

## 세포외 기질 단백질이 생쥐 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향

곽대오 · 김선구\* · 김영수 · 박충생\*\*  
경상대학교 생물교육과

### Effect of Extracellular Matrix Proteins on the *In Vitro* Development of Parthenogenetic Mouse Eggs

D.O. Kwack, S.K. Kim\*, Y.S. Kim and C.S. Park\*\*  
*Department of Biology Education, Gyeongsang National University*

#### SUMMARY

To investigate the effect of extracellular matrix proteins on the *in vitro* development of ethanol-induced parthenogenetic eggs of ICR strain mice, those were cultured *in vitro* in fibronectin, gelatin, or collagen precoated culture dishes containing 1.5 ml of NaHCO<sub>3</sub>-BMOC-3 medium at 37°C for 96 hrs. under the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

Fibronectin, gelatin, or collagen significantly(P<0.01) increased morula and blastocyst formation rate compared with controls in haploid (42.2, 36.8, and 38.0% vs. 4.5%), diploid (48.3, 40.9, and 43.5 vs. 4.0%), and immediately cleavaged eggs (47.1, 43.8, and 40.0% vs. 3.8%).

Both the nuclear number and diameter of blastocysts developed from parthenogenetic eggs were not affected by the morphological types when they were cultured *in vitro*, or the kind of extracellular proteins. The nuclear number of blastocysts developed from haploid, diploid, and immediately cleavaged eggs was 45.4±1.4, 45.4±1.4, and 44.8±0.9, respectively. And the diameter of those eggs ranged 104.6±1.9, 102.8±2.3, and 103.4±0.8 μm, respectively.

#### 서론

Pincus(1936)가 토끼의 난자에서 단위 발생을 유기한 이래 이 분야에 관하여 많은 연구가 이루어져왔다. 단위발생이란 융성 배우자의 어떠한 관여도 없이 자성 배우자가 단독으로 배를 생식시키는 과정을 말한다(Kaufman, 1979). 단위생식을 유기하는데는 물리적 자극법(Uehara와 Yanagimachi,

1977), 효소 처리법(Marcus, 1990), 단백질 합성억제제 첨가법(Siracus 등, 1978), 전기자극법(Tarkowski 등, 1970; Onodera와 Tsunoda, 1989) 및 ethanol 처리법(Kaufman, 1982; Cuthbertson, 1983; Barton 등, 1985)등이 이용되는데 이러한 방법들에 의해 난자가 활성화되는 기전으로는 난자 세포내의 pH변화(Johnson 등, 1976), 세포 골격계의 붕괴(Nicolson, 1976) 및 세포막의 전기적 특성 변화(Seeman 등, 1974) 등으로 알려져 있다. 이중

\* 밀양산업대학교 축산학과(Department of Animal Science, Miryang National University of Industry)  
\*\* 경상대학교 축산학과(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

ethanol 처리법은 7% 내외의 ethanol로써 5분 정도 난자를 처리하여 단위발생을 유기하는 방법인데 Dyban과 Kozhai(1980)에 의해 체계화되었다. 그 후 Kaufman(1981)은 hCG 주사 후 17시간째 채취한 난자를 ethanol로써 처리한 결과 대다수의 난자는 제 2극체를 방출한 후 1개의 전핵을 가진 반수체 형태로 활성화되었다고 하였으며, Cuthbertson(1983)은 C<sub>57</sub>BL/6×CBA, C<sub>57</sub>BL/6×A2G, CBA×A2G 제 1세대 교잡종 생쥐 난자를 체외에서 0.24~0.4% benzyl alcohol 또는 4.5~8.6% ethanol에 5~10분간 처리하여 단위발생을 유기하였으며 배양액에 cytochalasin B를 첨가하여 난자로 부터 제 2극체의 방출을 억제시킨 후 단위발생란을 체외배양하여 85% 정도를 상실기와 배반포기까지 발달시켰다고 보고하였다. 또한 Gulyas와 Yuan(1985)은 생쥐난자를 8% ethanol로써 3~4분간 처리하였을 때 난자의 활성화율은 91%로서 5~6분간 처리하였을 때의 84%에 비해 높았다고 하였는데, ethanol이 생쥐난자를 활성화시키는 기전은 명확하지 않으나 Steinhardt 등(1974)과 Cuthbertson 등(1981)에 의하면 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 일시적 급증에 의하여 난자가 활성화 된다고 하였다.

