

## 동결보존배를 이용한 일란성 다태생산에 관한 연구

신 상 태

충남대학교 수의과대학

### 서 론

일란성 쌍태(一卵性 雙胎) 생산에 대한 연구는 우수한 유전형질을 가진 동물의 생산성 향상을 위한 시도중의 하나로서 이미 여러나라에서 수정란의 절단법을 이용하여 마우스 등의 실험동물<sup>6,11,19)</sup>은 물론 돼지<sup>12)</sup>, 양<sup>25)</sup>, 산양<sup>24)</sup>, 소<sup>15,28,30)</sup> 및 말<sup>1)</sup> 등 각종 동물에서 그 성공률이 보고되었으며, 국내에서도 생쥐<sup>33,36)</sup>, 산양<sup>34)</sup> 및 소<sup>37)</sup> 등의 동물에 대한 일란성 쌍태 생산이 시도된 바 있다. 근래에는 핵치환 기술에 의한 일란성 다태생산에 관한 연구도 활발하게 추진되고 있다.<sup>2,10,16,27,35)</sup>

포유동물 특히 소 등의 단태동물에서의 일란성 쌍태 또는 다태의 인위적인 생산은 수정란의 이용효율을 증대시킴으로써 가축개량에 크게 이바지 할 수 있다는 산업적인 측면뿐만아니라 생산된 일란성의 태아들은 유전자의 구성이 동일하므로 유전학, 육종학 및 발생학 연구의 유용한 재료로서 이용될 수 있다는 학문적인 측면에서도 그 의의가 매우 크다. 그러나 일란성 쌍태생산에 대한 연구의 대부분이 16세포기 이상의 상실배로 발육된 수정란을 micromanipulator에 장착시킨 microknife를 이용하여 절단이분하는 방식으로서 쌍태 이상의 동물을 생산시키기는 곤란할 뿐만아니라 절단시에 할구에 많은 손상을 입히므로 수정란의 이용효율이 낮아진다.

포유동물의 수정란은 발생초기단계인 8세포기까지는 개개의 할구자체가 각각 독립된 하나의 개체로 발육될 수 있는 능력(totipotency)이 있다.<sup>5,14,17,22,26)</sup> 그러므로 수정란의 각 할구를 물리적 손상을 입히지

않고 분리하여 상실배 또는 배반포까지 체외배양한 후 체내이식한다면 동일한 수정란으로부터 4마리 이상의 개체생산이 가능할 것이며 이러한 방법으로 Willadsen과 Polge<sup>29)</sup>는 3쌍의 일란성 송아지를 생산하였다고 보고하였다.

한편 수정란을 분할하여 그 한쪽을 동결보존하고 나머지 한쪽으로 염색체검사, 유전적조작 및 이식에 제공하기 위한 절단이분배의 동결보존 예가 보고되었으나<sup>7,13)</sup>, 동결보존후의 생존성이 극히 낮을 뿐만아니라 투명대를 제거한 수정란은 할구의 점착성과 형태확인의 어려움 등으로 인해 동결, 융해후의 회수율도 매우 낮은 단점이 있다.

1986년 Suzuki와 Shimohira<sup>20)</sup>는 동결보존한 소 상실배의 절단이분 및 이식을 시도하여 성공한 바 있다고 하였으나 아직 동결보존란을 이용한 일란성 다태동물의 생산에 관한 보고는 극히 미미한 실정이다.<sup>8)</sup> 따라서 동결보존한 수정란을 이용하여 일란성 다태동물을 생산할 수 있다면 필요한 시기에 우수한 유전형질을 보유한 동물의 대량생산이 가능하므로 현재의 수정란 동결보존의 이점을 배가시킬 수 있는 획기적인 계기가 될 것이다.

이에 저자는 4~8세포기의 마우스 수정란의 할구를 분리, 배양함으로써 일란성 다태동물의 생산에 적합한 배의 생산방법을 도출한 다음, 투명대를 제거하지 않은 4~8세포기 수정란을 동결, 융해하여 투명대제거 및 할구의 분리와 이들 분리할구의 체외배양 및 체내이식을 실시함으로써 동결보존배를 이용한 일란성 다태동물의 생산을 시도하였다.

\* 이 연구는 1991년도 한국과학재단의 일반기초연구비지원에 의한 결과임. 과제번호 : KOSEF 913-1511-009-2.

