검사하여 生死判定을 하였다.

5. 統計 分析

統計分析은 Minitab을 사용하여 T-test로 分析하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. Acetamide 添加 効果

Table 1은 새로 만들어진 vitrification solution에 세포 내부에 透過性이 강한 acetamid 첨가 效果를 판단하기 위하여 0, 10, 15, 20%의 acetamide를 VS(20G10E)에 첨가한 용액에서 동결된 mouse morula의 生存率은 각각 4.4(88%), 4.4(88%), 3.6(72%), 3.3(66%)이었다 (P<0.05).

이것은 acetamide의 濃度를 높였을 때 P5와 P4의 비율이 감소하기 때문에 逆效果를 나타내는 것을 提示하여 주고, 그러므로 본 실험에서 vitrification solution에 acetamide를 첨가 하는것은 바람직하지 않으며, VS에 대한 acetamide의 添加效果는 없는 것으로 나타났으며 acetamide의 添加濃度가 높을수록 生存率이 감소하는 것은 높은 滲透壓에 基因하는 것으로서 본 실험에 사용된 VS(20G10E)는 氷晶이 形成되지 않기 때문에 acetamide의 첨가는 불필요 하다고 思料되며, 기존의 Rall과 Fahy (1985)의 vitrification solution과 相反되며 앞으로 滲透壓에 대한 더 많은 研究가 要求 되어 된다.

Table 1. Effect of acetamide addition to new vitrification solution(20G10E) on the survival rate of frozen-thawed mouse morula embryos

Acetamide concentration(%)*	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test(%) ⁺						Mean FDA score
			P ₆	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀	
0	50	41	29 (71)	7 (17)	1 (2)	2 (5)	2 (5)	0 (0)	4.4 ^b
10	50	44	29 (66)	9 (21)	2 (4)	2 (4)	2 (4)	0 (0)	4.4 ^b
15	50	40	20 (50)	7 (18)	3 (8)	3 (8)	1 (3)	6 (15)	3.6 ^{ac}
20	50	50	22 (44)	9 (18)	4 (8)	5 (10)	2 (4)	8 (16)	3.3 ^a

* Vitrification solution ; Acetamide(10, 20, 30%) was added to the new vitrification(20G10E) Control ; a mixture solution of 20% G + 10% E
 Values with different superscripts are significantly different
 (a-b, P<0.01; b-c, P<0.05)

2. 平衡時間과 sucrose 濃度の 効果

10, 20% sucrose를 본 연구에서 사용된 VS (20G10E)에 첨가한 凍結液에서 受精卵을 5,

10, 20분간 平衡시켜 融解후 生存率을 비교한 결과는 Table 2에 나타나 있다.

Table 2. Effect of sucrose concentration and equilibration time on the survival of the vitrified mouse morulae

Sucrose conc. (%)	Equilibration time(min)	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test(%) ⁺						Mean FDA score
			P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀	
10	5	25	8 (32)	8 (32)	2 (8)	3 (12)	3 (12)	1 (4)	3.5 ^a
	10	16	11 (69)	4 (25)	1 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.6 ^{bc}
	20	21	3 (14)	6 (29)	9 (43)	1 (5)	0 (0)	2 (10)	3.2 ^a
20	5	16	9 (56)	2 (13)	3 (19)	1 (6)	0 (0)	1 (6)	4.0 ^b
	10	23	14 (61)	3 (13)	5 (22)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	4.3 ^{bc}
	20	20	2 (10)	7 (33)	6 (29)	4 (19)	0 (0)	1 (5)	3.0 ^{ad}

Values with different superscripts are significantly different(^{a-b}, P<0.05; ^{a-c}, ^{d-e}, P<0.01)

受精卵의 生存率은 10% sucrose 첨가구에서 5분과 10분, 10분과 20분간의 平衡時間 사이에서 有意性이 있었으며(P<0.05), 가장 높은 생존율(92%)은 10% sucrose 첨가구의 10분간 平衡시간에서 얻어졌다. sucrose는 용해시 세포 내의 耐凍劑를 除去하는데 효과적이라고 보고된 바 있다(Leibo와 Mazur, 1987; Kasai 등., 1980; Szell과 Shelton, 1986a). Rall과 Fahy (1985)는 세포내부로 耐凍劑를 過多하게 透過하는 것은 불필요하며, 오히려 受精卵의 凍結

保存에 有害하다고 보고하였다. 이것은 平衡 시간을 길게할 필요가 없다는 것을 의미한다. 또한 생쥐 受精卵의 凍結時 10분간의 平衡時間에서 높은 생존율을 얻었으며 10%와 20% sucrose간에는 有意性이 없다고 보고된 바 있어 본 연구의 결과와 일치하였다(Rall과 Fahy, 1985; Miyamoto와 Ishibashi, 1989; Valdez 등., 1989). 그리고, Kasai 등(1990)은 40% ethylene glycol + 30% Ficoll + 20% sucrose 용액에서 생쥐 수정난을 동결했을 때 2분간의 평

衡時間에서 98%, 5분간의 평형시간에서 97%의 생존율을 얻었다고 보고하여 본 연구의 결과와 다르게 나타났다.