그러나 지금까지의 연구는 주로 단위발생의 유기 방법에 관한 것들이 주류를 이루고 있으며 체외발달 증진에 대한 연구는 제한적으로 이루어져 왔다.

따라서 단위발생 유기 후 염색체 이상 분석, chimera작제, 핵치환, 유전자 조절 등 세포유전학, 발생학 및 신종 동물 생산 연구에 폭넓게 응용될 수 있는 단위 발생란의 이용성을 넓히기 위해서는 무엇보다도 체외배양을 통한 단위 발생란의 발달 증진에 관한 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 배 분화과정에서 다양한 생리적 기능을 나타내는 것으로 알려진 fibronectin 등의 세포외 기질 단백질이 생쥐 단위 발생란의 체외발달에 미치는 영향을 밝힘으로써 체외발달의 증진에 관한 방법을 확립하고 대동물에 응용할 수 있는 기초를 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

ICR 계통의 생쥐 4~6주령의 암컷을 본 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 실내온도를 20~23℃로 유지하였으며, 조명은 1일 14시간(08:00~22:00)으로 조절하였고, 물과 사료(실험동물용 사료, 삼양유지)는 자유로이 급식시켰다.

### 2. 배양액

0.5%의 BSA(Sigma, U.S.A.)가 함유된 Brinster medium(BMOC-3)을 기본 배양액으로 하여 단위 발생란의 조작용 배양액으로는 NaHCO<sub>3</sub>가 포함되어 있지 않는 대신 기본 배양액에 5.95 mg/ml의 Hepes(N-2-hydroxyl ethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid; Sigma, U.S.A.)가 첨가된 것을, 그리고 체외배양용 배양액으로는 기본 배양액에 2.11 mg/ml의 NaHCO<sub>3</sub>가 함유된 것을 사용하였다.

모든 배양액은 제조시 0.2 μM millipore filter로써 제공한 다음 4℃의 냉장고에 보관하면서 1주일 내에 사용하였는데 사용시 다시 millipore filter로써 제공하였다.

### 3. 단위발생란의 유기 및 단위 발생란의 형태학적 분류

#### (1) 과배란의 유기 및 채란

생쥐에 PMSG(Peamax, Japan) 5 IU를 주사하고 48~50시간 후에 hCG(Sigma, U.S.A.) 5 IU를 동일한 방법으로 주사하여 과배란을 유기하였다.

난자의 채취는 hCG투여 20~22시간 후에 경추탈구법으로 실험동물을 도살한 다음 난관을 적출하여 D-PBS에 ethanol을 혼합한 7% ethanol 용액에 담긴 다음 실체현미경 하에서 난관 팽대부를 21 gauge 주사바늘로 천자하여 채란하였다.

#### (2) 단위발생의 유기

Ethanol 처리에 의한 단위발생의 유기는 Kaufman(1973)의 방법을 변용하여 실시하였다. 즉 7% ethanol 용액에서 채란을 실시함과 동시에 5분간 처리한 다음 5.59 mg/ml의 Hepes가 첨가된 BMOC-3 소적에 5~6회 세척하고 100 IU의 hyaluronidase가 용해되어 있는 D-PBS에 2~3분간 노출

하여 난구세포를 제거한 다음 다시 Hepes-BMOC-3 소적에 5~6회 세척하였다. 이어서 직경 35 mm의 배양접시에 배양액을 미리 만들어 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기조건과 37°C에서 2시간 동안 평형시킨 NaHCO<sub>3</sub>-BMOC-3 소적에 옮긴 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기조건하에서 5~6시간 동안 배양하였다.

### (3) 단위발생란의 형태학적 분류

5~6시간 배양이 끝난 다음 도립현미경(100×, Olympus, Japan)하에서 난자들을 Kaufman과 Sachs(1979)의 판정기준에 준하여 감수분열과 세포분열의 유무에 따라 단위발생란을 형태학적으로 분류하였는데, 제2극체와 하나의 진행을 가지고 있는 난자를 반수체 단위발생란, 제2극체 방출이 억제되고 한개 또는 두개의 진행을 가지고 있는 난자를 이배체 단위발생란, 그리고 제2극체를 형성하는 대신에 2개의 할구로 균등하게 나누어진 형태의 난자를 분할란으로 구분하였다.