## 재료 및 방법

**수정란의 채취** : 생후 4주령 정도의 ICR계 미성숙 암마우스에 7.5 IU의 PMSG와 동량의 HCG를 48시간 간격으로 투여한 다음, 동일계의 성숙 숫마우스와 하룻밤을 동거시키고 다음날 vaginal plug이 확인된 개체만 공란마우스로 이용하였다. HCG 투여후 56~66시간에 공란마우스를 도태하고 M2 배양액으로 난관을 관류하여 4~8세포기의 수정란을 채취하였다.

**수정란의 동결** : 동결보존액은 0.25 M의 sucrose와 20%의 fetal bovine serum(FBS)이 함유된 dulbecco's PBS(d-PBS)였으며, 4세포기 수정란의 동결보존에는 3.0 M의 ethylene glycol을 그리고 8세포기의 동결보존에는 5.0 M의 glycerol을 첨가하였다.

미리 0.25 ml의 plastic straw에 넣어 냉동고에 보존해 둔 동결보존액에 4 또는 8세포기배를 주입한 다음, straw를 canister에 넣고 액체질소가 약 1/2~2/3정도 채워진 액체질소통에 canister를 서서히(약 1분) 잠기도록 하는 초급속 동결법으로 수정란을 동결하였다. 액체질소에서 꺼낸 straw는 실온에서 약 30초 방치한 후 38°C의 물에 30초간 침지시켜 급속융해한 후 0.25 M의 sucrose와 20%의 FBS가 함유된 d-PBS에 10분간 방치하여 동결보호제를 희석, 제거하였다. 희석이 끝난 수정란은 d-PBS로 3회 및 M16으로 1회 세척한 다음, 새로운 M16배양액에 넣어 배양하였다.

**분리배의 작성 및 체외배양** : 0.5% pronase액으로 투명대를 제거한 수정란은  $Ca^{++}$  및  $Mg^{++}$ 이 포함되지 않은 M2 배양액에 30분정도 침지시켜 decompaction시킨 다음, micropipette으로 흡인, 유출을 반복하여 할구의 기계적 손상을 최소화하면서 각각의 할구를 완전히 분리하였다.

신선한 또는 동결, 융해한 4 또는 8 세포기배에서 분리된 각 할구들은 M16 배양액 microdrop내에 넣고 37°C의 5%  $CO_2$  배양기에서 48시간이상 배양하면서 그 발육상태를 점검하였다. 이때 4세포기의 분리할구는 1 microdrop내에 1개씩 또는 1쌍씩(융합)을 그리고 8 세포기의 분리할구는 1개씩 또는 1쌍~3개씩(융합)을 따로 배양하였다.

**분리배의 이식** : 체외배양에서 배반포까지 발육된 분리할구들은 수란마우스의 자궁내에 수술적 방법으로 이식하였다. 수란마우스는 생후 6주령 이상의 IC-

R 마우스였으며, 3일전에 CBA계의 숫마우스와 자연교미(하룻밤 동거)시키고 다음날 아침에 질전이 형성된 것만을 선발하여 사용하였다. 임신 3일째의 수란마우스를 pentobarbital sodium으로 마취시키고 배측면을 절개한 다음, 수정란이식용 micropipette에 동일수정란에서 분리, 배양된 배반포를 자궁각 선단에 주입하였다. 즉, 1/8세포배는 양쪽 자궁각에 4개씩을, 1/4세포배 및 2/8세포배는 양쪽 자궁각에 2개씩을, 2/4세포배, 3/8세포배 및 4/8세포배는 한쪽 자궁각에만 2개씩을 그리고 대조군인 4/4세포배와 8/8세포배는 한쪽 자궁각에만 1개씩을 이식하였다.

이식후 17일째부터 수란마우스의 분만여부를 검사하였으며, 분만후 약 1주일에 자연교미를 통해 임신, 분만된 갈색 마우스[(ICR×CBA)F1]들 중에 섞인 수정란이식을 통해 생산된 흰색 마우스의 수를 확인함으로써 일란성 다태마우스의 생산여부를 확인하였다.

## 결 과

4세포기의 마우스 수정란으로부터 분리한 각 할구들의 체외배양후의 발육률을 형태적으로 분류한 결과는 Table 1에서와 같다. 즉, 한개의 할구로 구성된 1/4세포배의 체외배양 후 정상배반포로의 발육률은 38.7%이며, 나머지 비록 생존한 할구이기는 하나 장차 개체로의 발생이 불가능한 morula(상실배), false-blastocyst(위배반포) 및 trophoblastic vesicle(영양세포배)는 각각 5.8%, 30.9%, 12.8% 및 5.3%였으며, 6.6%가 사멸(degeneration)하였다.

