

## 생쥐 胚의 試驗管内 凝集과 培養

李 相 鎭 · 鄭 吉 生

建國大學校 畜産大學

### In Vitro Aggregation and Culture of Mouse Embryos

Sang Jin Lee and Kil Saeng Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

#### Summary

These experiments were carried out to obtain basic information necessary for in vitro culture of aggregated mouse embryos. Inbred ICR mice were used to obtain embryos. The zona pellucida was removed by placing the embryos in Whittingham's medium containing 0.5% protease for about 5-10 minutes at 37°C. Total 263 pairs of 2-, 4- and 8-cell zona free mouse embryos were subjected to aggregation by physical pressure and cultured in Whittingham's medium under the gas phase of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C for 24 to 60 hours. The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. Time needed for fusion of 2-, 4- and 8-cell embryos were 0-3, 0-3 and 0-3 hours, respectively and average time needed for in vitro development of 2-, 4- and 8-cell embryos after aggregation to morula and blastocyst were 42, 30 and 13.5 hours, and 51, 39 and 27 hours, respectively.
2. Of total 263 pairs of naked embryos, 227 were firmly aggregated together and the rates of aggregation in 2-, 4- and 8-cell embryos were 71.8, 88.3 and 97.0%, respectively.
3. The rates of aggregated pairs which obtained from 2-, 4- and 8-cell embryos developed to morula were 96.7, 95.6 and 96.9%, respectively, and embryos developed to blastocysts were 88.5, 89.7 and 90.8%, respectively.
4. Conspicuous differences in size of volume and inner cell masses between single and double blastocysts were observed. Although a single blastocolic cavity was formed in most double blastocysts, several formed two distinct cavities from the very beginning.

#### I. 緒 論

受精卵의 凝集에 의한 chimera 生産의 意義는 遺傳的으로 相異한 2個以上의 個體에서 有來한 組織, 細胞, 核, 染色体 혹은 遺傳子等을 함유한 復合個體를 生産하므로써 生命現象에 대한 基礎知識을 넓힘과 아울러 畜産發展에 기여할 수 있는 새로운 技術을 開發하는데 있다.

chimera胚의 生産에 관해서는 1940年 以來, 많은 研究가 遂行되어 왔으며, 그 결과 實驗動物에서 는 個體生産에 성공하였고 이러한 經驗을 基礎로 하여 中小家畜 및 大家畜에 있어서도 chimera 動物의 生産에 관한 研究가 활발하게 進行되고 있다. 즉 Nicholas와 Hall (1942)은 흰쥐에 있어서 1細胞期

胚를 試驗管内에서 凝集시켜, 그 凝集胚의 發生을 調查 研究하였으며, Tarkowski(1961)와 Mintz(1962)는 생쥐의 8細胞期 胚를 凝集시켜, 最初의 chimera 생쥐를 分娩시키는 데에 성공했다.

그 후 chimera 生産技術에 Micromanipulator가 導入되므로써, 이 分野의 研究는 새로운 局面을 맞이하게 되었다. 즉 同 器具를 이용하여 8細胞胚, 桑實胚 또는 胚盤胞에 內陪細胞塊를 注入하여 보다 안전하고 효율적으로 chimera 胚를 生産할 수 있게 되었다. 이러한 방법에 의하여 Mystkowska와 Tarkowski(1968), Lin(1969), McLaren과 Bowman(1969), Gardner와 Lyon(1971, 1972), Wilson과 Bolton 및 Cuttler(1972), Mintz 등 (1973), Zeilmaker(1973), Mystkowska(1975), Papaianou 등 (19

75), Rossant (1975 a, b), Graham과 Deussen (1978), Willadsen (1979, 1980), Siedel (1982), Magnuson과 Smith (1982) 등이 각기 Chimera 胚의 생산에 성공하였다.

凝集胚의 크기를 調節하는 機轉이나 發達時間 및 着床後의 發生등에 관한 연구도 활발하게 이루어지고 있다 (Lewis와 Rossant; 1982, Ziomek과 Johnson; 1982).

그러나 國內의 경우, 受精卵을 凝集시켜 Chimera 胚를 生産한 報告는 全無한 狀態이며, 盧와 鄭 (1983) 이 생쥐胚의 分割球를 培養하는데에 성공했다는 報告가 있을 뿐이다.