### 4. 단위발생란의 체외배양

세포의 기질 단백질이 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 fibronectin, gelatin 및 collagen(Type IV)(Sigma, U.S.A.)을 직경 35 mm 배양접시에 피복하였는데 그 방법은 다음과 같다. Fibronectin은 증류수에 25 µg/ml 농도로 희석한 용액을 배양접시당 200 µl씩 주입하여 공기중 실온에서 45분간 건조시켜 피복하고, gelatin은 증류수로서 2% 용액으로 조제한 다음 121°C, 15 PSI에서 30분동안 autoclaving 하여 멸균한 후 배양접시당 0.5 ml의 gelatin 용액을 주입한 다음 공기중 실온에서 3~4시간 건조시켜 피복하였다. 한편 collagen은 먼저 0.1 µM의 acetic acid로써 0.01% 용액으로 조제한 다음 실온에서 가

끔 저어주면서 완전히 용해시켰다. 이어 0.2 µM millipore filter로 여과한 다음 배양접시당 100 µl씩 주입하여 실온과 자외선하에서 하루밤 방치시켜 건조시킨 후 배양접시를 증류수로서 세척하였다.

이어서 세포의 기질 단백질이 피복된 배양접시에 1.5 ml의 배양액을 넣고 liquid paraffin oil로서 피복한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 와 95% 공기조건하에서 2시간 동안 평형시킨 뒤 15개 내외의 단위발생란을 옮겨 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 와 95% 공기조건하에서 96시간 동안 배양하였다.

### 5. 배반포로 발달한 단위발생란의 핵 수와 직경의 측정

배반포로 발달한 단위발생란의 핵 수의 측정은 Pusel 등(1985)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 3% sodium citrate dihydrate 0.75 ml과 ethanol 0.25 ml 및 1 mg/ml 농도의 hoechst 15 µl를 혼합하여 조제한 형광 염색액을 매 실험시 마다 만들어 사용하였는데 silicon (Sigmacote, U.S.A.) 처리를 한 slide glass에 trypan blue 15 µl를 떨어뜨려 소적을 만들어 배반포로 발달한 단위발생란을 30~60초간 소적액 내에 두었다가 내경이 단위발생란보다 작은 피펫으로 trypan blue만 완전히 제거하였다.

이어 hoechst 염색액 15 µl를 가하여 3~5분간 배양시킨 후 pippet으로써 형광 염색액단을 제거하여 곧 바로 polymount (Polyscience, U.S.A.) 15 µl를 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 200배의 형광 도립현미경(Nikon, Japan)하에서 핵 수를 측정하였다.

한편 배반포의 직경은 ocular micrometer를 이용하여 도립현미경하에서 측정하였다.

### 6. 통계학적 분석

통계학적 분석은 Microstat Statistical Program

Table 1. Parthenogenetic activation of mouse oocytes treated with 7% ethanol for 5 min

No. of eggs treated	No. & (%) of eggs activated			No. & (%) of eggs non-activated
	H*	D*	IC*	
751	483(64.3)	99(13.2)	148(19.7)	21(2.8)
Total		730(97.2)		21(2.8)

\* Abbreviations : H:haploid, D:diploid, IC:immediately cleaved.

Package(Ecosoft Inc., 1984)를 사용하여 단위발생란의 핵 수 및 직경은 분산분석을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 단위발생란의 형태학적 분류

생쥐 난자를 7% ethanol로써 5분간 처리하여 단위발생란을 유기한 결과는 Table 1과 같다. 실험에 사용된 총 751개의 난자 중 64.3%인 483개가 만수체란, 13.2%인 99개가 이배체란, 19.7%인 148개가 분할란으로 활성화되어 전체 난자 중 97.2%인 730개의 난자에서 단위발생이 유기되었다.

이와 같은 결과는 본 연구에서와 동일한 방법으로 C<sub>3</sub>H×C<sub>57</sub>BL 제1세대 교잡종 생쥐 난자에서 단위발생란을 유기하여 91.4~94.7%의 난자활성율을 얻었다는 한 등(1987)의 보고에 비해서는 다소 높은 성적이나, 98.6%의 난자 활성율을 얻었다는 이와 이(1990)의 성적에 비해서는 다소 낮은 편인데, 이와 같이 연구자들에 따라 난자 활성율에 차이가 다소 나타나는 것은 ethanol에 난자가 노출되는 기간의 정확도 유지 및 실험에 사용된 난자의 회수시

기의 차이에 의한 것으로 추정된다.