한편 8세포기의 마우스 수정란으로부터 분리한 각 할구의 체외배양후 발육률을 형태학적으로 분류한 결과는 Table 2에서와 같다. 즉, 한개의 할구로 구성된 1/8 세포배의 체외배양 후 정상배반포로의 발육률은 15.1%로서 일란성 다태생산 가능성은 거의 없는 것으로 보이는 반면, 2/8 세포배에서부터는 정상배반포로의 발육률이 점차 증가(40.1%)하여, 3/8 세포기배 및 4/8 세포기배에서의 실용가능한 수준(65.9% 및 88.3%)에 까지 발육되었다.

동결보호제로 각각 3.0M ethylene glycol 및 5.0M glycerol을 이용하여 초급속 동결한 4세포기 및 8세포기 마우스 수정란의 융해후 생존율은 Table 3에서와 같다.

총130개를 동결한 4세포기배는 융해후 98개(75.

**Table 1. *In vitro* Development of the Blastomeres Isolated from 4-cell Mouse Embryos**

Types of blastomeres	No. of blastomeres cultured	No.(%) of blastomeres developed to*					
		Morula	Normal-BL	False-BL	TV	NIF	Deg
1/4	243	14(5.8)	94(38.7)	75(30.9)	31(12.8)	13(5.3)	16(6.6)
2/4	250	9(3.6)	184(73.6)	16(6.4)	22(8.8)	10(4.0)	4(4.5)
4/4 (control)	106	3(2.8)	102(96.2)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.9)

\* BL : blastocyst, TV : trophoblastic vesicle, NIF : non-integrated form, Deg : degenerated.

**Table 2. *In vitro* Development of the Blastomeres Isolated from 8-cell Mouse Embryos**

Types of blastomeres	No. of blastomeres cultured	No.(%) of blastomeres developed to*					
		Morula	Normal-BL	False-BL	TV	NIF	Deg
1/8	185	7(3.8)	28(15.1)	55(29.7)	72(38.9)	9(4.9)	14(7.6)
2/8	207	9(4.3)	83(40.1)	63(30.4)	28(13.5)	16(7.7)	8(3.9)
3/8	211	3(1.4)	139(65.9)	30(14.2)	14(6.6)	20(9.5)	5(2.4)
4/8	128	0(0.0)	113(88.3)	8(6.3)	5(3.9)	0(0.0)	2(1.6)
8/8 (control)	65	0(0.0)	64(98.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(1.5)

\* BL : blastocyst, TV : trophoblastic vesicle, NIF : non-integrated form, Deg : degenerated.

**Table 3. Survival Rates of Ultrarapid Frozen Mouse Embryos after 3 Hours *in vitro* Culture**

Item	4-Cell	8-Cell
Number(%) of embryos		
Frozen	130(100.0)	87(100.0)
Recovered	98(75.4)	72(82.8)
Cultured	98(100.0)	72(100.0)
Normal shaped	63(64.3)	65(90.3)
Partially degenerated	23(23.5)	6(8.3)
Whole degenerated	12(12.2)	1(1.4)

4%)가 회수되었으며, 동결보호제를 희석제거한 다음, M16에서 3시간 배양후 관찰한 결과 전체의 할구가 정상적인 것이 63개(64.3%), 1~3개의 할구가 동해를 입어 변성된 것이 23개(23.5%) 그리고 전체할구가 동해를 입어 완전히 사멸된 수정란이 12개(12.2%)였다. 반면 총 87개를 동결한 8세포기배는 융해 후 72개(82.8%)가 회수되었으며, 동결보호제를 희석제거한 다음, M16에서 3시간 배양후 관찰한 결과 전체의 할구가 정상적인 것이 65개(90.3%), 1~5개의 할구가 동해를 입어 변성된 것이 6개(8.3%) 그리고 전체할구가 동해를 입어 완전히 사멸된 수정란이 1개(1.4%)였다.