이에, 本 研究에서는 Chimera 胚 生産에 必要한 基礎知識을 얻기 爲의 目的으로 發生初期의 생쥐胚를 試驗管内에서 凝集, 培養시켜 다소의 성적을 얻었으므로 이에 그 결과를 報告하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 期間 및 場所

本 研究은 1983年 7月부터 1984年 7月까지 建國 大學校 畜産大學 家畜 繁殖學 研究室에서 수행되었다.

### 2. 材 料

#### 1) 供試動物

Inbred I C R 系統의 생쥐를 試驗動物로 供試하였는데 이들의 연령은 3~5 주령, 체중은 13~20 g이었다.

#### 2) 培養液

採卵과 凝集胚의 培養에는 Whittingham (1971) 의 培養液을 供試하였다. 이 培養液의 pH는 7.2~7.4 滲透壓은 270~280 mosm로 調整하였으며, 使用前에 0.2 $\mu$ m의 Millipore Filter (German Science, Inc. U. S. A) 를 使用하여 濾過시킴으로써 細菌을 除去하였다.

### 3. 方 法

#### 1) 多排卵 誘起

午後 4時에 首當 5IU의 PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin; Follicon, Intervet, Holland) 를 1回 復腔에 注射하였으며, 45~48時間後에, 同一한 方法으로, 5IU의 HCG (Human Chorionic Gonadotropin; Choculan, Intervet, Holland) 를 注射하였다. HCG 注射後 12~15時間째에 雌性 생쥐를 1:1의 比率로 合券시켜 授精을 誘導하였다.

日照時間은 14時間으로 調節하였으며 合券한 翌日 아침 腔全의 有無를 確認하여 腔全이 없는 個體

는 採卵對象에서 除外시켰다.

#### 2) 受精卵의 回收

腔全發見 當日을 第一日로 하여 受精卵이 適節한 發達段階 (2細胞期; 1½日, 4細胞期; 2日, 8細胞期; 2½日) 에 도달했을 때에 생쥐를 屠殺하여, 外科的으로 卵管과 子宮을 剔出한 後, 實體顯微鏡 (Koyowa optal Co, Japan) 下에서 前述한 培養液으로 灌流하였다. 이 때에 Microneedle을 附着한 1ml의 注射器를 使用하였다.

#### 3) 透明帶의 除去

採取된 受精卵中 形態의 正當인 것 만을 골라 0.5% Protease (Streptomyces Geseus, Sigma, U. S. A) 를 함유한 培養液에 5~10分間 露出시킨 後, 實體顯微鏡下에서 觀察하면서 透明帶가 軟化되었을 때에, 다른 新鮮한 培養液으로 옮김으로써 3回 反復하여 洗滌하였다. 이때, 透明帶를 完全히 除去하지 않은 理由는 割球에 대한 酵素의 直接的인 영향으로 인한 損傷을 피하기 위함이었다. 完全히 제거되지 않은 透明帶는 洗滌時 Pipetting 操作을 약간 強하게 하거나, 직경 5 $\mu$ m 以下の 微細한 硝子棒으로 殘存 透明帶를 압박함으로써 物理的으로 除去하였다.

#### 4) 裸化胚의 凝集

實體顯微鏡下에서 직경이 100 $\mu$ m 以下の 微細한 硝子棒을 이용하여 裸化된 胚를 접근시켜 물리적 압박을 가함으로써 接觸시켰으며, 그후 3時間동안 培養한 다음, 凝集狀態를 觀察하여 凝集이 제대로 되지 않은 것은 다시 동일한 방법으로 재차 接觸시켰다. 受精卵의 回收로부터 培養에 이르기까지의 모든 操作은 37°C에서 實施하였다.

#### 5) 凝集胚의 培養

組織培養液 petridish (falcon plastics, #1006, U. S. A) 에 3~7 ml의 液本 Paraffin (比重; 0.855) 을 넣은 다음, 하나의 petri dish에 5~10ul의 培養液 小滴 8個를 만들어 Petri dish 低面에 附着시켰다. 또, 이 培養液을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 空氣條件의 培養器에 넣어 4時間 동안 平衡을 實施하였다. 이어 培養液 小滴當, 凝集이 완료된 凝集胚를 하나씩 넣어 前述한 條件과 同一한 條件을 갖춘 CO<sub>2</sub> 培養器內에서 24~60時間 동안 培養하면서 凝集胚의 發達狀態를 觀察하였다.