### 2. 세포외 기질 단백질이 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향

Fibronectin, gelatin, collagen 등의 세포외 기질 단백질을 배양접시에 피복한 후 NaHCO<sub>3</sub>-BMOC-3 배양액으로 단위발생란을 체외배양한 결과는 Table 2와 같다. Fibronectin, gelatin, collagen 등 모든 세포외 기질 단백질 처리구에서 세가지 형태의 모든 단위발생란이 상실배와 배반포로의 체외발달이 대조구에 비해 유의적(P<0.01)으로 촉진되었는데 세포외 기질 단백질 간에는 유의적(P<0.05)인 차이가 없었다. 즉 fibronectin, gelatin 및 collagen 처리구에서 만수체란 중 각각 42.2, 36.8, 38.0%가, 이배체란 중 각각 48.3, 40.9, 43.5%가, 그리고 분할란의 47.1, 43.8, 40.0%가 각각 상실배와 배반포로 발달되었다.

Armant 등(1986)은 fibronectin과 laminin이 피복된 배양접시에서 혈청이 함유되지 않은 CMRL 1066 배양액으로써 CF-1 계통 생쥐 배반포를 배양하면 배반포의 부착과 영양세포의 성장이 촉진된다

Table 2. *In vitro* development of parthenogenetic eggs in NaHCO<sub>3</sub>-BMOC-3 medium on extracellular matrix proteins

Types of egg	Treatment	No. of eggs cultured	No. & (%) of eggs developed to			
			2-cell	4-cell	8-cell	M & B*
Haploid egg	Control	132	121(91.7) <sup>a</sup>	62(47.0) <sup>a</sup>	15(11.4) <sup>a</sup>	6( 4.5) <sup>a</sup>
	Fibronectin	116	113(97.4) <sup>a</sup>	104(89.7) <sup>b</sup>	87(75.0) <sup>b</sup>	49(42.20) <sup>b</sup>
	Gelatin	114	109(95.6) <sup>a</sup>	103(90.4) <sup>b</sup>	80(70.2) <sup>b</sup>	42(36.8) <sup>b</sup>
	Collagen	121	116(95.9) <sup>a</sup>	106(87.6) <sup>b</sup>	82(67.8) <sup>b</sup>	46(38.0) <sup>b</sup>
Diploid egg	Control	25	22(88.0) <sup>a</sup>	10(40.0) <sup>a</sup>	2( 8.0) <sup>a</sup>	1( 4.0) <sup>a</sup>
	Fibronectin	29	27(93.1) <sup>a</sup>	24(87.8) <sup>b</sup>	20(69.0) <sup>b</sup>	14(48.3) <sup>b</sup>
	Gelatin	22	21(95.5) <sup>a</sup>	18(81.8) <sup>b</sup>	13(59.1) <sup>b</sup>	9(40.9) <sup>b</sup>
	Collagen	23	22(95.7) <sup>a</sup>	18(78.3) <sup>b</sup>	14(60.9) <sup>b</sup>	10(43.5) <sup>b</sup>
Immediately cleaved egg	Control	52	-	18(34.6) <sup>a</sup>	7(13.5) <sup>a</sup>	2( 3.8) <sup>a</sup>
	Fibronectin	34	-	32(94.1) <sup>b</sup>	20(58.80) <sup>b</sup>	16(47.1) <sup>b</sup>
	Gelatin	32	-	28(97.5) <sup>b</sup>	19(59.40) <sup>b</sup>	14(43.8) <sup>b</sup>
	Collagen	30	-	28(93.3) <sup>b</sup>	18(60.0) <sup>b</sup>	12(40.0) <sup>b</sup>

\* Abbreviations : H;haploid, D;diploid, IC;immediately cleaved.

\* Abbreviation : M & B, morula and blastocyst

Value with different superscripts in the same column of each egg group are significantly (P<0.01) different.