3.0 M의 ethylene glycol을 동결보호제로 초급속 동결한 4세포기배로부터 분리한 각 할구들의 체외배

양후의 발육률을 형태학적으로 분류한 결과는 Table 4에서와 같다. 한개의 할구로 구성된 1/4세포배의 정상배반포로의 발육률은 35.6%로 비교적 저조한 편이며 나머지는 개체발달이 불가능한 morula(상실배), false-blastocyst(위배반포), trophoblastic vesicle(영양세포배), non-integrated form(비완성형) 및 degenerated embryo(변성배)였다. 그러나 2개의 할구로 이루어진 2/4세포배의 정상배반포로의 발육률은 68.5%로서 1/4세포배에 비해 월등히 높은 수준이었다.

5.0 M의 glycerol을 동결보호제로 초급속 동결한 8세포기배로 부터 분리한 각 할구들의 체외배양후의 발육률을 형태학적으로 분류한 결과는 Table 5에서와 같다. 각 분리할구의 정상배반포로의 발육률은 1/8 세포배에서는 16.1%, 2/8세포배에서는 50.6%, 3/8 세포배에서는 71.0% 및 4/8 세포배에서는 90.9%였다.

동결보존한 4세포기배 및 8세포기배에서 분리한 할구들을 체외배양시켜 만든 배반포들을 임신 3일째의 수란마우스의 자궁각에 수술적 방법으로 이식한 결과, 1/4 세포기배, 2/4 세포기배, 4/4 세포기배(대조군), 1/8 세포기배, 2/8 세포기배, 3/8 세포기배, 4/8 세포기배 및 8/8 세포기배(대조군)로부터 각각 1, 4, 5, 0, 3, 5, 4 및 4마리(합계 26마리)의 마우스가 생산되었다. 비록 궁극적인 목표인 삼태(triplet)나

**Table 4. *In vitro* Development of the Blastomeres Isolated from Deep-frozen 4-cell Mouse Embryos**

Types of blastomeres	No. of blastomeres cultured	No.(%) of blastomeres developed to*					
		Morula	Normal-BL	False-BL	TV	NIF	Deg
1/4	73(100.0)	11(15.1)	26( 35.6)	16(21.9)	4(5.5)	9(12.3)	7(9.6)
2/4	89(100.0)	3( 3.4)	61( 68.5)	7( 7.9)	2(2.2)	12(13.5)	4(4.5)
4/4 (control)	49(100.0)	0( 0.0)	49(100.0)	0( 0.0)	0(0.0)	0( 0.0)	0(0.0)

\* BL : blastocyst, TV : trophoblastic vesicle, NIF : non-integrated form, Deg : degenerated.

**Table 5. *In vitro* Development of the Blastomeres Isolated from Deep-frozen 8-cell Mouse Embryos**

Types of blastomeres	No. of blastomeres cultured	No.(%) of blastomeres developed to*					
		Morula	Normal-BL	False-BL	TV	NIF	Deg
1/8	93(100.0)	5(5.4)	15( 16.1)	20(21.5)	30(32.2)	14(15.1)	9(9.7)
2/8	89(100.0)	2(2.2)	45( 50.6)	27(30.3)	5( 5.6)	7( 7.9)	3(3.4)
3/8	38(100.0)	2(5.3)	27( 71.0)	5(13.2)	0( 0.0)	3( 7.9)	1(2.6)
4/8	33(100.0)	1(3.0)	30( 90.9)	1( 3.0)	0( 0.0)	1( 3.0)	0(0.0)
8/8 (control)	33(100.0)	0(0.0)	33(100.0)	0( 0.0)	0( 0.0)	0( 0.0)	0(0.0)

\* BL : blastocyst, TV : trophoblastic vesicle, NIF : non-integrated form, Deg : degenerated.

**Table 6. Results after Transfer of Blastocysts which Developed from Deep-frozen 4-cell and 8-cell Mouse Blastomeres**

Types of blastomeres	Number of blastomeres transferred	Number of recipients		Number of offsprings		
		Transferred*	Pregnant*	Single	Twin	Total
1/4	40	10	1	1	0	1
2/4	20	10	3	2	1	4
4/4 (control)	10	10	5	5	-	5
1/8	80	10	0	0	0	0
2/8	40	10	2	1	1	3
3/8	20	10	4	3	1	5
4/8	20	10	3	2	1	4
8/8 (control)	10	10	4	4	-	4
Total	240	80	22	18	4	26

\*\* Number of recipient delivered only natural(agouti color) pups after transfer.