#### 6) 調查項目

培養中 적절한 시기를 택하여 400倍로 擴大한 位相差顯微鏡 (Ernst Leitz Co, W-Germany) 下에서 凝集胚의 發達狀態를 觀察하면서 다음 事項을 調查하였다.

##### (1) 凝集胚의 發達速度

凝集된 胚가 發達の 各段階에 도달하는데에 要하는 時間을 計算하였다.

2) 凝集狀態

接觸後, 培養 3 時間까지의 凝集狀態를 觀察하여 凝集되지 않은 胚는 재차 接觸시켰다.

(3) 退化胚

재차 接觸을 시켜도 凝集이 일어나지 않은 胚와 凝集된 후, 桑實胚까지 發達하지 않은 胚는 退化胚에 포함시켰다.

(4) 桑實胚

凝集된 胚가 培養에 의하여 Ameba 狀으로 발달할 때에는 그 胚를 桑實胚로 분류하였다.

(5) 胚盤胞

內陪細胞塊가 많은 榮養細胞에 의하여 둘러싸여 있고 胞胚腔이 완전히 형성된 胚는 胚盤胞로 분류하였다.

(6) 胚盤胞의 發達狀態

凝集된 胚의 크기와 發達狀態등을 位相差顯微鏡下에서 觀察하면서 凝集시키지 않은 胚의 것과 비교, 검토하였다.

III. 結果 및 考察

本 試驗에서 얻어진 結果는 다음과 같았다.

1. 胚의 凝集과 發達速度

凝集에 供試된 2-, 4-, 및 8-細胞期 胚를 物理적으로 接觸시킨後, 凝集이 완성되기 까지에 所要된 時間과, 凝集後 培養過程에 있어서의 發達速度는 Table 1에서 보는 바와 같았다.

Table 1. Time needed for embryos fusion and development speed of aggregated embryos.

Embryos stage of subjected to aggregation	Developed speed		
	Time needed for fusion (hr)	From fusion to morula (hr)	From fusion to blastocyst (hr)
2-cell embryos	0 - 3	36 - 48 (42)	42 - 60 (51)
4-cell embryos	0 - 3	24 - 36 (30)	30 - 48 (39)
8-cell embryos	0 - 3	9 - 18 (13.5)	21 - 33 (27)

이 표에 의하여 알 수 있는 바와 같이 2-, 4- 및 8-細胞期胚를 物理적으로 接觸시켰을 때 凝集이 완료되는데 요하는 시간은 0~3시간으로, 이 시간은 凝集에 供試된 胚의 發達段階에 의하여 영향을 받지 않았다.

한편, 2-, 4- 및 8-細胞期 胚를 凝集시켰을 때, 이들이 凝集이 완료된 시점으로 부터 桑實胚에 이르기 까지에 소요되는 시간은 各各 平均 42, 30 및 13.5시간이었고, 胚盤胞로 발달하는데에 소요된 시간은 各各 平均 51, 39 및 27시간으로, 발달이 진행된 胚를 凝集시켰을 때의 발달속도가 빨랐다. 이러한 결과는 Ziomek 등(1982)의 연구결과와 대체로 一致하는 것이었다.

2. 胚의 發達段階別 凝集率

凝集에 供試된 胚의 發達段階別 凝集率은 Table 2에서 보는 바와 같았다.

Table 2에서 보는 바와 같이 凝集에 供試된 總 263쌍의 胚中 227쌍에서 順調로운 凝集이 일어났는데, 그중 2-, 4- 및 8-細胞期 胚의 凝集率은 各各 71.8, 88.3 및 97.0%로써 平均은 86.3%였다. 또 凝集에 公용된 胚의 發達段階別 凝集率은 8細胞期의 그것이 97.0%로써 가장 높았으며 4- 및 2-細胞期 胚의 順으로 낮아졌다. 그러나 2- 및 4-細胞期 胚의 凝集率도 8細胞期 胚의 그것보다는

Table 2. Aggregation rates of 2-, 4- and 8-cell embryos.