그 이유는 Kasai는 20% sucrose를 사용하였고, 본 연구에서는 10% sucrose를 사용한 데基因한 것으로 思料된다. 결과에서 알 수 있듯이 동결액의 농도에 관계없이 생쥐 수정란의 동결시 가장 효과적인 sucrose 농도와 평형시간은 각각 10%와 10분으로 나타났으며, 10분간의 평형시간에서 10%와 20% sucrose 처리구간에는 有意性이 없었다. 그러므로 본 실험

에서는 평형시간 10분에 sucrose는 10%로 결정하였다.

3. 20G10E에 添加한 Ficoll의 處理 效果

非透過性 耐凍劑인 Ficoll을 본 실험에 사용된 VS(20G10E)에 高分子 物質로서 세포외부를 보호하는 Ficoll을 10%, 20%, 30% 를 첨가하였다.

대조구(0% Ficoll)와 생존율을 비교한 결과는 Table 3과 4에 나타나 있다.

Table 3. Effect of Ficoll addition to the new vitrification solution(20G 10E) on the survial rate of the frozen - thawed mouse morula

Acetamide concentration(%)*	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos evaluated by FDA test(%)*						Mean FDA score
			P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀	
0	20	20	12 (60)	6 (30)	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.5
10	20	17	8 (47)	6 (35)	3 (18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.2
20	20	20	12 (60)	4 (20)	3 (15)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	4.4
30	20	19	14 (74)	3 (16)	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.6

Table 4. Effects of Ficoll concentration on the development rate of vitrified mouse morulae after 24hrs and 48hrs culture

Conc. of Ficoll*	No. of embryos rozen(%)	No. of embryos recovered(%)	No. of embryos developed to	
			LM-Early B (24hrs.%)	Expended B (48hrs.%)
0	31	24(77)	20(83)	12(50)
10	27	24(89)	19(79)	11(46)
20	65	57(88)	51(89)	41(72)
30	56	54(96)	50(93)	38(70)

* Ficoll 0,10,20,30% + Glycerol 20% + Ethylene glycol 10% + sucrose 10% in PBS

0, 10, 20, 30% Ficoll을 첨가한 용액에서凍結融解後 FDA-test로 생존율을 判定했을 때 생존율(Table 7)은 각각 4.5(90%), 4.2(84%), 4.4(88%), 4.6(92%)이 있으며 Ficoll 처리구 간에 유의성은 없었지만 P5(100% 생존)의 비율이 0% Ficoll에서 60%, 10% Ficoll에서 47%, 20% Ficoll에서 60% 보다 30% Ficoll에서 74%로서 더 높은 것으로 나타났기 때문에, 생쥐 morulae의 동결에 30% Ficoll이 효과적인 것으로 사료된다.

Table 4에서는 CO₂ incubator에서 24시간 培養했을 때 退化되지 않는 發育 受精卵은 Ficoll 0%, 10% 수준에서 각각 83%, 79%로 약간 낮았으나, Ficoll 20%(89%)와 30%에서는 93%의 생존으로 점차 향상되어 가장 높은 성적을 보여 주고 있으며, 이중 48시간까지 expanded blastocyst로 發育한 受精卵 비율(%)은 각각 60%, 57%, 80%, 76%로 약간 저조한 것은 처음 培養을 시도하였기 때문에 培養液 選別과 操作未熟 등으로 思料된다.

Table 3과 4를 종합적으로 볼 때 Ficoll添加水準중에서는 30% 첨가에서 FDA-score 4.6(92%) 그리고 24시간 培養時 93% 생존율을 나타내므로서 가장 合理的인 것으로 결정되었다. Ficoll은 Kasai등(1990)에 의해서 非透過性 物質로 사용되었는데 40% ethylene glycol + 20% sucrose에 30% Ficoll을 첨가하여 98%의 생존율을 얻었다고 보고한 것 보다는 약간 낮은 성적을 나타내었지만, Kasai등은 동결시 첨단장비에 의한 엄정한 수정란의 선별과정을 거쳤기 때문에 높은 생존율을 얻은 것으로 思料되며, Kasai 방법과 본 실험실의 동결방법과의 비교실험이 수행되어야 할 것으로 생각된다. 그의 Rall과 Fahy(1985)와 金 등(1988)의 報告보다는 超急速凍結로 볼때 상당히 양호한 성