\*\* Number of recipient delivered natural(agouti color) and transferred(white color) pups after transfer.

사태(quadruplet) 등의 다태생산에는 성공하지 못하였으나 1/4세포기배와 1/8세포기배를 제외한 2/4세포기배, 2/8세포기배, 3/8세포기배 및 4/8세포기배로부터 각각 1쌍의 일란성 쌍태마우스가 생산되었다(Table 6).

### 고 찰

수정란의 체외배양후 생존율은 그 수정란의 채취

시기와도 밀접한 관련이 있다. 그 단적인 예로서 2-cell block 현상이 있는 마우스 수정란에서 발육초기(early stage)의 2세포기배와 발육후기(late stage)의 2세포기배간의 체외배양후 발육률에는 엄청난 차이가 있어 late 2-cell의 경우 약 60% 이상이 blastocyst로 발육되나 early 2-cell의 경우 거의가 발육되지 못한다. 이와 마찬가지로 4세포기 이후의 수정란들도 체외배양후 발육율은 late stage의 수정란들이 early s-

stage의 수정란들보다 훨씬 높다. 따라서 동일 stage (동일한 숫자의 할구를 가진)의 수정란에 대한 실험을 실시할 때는 가능한한 late stage의 수정란을 채취하는 것이 바람직하며, 본 실험에서도 이러한 배려가 성공율을 높이는 요소로 작용되었다. 즉, 4 세포기의 수정란은 HCG 투여후 약 60시간에 그리고 8 세포기의 수정란은 약 66시간에 채취하는 것이 바람직하였다.

실험결과 2개의 할구로 이루어진 2/4 세포배의 체외배양후 정상배반포로의 발육률은 73.6%로 1/4세포기배에 비해 현저히 높아졌으며 할구분리에 의한 다태생산 가능성이 충분하였다. 또한 일란성 다태생산을 위해서는 2/8세포배의 정상배반포로의 발육률을 어느 정도의 수준(60% 이상)까지 높이는 것이 급선무라 생각한다.

최근의 포유동물 수정란의 동결보존실험은 간편하면서도 높은 생존율을 얻을 수 있는 급속동결 또는 초급속동결법의 개발이 그 주류를 이루고 있다.<sup>4,9,21,23,31,32</sup> 본 실험에서의 수정란 동결보존방법도 강 등<sup>32)</sup>의 초급속 동결법을 이용하였다. 또한 투명대제거배를 동결하면 생존율이 현저히 저하되므로 intact 4~8 cell을 동결보존하고 융해후 투명대를 제거함으로써 동결에 따른 수정란의 손실을 최소화 하였다.

동결보호제로 5.0 M의 glycerol을 이용한 8세포기배의 초급속동결후 생존율은 매우 높았으나(90.3%), 동결보호제로 3.0 M의 ethylene glycol을 이용한 4세포기의 초급속 동결후 생존율은 비교적 저조(64.3%) 하였으므로 생존율을 향상시킬 수 있는 적정조건에 대한 추가연구가 필요하며, 다른 동결방법에 비해 고농도의 동결보호제를 사용함으로써 회수율이 비교적 낮았던(75.4~82.8%) 것도 보완되어야 할 문제점이라 생각된다.

동결보존한 4 및 8 세포기배를 다태동물생산에 이용하기 위한 본 실험의 결과에 따른 이론상의 수정란활용율은 1/4세포배에서는 35.6%×4(4세포기배 하나로 4개의 1/4세포배 작성)=142.4%이며, 2/4세포배에서는 68.5%×2(4세포기배 하나로 2개의 2/4세포배 작성)=137.0%이므로 whole embryo 사용시에 비해 각각 42.4% 및 37.0%가 증가된다. 그러나 이들 분리할구들이 체내에서 얼마만큼이나 완전히 개체로 발육되는가가 미지수이며 관건이다. 특히 1/4세포배에서는 개체발육률의 심한 저하가 우려된다. 또한 1/8세포배에서는 일란성 다태생산 가능성이 매우 낮

았으나 2/8세포배에서 부터의 정상배반포로의 발육률은 급격히 증가되어 이론상의 수정란 활용율이 2/8 세포배에서는 50.6%×4(8세포기배 하나로 2/8세포배 4개 작성)=202.4%, 3/8세포배에서는 71.0%×8/3(8 세포기배 하나로 3/8세포배 8/3개 작성)=189.3%, 4/8세포배에서는 90.9%×2(8세포기배 하나로 4/8세포배 2개 작성)=181.8%로서 거의 비슷한 높은 수준임을 알 수 있다. 이중 실험가능성 및 활용도가 가장 우수할 것으로 예상되는 세포배는 3/8세포배로서 개체의 발생가능성도 뛰어날 뿐만아니라 한개의 whole embryo로 2개의 3/8세포배를 작성함으로써 일란성 쌍태를 작출하고, 아울러 나머지 할구 2개를 생감별이나 유전자분석 등<sup>3)</sup>에 활용할 수 있는 큰 장점이 있다.