Stage of embryos subjected to aggregation	No. of pairs subjected to aggregation	No. of bairs aggregated	Aggregation rates	No. of embryos degenerated (%)
2-cell embryos	85	61	71.	24(28.2)
4-cell embryos	77	68	88.3	9(11.7)
8-cell embryos	101	98	97.0	3(3)
Total or mean	263	227	86.3	36(13.7)

낮았으나 各各 71.8%, 88.3%로써 대체로 良好한 凝集성적을 보였다. 이러한 結果는 2-내지 4-細胞期 胚보다는 8細胞期 胚에서 凝集이 가장 잘 일어난다고 한 Gardner(1971)의 報告와 一致하는 것이었으며 8-細胞期 胚의 凝集에서 얻은 성적은 Mintz(1971, 1973)의 그것과 대체로 일치하는 것이었다. 그리고 發達段階가 서로 相異한 胚를 凝集시켰을 때와 8細胞期 以後의 胚를 凝集시켰을 때의 凝集成績에 관한 여러 報告들(Stern과 Wilson; 1972, Rossant; 1975, Tarkowski와 Wojewodzka; 1982)과 本 試驗의 성적을 比較하여 볼 때, 어떠한 報告 성적보다도 8細胞期 胚를 凝集시킨 本 연구의 성적이 우수한 점으로 보아 두개의 胚를 응집시켜 chimera 胚를 만들 때에는 8細胞期에 있는 胚를 供試하는 것이 좋다는 것을 알 수 있다.

8細胞期 보다, 4- 및 2-細胞期 胚의 凝集率이나 그후의 발달성적이 나쁜 이유는 분명하지 않으나 8細胞期 胚 보다는 4細胞期 胚의, 4細胞期 胚 보다는 2細胞期 胚의 分割球가 크기 때문에 相互 接觸되는 表面積의 比率이 낮고 그만큼 凝集率도 떨어지는 것으로 생각된다. 게다가 凝集이 잘 되지 않으면 자연히 操作上 무리가 가해지기 때문에, 그것이 원인이 되어 응집이 이루어진 다음에 있어서의 발달상태도 나쁜 것으로 추측된다. 또 Mintz(1971)나 Goodall와 Johnson(1982)가 지적한 바와 같이 胚의 粘着性과 運動性 그리고 割球사이의 電氣의 性質이 2-, 4-, 및 8-細胞期로 발달할수록 強해지는 것도, 本 시험에서 나타난 결과를 초래한 중요한 원인이 되었을 것은 의심할 여지가 없다.

### 3. 凝集胚의 培養成績

凝集이 완성된 胚를 in vitro에서 배양하였을 때의 培養成績과 發達狀態는 Table 3 과 Fig. 1에서 보

는 바와 같았다.

표 3에서 보는 바와 같이, 凝集된 2-, 4-, 및 8-細胞期 胚가 桑實胚로 發達한 比率은 各各 96.7, 95.6 및 96.9%로써 平均 96.5%였으며 胚盤胞까지 發達한 比率은 各各 88.5, 89.7 및 90.8%였으며, 平均 89.9%로써, 일단 凝集된 胚가 桑實胚나 胚盤胞까지 발달하는 성적은 응집에 公용된 胚의 발달단계에 의하여 유의한 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 일단 응집이 완성된 胚는 대부분이 桑實胚까지 發達했다는 Mintz등(1973)의 報告와 一致하는 것이었다. 그러나 표 3에 의하여 알 수 있는 바와 같이 桑實胚까지 발달된 胚도 胚盤胞로 移行하는 과정에서 상당수가 발달이 중지되었는데 그것은 割球가 凝集操作時 약간의 損傷을 입었거나, 透明帶 除去時 Protease에 의한 침해를 받았기 때문 일 것으로 생각된다. 그러나 이점에 관해서는 좀더 구체적인 檢討가 있어야 할 것이다.

凝集胚의 發達過程中 胚盤胞 初期에 胞胚腔이 두 개 형성되는 것도 상당수 있었는데 그것은 응집된 胚 相互間의 細胞配列上의 差異에 基因하는 것으로 思料된다. 또 胚盤胞의 크기도 하나의 胚가 발달한 胚盤胞의 그것과는 뚜렷한 차이가 있었으며 이러한 차이는 胚盤胞의 內陪細胞塊와 榮養細胞의 크기나 數에 있어서도 뚜렷하게 관찰되었다. 凝集胚의 발달과정에서 관찰된 如斯한 結果들은 Mintz등(1973)의 研究 報告와 잘 一致하는 것이었다.