적을 보여주었으며 보다 엄정한 mouse 受精卵을 선별 한다면 더욱 良好한 成績을 기대할 수 있다고 본다. Ficoll은 高分子 物質(分子量 70,000)로서 疏 化를 촉진시키는 非透過性 物質인 반면, sucrose는 低分子 物質(分子量 342)로서 내부세포의 水分이나, 融解시 내부세포에 透過되어 있던 凍結液을 脫水시키는 역할을 한다(Mazur, 1970; Kasai등., 1980, 1990). 이전의 vitrification 방법은 4°C에서 受精卵을 平衡하기전 100% VS의 毒性을 막기위하여 20°C에서 낮은 농도에서부터 높은 농도의 VS로 여러번 平衡시켜야만 하였다(Rall과 Fahy, 1985; Rall등., 1987). 반면에, 본 研究에서 결정된 새 VS(20G10E)에서 5-10분간 受精卵을 平衡시킨후 常溫(20°C)에서 液體窒素 container로 직접 凍結시킬 수 있었다.

IV. 摘 要

本 研究은 vitrification solution(20% glycerol + 10% ethylene glycol)내의 acetamide, 비투과성내동제(sucrose, Ficoll)의 添加水準과 平衡時間등이 超急速凍結시킨 mouse embryos의 生存率에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실행되었으며 要約된 結果는 다음과 같다.

1. 20G10E 용액에 acetamide 10, 15, 20%를 添加하였을 때, FDA-score는 각각 4.4(대조구), 4.3(10%), 3.6(15, 20%)으로서 生存率에 영향을 주지 못하였다 ($P < 0.05$).

2. 20G10E 용액에 10% sucrose를 첨가하여 平衡時間을 조사한 결과 5분(3.5)과 10분(4.6), 10분(4.6)과 20분(3.2)간에는 有意性($P < 0.05$)이 있었다. 20G10E 용액에 20% sucrose를 첨가하였을 때 5분(4.0)과 10분(4.3)간에는 有意性이 없었으나, 5분(4.0)과 20분(3.2), 10분(4.3)과 20분(3.2)간에서 有意性($P < 0.05$)이 있었

다.

3. 20G10E 용액에 Ficoll(0, 10, 20, 30%)을 첨가한 vitrification solution으로 超急速凍結한 mouse morulae의 FDA-score(생존율)는 각각 4.5(90%), 4.2(84%), 4.4(88%), 4.6(92%)이었으며 添加水準에 관계없이 대조구와 유의차가 없었으나, 24시간 培養했을 때의 發達率은 20% Ficoll(89%)과 30% Ficoll(93%)처리구에서 有意性 있게 높았다($P < 0.05$).

V. 引用 文 獻

1. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J.Reprod. Fert.*, 59: 51 -56.
2. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1982. Survival of rat embryos after freezing. *J. Repord. Fert.*, 66:367 -370.
3. Kasai, M., J.H. Komi, A. Takakamo, H. Tsudera, T. Sakurai and T. Machida, 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.*, 89:91 -97
4. Kim, H.S., B.S. Yang, S.J. Oh and K.S. Lee, 1990. Factors affecting the survival of rabbit embryos cryopreserved by vitrification. *Korean J. Anim.Repord.* 14(1):43-49.
5. Fahy, G.H., D.R. MacFarlane, C.A. Angell, H.T. Meryman, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21:407-426.
6. Leibo, S.P., P. Mazur and S.C. Jackowski, 1984. Factors affection survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exptl. Cell Res.*, 89:79-88.
7. Mazur, P., S.P. Leibo and E.H.Y. Chu, 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exptl Cell Res.*, 71:345-355.
8. Miyamoto, M. and T. Ishibashi, 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:471-478.
9. Miyamoto, H., Y. Miyamoto and T. Ishibashi, 1989. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Japan.J. Zootech.*, 57:250-256.
10. Nguyen, B.X., N.Y. Heyman and J.P. Renard, 1984. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. *Theriogenology*, 22:389-400.
11. Rall, W.F. and G.M. Fahy, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification. *Nature Vol.* 313:573-575.
12. 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.
13. Renard, J.P., B.X. Nguyent and V. Garnier, 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J.Reprod. Fert.*, 71:573-580.
14. Széll, A. and J.N. Shelton, 1986a. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76:401 - 408.
15. Széll, A. and J.N. Shelton, 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
16. Széll, A. and J. N. Shelton, 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions Day-3 mouse embryos. *J. Repord. Fert.*,

80:309-316.

17. Valdez, C.A., O. Abas Kazni, Y. Takahashi, M. Hishinuma and H. Kanakawa, 1989. Effects of equilibration time, precooling and de-

velopmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 68(6): 627-636.