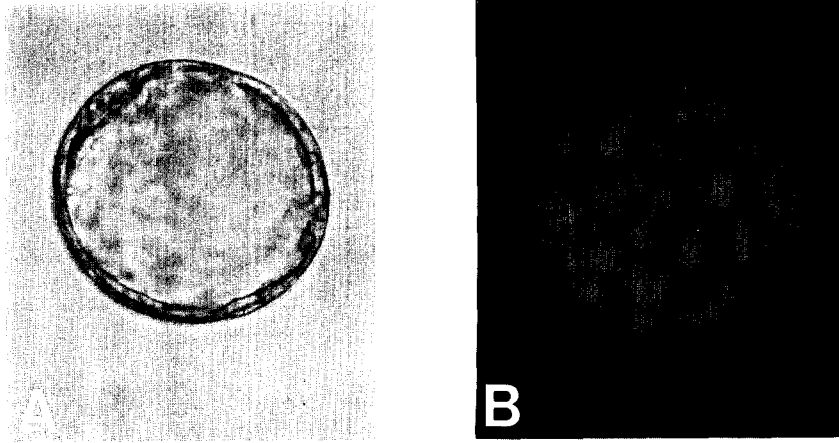


Fig. 1. Blastocysts developed *in vitro* from parthenogenetic eggs ( $\times 200$ ).  
A : intact, B : stained with fluorescent dye of hoechst 33342.

고 하였으며, Wilton과 Trounson(1989)은 fibronectin이 가장 뛰어난 효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 Saito와 Niemann(1991)도 fibronectin 또는 gelatin이 피복된 배양접시에 여러 종류의 배양액으로 4, 8, 16세포기 돼지 분리할구를 배양한 결과 fibronectin 과 gelatin이 8, 16세포기 분리할구의 배반포로의 발달을 촉진하였는데 fibronectin 이 gelatin에 비해 보다 좋은 결과를 나타내었다고 하였다.

한편 생쥐 단위발생란의 체외발달에 세포외 기질 단백질이 어떤 영향을 미치는지에 관한 선행 연구를 찾아볼 수 없어 본 연구의 결과를 이들 연구자들의 결과와 정확히 비교하기는 어려우나 본 연구에서도 fibronectin, gelatin 및 collagen 등의 세포외 기질 단백질이 단위발생란의 체외발달을 촉진하였

으며 fibronectin 처리구가 gelatin 및 collagen 처리구에 비해 다소 좋은 성적을 보임으로써 대체로 이들 연구자들의 보고와 일치하는 경향을 보였다.

Fibronectin 등의 세포외 기질 단백질이 어떠한 양식으로 작용하는지는 아직 불분명한데, 이들 세포외 기질 단백질이 배 세포막 표면부에서 발견되어지고 배양 섬유아세포의 세포막에 fibronectin과 laminin에 대한 수용체가 존재한다는 보고 (Arman, 등, 1986)가 있을 뿐만 아니라 fibronectin을 피복한 배양접시에서 생쥐 배반포를 배양하면 배 세포막의 fibronectin 수용체에 의해 중개되어지는 작용에 의한 배반포에서의 단백질 합성이 이루어진다는 보고(Nidder, 1990)도 있다. 따라서 이들 보고들에 미루어 볼때 fibronectin 등의 세포외 기질 성분의 작용은 단위발생란으로 부터 단백질과 같은

Table 3. Nuclear number and diameter of blastocyst developed *in vitro* from parthenogenetic eggs

Types of eggs	No. of blastocysts stained	No. of nuclei Mean $\pm$ S.E.	Diameter of blastocysts( $\mu$ M)
			Mean $\pm$ S.E.
Haploid	40	45.4 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	104.6 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
Diploid	40	45.1 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	102.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
Immediately cleaved	40	44.9 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	103.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>

Mean  $\pm$  S.E. with same superscript in the same column are not significantly ( $P < 0.05$ ) different.

물질을 분비시키거나 배양액으로 부터 단위발생란으로 어떤 물질을 이동시킴으로써 단위발생란이 배반포로의 정상적인 발달과 함께 구형상태로 계속 형태를 유지시켜 주는 것으로 추정할 수 있으나 정확한 작용기전은 아직 밝혀지지 않아 앞으로 이에 대해 보다 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

### 3. 배반포로 발달한 단위발생란의 핵 수와 직경

세포외 기질 단백질이 처리된 배양접시에서 단위발생란으로 부터 발달한 배반포의 핵 수와 직경은 Table 3에서 보는 바와 같다. 처리된 세포외 기질 단백질의 종류 및 배양전 단위발생란의 형태에 따른 배반포의 핵 수와 직경에는 유의적( $P < 0.05$ )인 차이가 없었는데 핵 수는  $44.9 \pm 0.9 \sim 45.4 \pm 1.6$ 개, 직경은  $102.8 \pm 2.3 \sim 104.6 \pm 1.9 \mu\text{m}$ 의 범위였다.