마우스에서는 2세포기배의 분리할구에서는 일란성 쌍태를 생산할 수 있으나 4세포기배 이후의 분리할구 하나로는 배반포로의 발육도 매우 불량한 뿐만아니라 착상이후의 발육도 불가능한 것으로 알려져 있다.<sup>18,22)</sup> 그러나 본 실험의 결과 1/8 세포기배에서는 개체발생이 되지 않았으나 1/4 세포기배에서는 개체가 생산됨을 알 수 있었다. 따라서 차후 이 연구를 좀더 보완한다면 하나의 동결수정란을 이용하여 여러마리의 일란성 다태동물의 생산이 충분히 가능할 것이며, 아울러 각 동물의 수정란의 특이성에 관한 실험을 추가함으로써 산업동물이나 각종의 실험동물에도 활용되리라 생각된다.

## 결 론

근래 일란성 쌍태생산을 위한 많은 보고가 있으나 동결수정란을 이용한 일란성 다태생산에 대한 시도는 드물다. 본 실험은 우량수정란의 활용성을 극대화하기 위한 기초실험의 일환으로서 동결보존된 마우스 4세포기배 및 8세포기배를 이용하여 일란성 다태동물의 생산을 시도하였다.

과배란된 마우스 4세포기배 및 8세포기배에서 분리한 할구들을 단독 또는 집합시켜 체외배양한 결과 1/4세포기배, 2/4세포기배 및 4/4세포기배(대조군)의 체외배양후 정상배반포로의 발육률은 각각 38.7%, 73.6% 및 96.2%였으며 1/8세포기배, 2/8세포기배, 3/8세포기배, 4/8세포기배 및 8/8세포기배(대조군)의 정상배반포로의 발육률은 각각 15.1%, 40.1%, 65.9%, 88.3% 및 98.5%였다.

초급속 동결법으로 동결보존한 마우스 4세포기배 및 8세포기배에서 분리한 할구들을 단독 또는 집합시켜 체외배양한 결과 1/4세포기배, 2/4세포기배 및 4/4세포기배(대조군)의 체외배양후 정상배반포로의 발육률은 각각 35.6%, 68.5% 및 100.0%였으며 1/8세포기배, 2/8세포기배, 3/8세포기배, 4/8세포기배 및 8/8 세포기배(대조군)의 정상 배반포로의 발육률은 각각 16.1%, 50.6%, 71.0%, 90.9% 및 100.0%였다.

동결보존한 4세포기배 및 8세포기배에서 분리한 할구들을 체외배양시켜 만든 배반포들을 수란마우스의 자궁각에 이식한 결과 1/4 세포기배, 2/4 세포기배, 4/4 세포기배(대조군), 1/8 세포기배, 2/8 세포기배, 3/8 세포기배, 4/8 세포기배 및 8/8 세포기배(대조군)로부터 각각 1, 4, 5, 0, 3, 5, 4 및 4마리(합계 26마리)의 마우스가 생산되었으며, 이중 2/4 세포기배, 2/8 세포기배, 3/8 세포기배 및 4/8 세포기배로부터 각각 1쌍의 일란성 쌍태마우스가 생산되었다.