本 試驗의 凝集胚의 發達成績은 內部細胞塊와 桑實胚를 凝集시켜 얻은 Rossant(1975)의 성적과는 一致하는 것이었으나, 本 研究와 유사한 방법에 의하여 얻은 Bowman과 McLaren(1970)의 81.3%나 Stern과 Wilson(1972)의 82.0% 보다는 양호한 것이었다. 또 本 시험에서 얻은 성적은 Fritz와 Mayer(1974)가 8細胞期の 흰쥐胚와 생쥐胚를 凝集시

Table 3. Development of 2-, 4- and 8-cell mouse embryos cultured after aggregation.

Stage of embryos subjected to aggregation	No. of embryos aggregated	Development stage (%)		No. of embryos degenerated (%)
		Morula	Blastocyst	
2-cell embryos	61	59 (96.7)	54 (88.5)	7 (11.5)
4-cell embryos	68	65 (95.6)	61 (89.7)	7 (10.3)
8-cell embryos	98	95 (96.9)	89 (90.8)	9 (9.2)
Total or mean	227	219 (96.5)	204 (89.9)	23 (10.1)

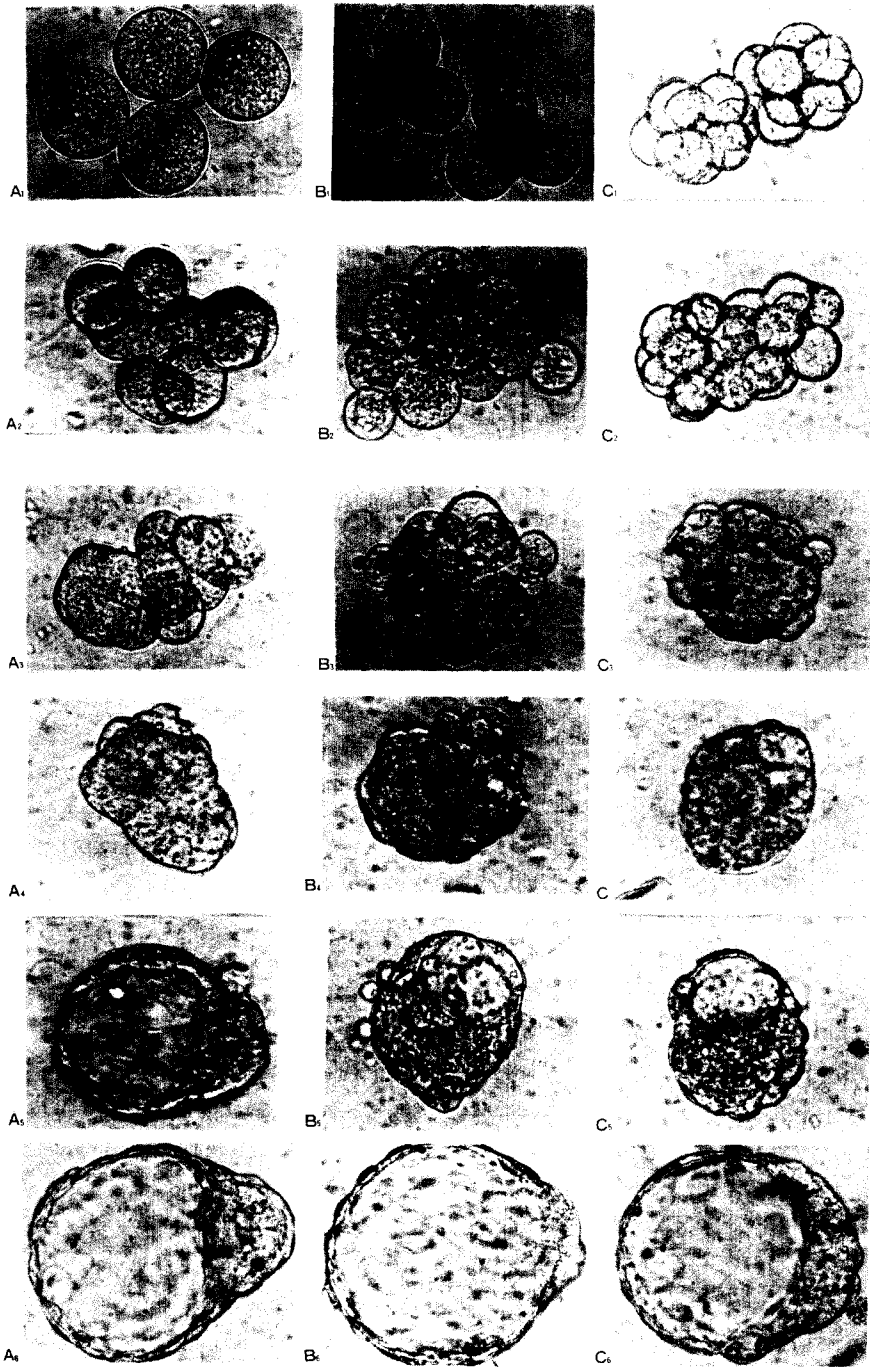


Fig. 1. In vitro aggregation and development of mouse embryos aggregated at different developmental stages.