배반포로 발달한 단위발생란의 핵 수와 직경에 관해서는 생쥐는 물론 다른 동물에서도 선행 연구를 찾아볼 수 없고 생쥐 핵 이식란에서 이러한 연구가 일부 이루어져 왔다. Robl 등(1986)은 탈핵한 2세포기의 수핵란에 2, 8세포기의 핵을 이식하여 66시간 동안 체외배양을 실시한 후 배반포로 발달한 배의 핵 수는 각각  $39 \pm 4$ ,  $25 \pm 4$ 개 였다고 하였고, Kono와 Tsunoda(1989)도 4, 8세포기의 공핵란을 이식받은 배에서 체외에서 발달시킨 배반포의 핵 수는 각각  $30 \pm 2.4$ ,  $22 \pm 1.3$ 개 였다고 보고하였다. 또한 박 등(1990)은 탈핵한 2, 4, 8세포기 수핵란에 같은 세포기의 핵을 이식한 후 배반포로 발달시켜 핵수와 직경을 측정된 결과 세포기에 따라 핵 수는 각각  $33.1 \pm 1.2$ ,  $27.5 \pm 1.8$ ,  $24.0 \pm 1.3$ 개, 직경은  $100.7 \pm 1.1$ ,  $97.9 \pm 1.9$ ,  $102.5 \pm 2.1 \mu\text{m}$ 로 나타나 핵 수는 세포기에 따라 유의적( $P < 0.05$ )인 차이가 있었으나 직경은 유의적( $P < 0.05$ )인 차이가 없었다고 하였는데 배반포의 직경은 본 연구에서 얻은 배반포로 발달한 단위발생란의 직경과 거의 일치하고 있는 수치이다.

Henery(1992)는 생쥐의 정상 이배체란, 단위발생 이배체란 그리고 단위발생 반수체란을 48~105시간 배양하여 핵 수가 배가 되는데 소요되는 시간을 조사한 결과 hCG 주사후 각각 12.74, 12.25, 15.25시간으로 단위발생 이배체란은 정상란과 비슷하였으나 단위발생 반수체란은 시간이 지연되었다고

하였다. 또한 hCG 주사후 96~99시간 사이의 핵 수는 정상 이배체란, 단위발생 이배체란, 단위발생 반수체란에서 각각 30.51, 35.21, 16.62개로 단위발생 반수체란에서 발달이 현저히 낮았다고 하였다.

본 연구에서는 단위발생란의 형태별로 핵 수와 직경에 유의적( $P < 0.05$ )인 차이가 없는 것으로 나타났는데 이는 일단 배반포에 도달한 단위발생란들의 질적인 차이가 없음을 시사해 준다.

## 적 요

세포외 기질 단백질인 fibronectin, gelatin 및 collagen이 생쥐 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향을 밝히기 위하여 이들 세포외 기질 단백질을 피복한 배양접시에서  $\text{NaHCO}_3$ -BMOC-3 배양액으로 생쥐 단위발생란을 체외 배양한 결과는 다음과 같다.

세포외 기질 단백질들은 그들 종류간에는 차이가 없이 단위발생란의 체외발달을 대조구에 비해 유의적( $P < 0.01$ )으로 촉진하였는데 fibronectin, gellatin 및 collagen은 반수체란 중 각각 42.2, 36.8, 38.0%를, 이배체란 중 각각 48.3, 40.9, 43.5%를 그리고 분할란의 47.1, 43.8, 40.0%를 각각 상실배와 배반포로 발달시켰다.

또한 배반포로 발달한 단위발생란의 핵 수와 직경에서는 처리된 세포외 기질 단백질의 종류 및 배양전 단위발생란의 형태에 따른 유의적( $P < 0.05$ )인 차이가 없었다. 배반포로 발달한 반수체란, 이배체란, 분할란의 핵 수는 각각  $45.4 \pm 1.6$ ,  $45.1 \pm 1.4$ ,  $44.9 \pm 0.9$ 개 이었고 직경은 각각  $104.6 \pm 1.9$ ,  $102.8 \pm 2.3$ ,  $103.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$ 이었다.