A<sub>1-6</sub>. Aggregation and development of 2-cell embryos (X400).

B<sub>1-6</sub>. Aggregation and development of 4-cell embryos (X400).

C<sub>1-6</sub>. Aggregation and development of 8-cell embryos (X400).

켜 얻은 45.0%의 발달율보다는 약 2배나 되는 양호한 것이었는데 이러한 차이는 Chimera 胚를 생산함에 있어서 異種胚를 凝集시켰을 때에는 同種胚를 凝集시켰을 때 보다 同一한 條件下에 있어서도, 胚發達이 순조롭지 못하다는 것을 시사하는 것으로 解析된다.

以上, 本 試驗에서 얻은 結果를 綜合하여 考察할 때 2細胞期나 4細胞期 胚보다도 8細胞期 胚를 供試하는 편이 높은 凝集率을 얻을 수 있으며 일단 凝集이 이루어진 胚가 in vitro에서 발달하는 成績은 供試된 胚의 발달 단계에 의하여 영향을 받지 않았으나, 異種胚를 凝集시켰을 때에는 일단 凝集된 胚도 발달과정에서 대부분이 退行한다는 것을 알 수 있다.

## VI. 摘要

本 研究는 일정한 발달단계에 있는 생쥐胚를 凝集시켜 Chimera 胚를 생산하는데에 필요한 基礎知識을 얻기 위하여 實施했다.

PMSG와 HCG를 투여하여 多排卵을 誘起한 ICR系의 생쥐에서 採取한 2-, 4- 및 8-細胞期の 胚를 0.5% Protease 溶液에 노출시켜 透明帶를 제거함으로써 裸化시켰으며, 이렇게 하여 얻은 裸化胚를 37°C에서 物理的인 壓力을 가하여 상호 접촉시킨 다음, 凝集이 완성된 凝集胚를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Air의 培養器 條件下에서 24~60時間 培養하면서, Chimera 胚의 發達狀態를 調査하였다. 이때 培養液은 Whittingham (1971)의 常法에 準하여 除菌한 것이었다.

本 試驗에서 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같았다.

1. 裸化胚가 凝集되어 胚盤胞까지 發達하는데 소요되는 時間은 2-, 4- 및 8-細胞期の 경우 各各 平均 51, 39 및 27時間이었다.

2. 凝集에 供試된 總 263雙의 裸化胚中 2-, 4 및 8細胞期 胚의 凝集率은 각각 71.8, 88.3 및 97.0%였다.

3. 凝集이 완성된 總 227雙의 凝集胚中 桑實胚까지 발달한 胚의 培養은 2細胞期 凝集胚는 96.7%, 4細胞期 凝集胚는 95.6%, 8細胞期 凝集胚는 95.6%로서 凝集에 供試된 胚의 발달단계에 의하여

영향을 받지 않았다.

4. 凝集이 완성된 227雙의 凝集胚中 胚盤胞까지 발달한 것의 比率은, 2-, 4-, 및 8細胞凝集胚의 경우, 각각 88.5, 89.7 및 90.8%로써, 凝集에 供試된 胚의 發達段階에 의하여 영향을 받지 않았다. 그러나 凝集胚中 桑實胚로 발달한 胚의 平均은 96.5%인데 비하여 胚盤胞로 발달한 胚의 그것은 89.9%로써 양자간에는 差異가 있었다.

5. 形態學的 측면에서 볼 때 凝集胚가 발달하는 과정에서 胚盤胞初期에 2個의 胞胚腔이 形成되는 것이 상당수 있었으며 胚盤胞로 發達한 凝集胚의 크기는 無處理 胚의 胚盤胞보다 훨씬 컸었다. 또 凝集胚의 内部細胞塊와 榮養細胞의 數도 無處理 胚의 그것보다 훨씬 많았다.