## 참고문헌

- Armant DR, Kaplan HA and Lennarz WJ. 1986. Fibronectin and laminin promote in vitro attachment and outgrowth of mouse blastocysts. *Dev. Biol.* 116:519~523.
- Barton SC, Adams CA, Norris ML and Surani MAH. 1985. Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and

- trophectoderm tissues in reconstituted blastocyst in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90:267~285.
- Cuthbertson KSR, Whittingham DG and Cobbold PH. 1981. Free  $Ca^{2+}$  increase in exponential phase during mouse oocyte activation. *Nature* 294:754~757. 1981.
- Cuthbertson KSR. 1983. Parthenogenetic activation of mouse oocytes *in vitro* with ethanol and benzylalcohol. *J. Exp. Zool.* 226:311~314.
- Dyban AP and Khozahi. 1980. Parthenogenetic development of ovulated mouse ova under the influence of ethylalcohol. *Bull. Exp. Biol. Med.* 89:528~530.
- Gulyas BJ and Yuan LC. 1985. Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *J. Exp. Zool.* 233:269~276.
- Henery PC and Kaufman MH. 1992. Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the perimplantation period. *Mol. Reprod. Dev.* 31:258~263.
- Johnson JD, Epel DD and Paul M. 1976. Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature, Lond.* 262:661~664.
- Kaufman MH. 1973. Parthenogenesis in the mouse. *Nature, Lond.* 242:475~476.
- Kaufman MH. 1979. Mammalian parthenogenetic development. Bibliography (with review). *Bibliography of Reproduction.* 33:261~264.
- Kaufman MH. 1981. Parthenogenesis: a system facilitating understanding of factors that influence early mammalian development. In: *progress in anatomy.* vol. 1. Ed. R. J. Harrison and R. L. Holmec, Cambridge University Press. pp. 1~34.
- Kaufman MH. 1982. Chromosome complement of single pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 71:139~154.
- Kaufman MH and Sachs L. 1976. Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 35:179~190.
- Kono T, Iwasaki and Nakahara T. 1989. Development of single blastomeres from four- and eight-cell mouse embryos fused into the enucleated half of a two-cell embryo. *Gamete Res.* 22:427~434.
- Marcus GT. 1990. Activation of cumulus-free mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 26:159-162.
- Nicolson GL. 1976. Transmembrane control of the receptors of normal tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 457:57~108.
- Nieder GL. 1990. Protein secretion by the mouse trophoblast during attachment and outgrowth *in vitro*. *Biol. Reprod.* 43:251~259.
- Onodera M and Tsunoda. 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. *Gamete Res.* 22:277~283.
- Pincus G. 1939. The breeding of some rabbits produced by recipients of artificially activated ova. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 25:557~559.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad CE Jr, Hammer RE and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24:687~700.
- Robl JM, Gilligan B, Cristser ES and First NL. 1986. Nuclear transplantation in mouse embryos: assessment of recipient cell stage. *Biol. Reprod.* 34:733~739.
- Saito S and Niemann H. 1991. Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.* 44:927~936.

- Seeman PS, Chan-wong CS and Staiman A. 1974. Calcium reversal of nerve blockage by alcohols, anesthetics, tranquilizers and barbiturates. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 52:526~534.
- Siracus G, Whittingham, Codonesu M and De Felici M. 1978. Local anesthetics and phenothiazine tranquilizers induce parthenogenetic activation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 65:51~535.
- Steinhardt RA, Expl D, Carrol EJ and Yanagimachi R. 1974. Is calcium ionophores universal activator for unfertilized eggs? *Nature* 252:41~43.
- Tarkowski AK, Wittowska A and Nowicka J. 1970. Experimental parthenogenesis in the mouse. *Nature, Lond.* 226:162~165.
- Uehara T and Yanagimachi R. 1977. Activation of hamster eggs by pricking. *J. Exp. Zool.* 199:269~275.
- Wilton LJ and Trounson AO. 1989. Biopsy of preimplantation mouse embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. *Biol. Reprod.* 40:145~152.
- 박희성, 이효종, 최상용, 박충생. 1990. 생쥐 수정란의 핵이식 후 체외발달에 관한 연구. *한국축산학회지* 14:205~211.
- 이철상, 이경광. 1990. 생쥐 8세포기 할구의 발생능. *한국축산학회지* 32:131~138.
- 한용만, 백청순, 이경아, 이경광, 정길생. 1987. 생쥐에 있어서 ethanol 처리에 의한 단위발생의 유기. *한국축산학회지* 29:383~389.