## REFERENCE

1. Bowman, P. and A. McLaren. 1970. Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 23,3: 693-704.
2. Gardner, R.L. and M.F. Lyon. 1971. X-chromosome inactivation studied by injection of a single cell into the mouse blastocyst. *Nature.*, 231: 385-386.
3. Gardner, R.L. 1972. An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from the mouse blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 28, 2: 279-312.
4. Gardner, R.L. 1978. Methods in mammalian reproduction. (J.C. Daniel, Jr. ed.) 137-165.
5. Goodall, H. and M.H. Johnson. 1982. Use of carboxyfluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres. *Nature.*, 295: 524-526.
6. Graham, C.F. and Z.A. Deussen. 1978. Features of cell lineage in preimplantation mouse development. *J. Embryol. Exp. Morph.* 48: 53-72.
7. Lewis, N.E. and J. Rossant. 1982. Mechanism of size regulation in mouse embryo aggregates. *J. Embryol. Exp. Morph.* 72: 169-181.
8. Lin, T.P. 1969. Microsurgery of inner cell mass of mouse blastocysts. *Nature.*, 222: 480-481.

9. Magnuson, T., S. Smith. and C.T. Epstein. 1982. The development of monosomy 19 mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 69: 223-236.
10. Mayer, J.F. and Jr. H.I. Fritz. 1974. The culture of preimplantation rat embryos and the production of Allophenic Rats. *J. Reprod. Fert.* 39: 1-9.
11. McLaren, A. and P. Bowman. 1969. Mouse chimeras derived from fusion of embryos differing by nine genetic factors, *Nature.* 224: 238-240.
12. Mintz, B. 1962a. Experimental study of the developing mammalian egg: Removal of the zona pellucida. *Science.* 138: 594-595.
13. Mintz, B. 1971. in *Methods in mammalian Embryology.* (J.C. Daniel, Jr. ed) 186-214. Freeman, San Francisco, California.
14. Mintz, B., J.D. Gearhart. and A.O. Guymont. 1973. Phytohemagglutinin-mediated blastomere aggregation and development of Allophenic Mice. *Developmental Biology.* 31: 195-199.
15. Mystkowska, E.T. and A.K. Tarkowski. 1968. Observations on CBA-P/CBA-T<sub>6</sub>T<sub>6</sub> mouse chimeras, *J. Embryol. Exp. Morph.* 20,1: 33-52.
16. Mystkowska, E.T. 1975. Development of mouse-bank vole interspecific chimeric embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 33,3: 731-744.
17. Papiannou, V.E., M.W. McBurney. and R. L. Gardner. 1975. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature.* 258: 70-73.
18. Rossant, J. 1975. Investigation of the determinative state of the mouse inner cell masses.: 1. Aggregation of isolated inner cell masses with morulae. *J. Embryol. Exp. Morph.* 33,4: 979-990.
19. Siedel, G.E. January 1982. Applications of micro-surgery to mammalian ambryos. *Theriogenology.* 17: 23-33.
20. Stern, M.S. and I.B. Wilson. 1972. Experimental studies on the organization of the preimplantation mouse embryo.: 1. Fusion of asynchronously cleaving eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* 28,2: 247-254.
21. Tarkowski, A.K. 1961. Mouse chimeras developed from fused eggs. *Nature.* 190: 857-860.
22. Tarkowski, A.K. and M. Wojewodzka. 1982. A method for obtaining chimaeric mouse blastocysts with two separate inner cell masses.: A preliminary report. *J. Embryol. Exp. Morph.* 71: 215-221.
23. Whittingham, D.G. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert.* 14: 7-21.
24. Willadsen, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature.* 227: 298-300.
25. Willadsen, S.M. 1980. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *J. Reprod. Fert.* 59: 357-362.
26. Wilson, I.B., E. Bolton. and R.H. Cuttler. 1972. Preimplantation differentiation in the mouse egg as revealed by microinjection of vital markers. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27, 2: 467-479.
27. Zeilmaker, G.H. 1973. Fusion of rat and mouse morulae and formation of chimae-lic blastocysts. *Nature.* 242: 115-116.
28. Ziomek, C.A., M.H. Johnson. and A.H. Handyside. 1982. The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres. *J. Exp. Zool.* 221: 345-355.
29. 盧煥喆, 鄭吉生. 생쥐胚 分割球의 試驗管内 培養. 韓國家畜 繁殖研究會報 7(1): 24~29, 1983.