## 참 고 문 헌

- Allen, W.R. and Pashen, R.L. : Production of monozygotic(identical) horse twins by embryo micromanipulation. J. Reprod. Fert. (1984)71 : 607~613.
- Bondioli, K.R., Westhusin, M.E. and Looney, C.R. : Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology (1990)33 : 165~174.
- Herr, C.M. and Reed, K.C. : Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. Theriogenology (1991)35 : 45~54.
- Isachenko, V.V., Ostashko, F.I. and Isachenko, E.F. : Vitrification and ultra-rapid freezing of rat embryos. Theriogenology (1992)37 : 226.
- Kelly, S.J. : Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. J. exp. Zool. (1976)200 : 365~376.
- Kobayashik, K., Nagashima, H., Yamakawa, H., Kato, Y. and Ogawa, S. : The survival of whole and bisected rabbit morulas after cryopreservation by the vitrification method. Theriogenology (1990)33 : 776~788.
- Lehn-Jensen, H. and Willadsen S.M. : Deep-freezing of cow 'half' and 'quarter' embryos. Theriogenology (1983)19 : 49~54.
- Lucas-Hahn and Niemann H. : *In vitro* survival of fresh and frozen/thawed bovine demi-embryos. Theriogenology (1991) 36 : 619~627.
- Miyamoto, H. and Ishibashi Y : Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert. (1986)78 : 471~478.
- Modlinski, J.A. and Smorag, Z. : Preimplantation development of rabbit embryos after transfer embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. Moeclular Reproduction and Development (1991)28 : 361~372.
- Moustafa, L.A. and Hahn, J. : Experimentelle erzeugung von identischen mausezqillingen. Dtsch. Tierarztl. Wschr. (1978) 85 : 242~244.
- Nagashima, H., Katoch, Y., Shibata, K. and Ogawa, S. : Production of normal piglets from microsurgical split morulae and blastocysts. Theriogenology (1988)29 : 485~495.
- Nagashima, H. and Ogawa, S. : Studies on the developmental potential and the survival after the deep freezing of microscopically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. Jpn. Anim. Reprod. (1981)27 : 12~19.
- Nicholas, J.S. and Hall, B.V. : Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. J. Exp. Zool. (1942)90 : 441~459.
- Ozil, J.P. : Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. J. Reprod. Fert.(1983)69 : 463~468.
- Prather, R.L., Barnes, F.L., Sins, M.J., Robl, J.M., Eyestone W.H., and First N.L. : Nuclear transplantation in the bovine embryos : Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod. (1987)37 : 859~866.
- Prather, R.S. and Frist N.L. : Developmental fate in chimeras derived from highly asynchronous murine blastomeres. J. Exp. Zool. (1987)242 : 27~33.
- Rossant, J. : Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. J. Embryol. exp. Morph. (1976)36 : 283~290.
- Stice, S.L. and Robl, J.M. : Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbits embryos. Biol. Reprod. (1988)39 : 657~664.
- Suzuki, T. and Shimohira, I. : Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose. Theriogenology(1986)26 : 333~339.
- Szell, A. and Shelton, J.N. : Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J. Reprod. Fert.(1986)76 : 401~408.
- Tarkowski, A.K. and Wroblewska, J. : Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. J. Embryol. exp. Morph. (1967)18 : 155~180.
- Trounson, A., Peura, A., Freemann, L. and Kirby, C. : Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. Fertil. Steril. (1988)49 : 822~826.
- Tsunoda, Y., Tokunaga, T., Sugie T. and Katsumata, M. : Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. Theriogenology (1985)24 : 337~343.
- Willadsen, S.M. : A method for culture of micromanipulated

- sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*(1979)277 : 298~300.
26. Willadsen, S.M. : The developmental capacity of blastomeres from four and eight-cell sheep embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*(1981)65 : 165~172.
  27. Willadsen, S.M. : Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*(1986)320 : 63~65.
  28. Willadsen, S.M., Lehn-Jensen, H., Fehilly, C.B. and Newcomb, R. : The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology* (1981)15 : 23~29.
  29. Willadsen, S.M. and Polge, C. : Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Rec.*(1981)108 : 211~213.
  30. Williams, T.J., Elsdon, R.P. and Seidel, Jr. G.E., : Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* (1984)22 : 521~531.
  31. Williams, T.J. and Johnson, S.E. : A Method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*(1986)26 : 125~133.
  32. 강만중, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광 : 생쥐 2-세포기 수정란의 초급속동결, *한국가축번식학회지* (1990)14 : 9~16.
  33. 김남형, 정길생, 노환철, 백운화, 이경광 : 생쥐수정란의 양분에 의한 일란성 쌍자의 생산. *한축지*(1986)28 : 527~534.
  34. 박충생, 최상용, 이효중, 이지삼, 박희성 : 산양 수정란이식 및 조작기법 개발에 관한 연구 IV. 생쥐 및 산양 수정란의 분할 조작에 의한 일란성 쌍태유기. *한축지*(1991)33(45) : 294~301.
  35. 이철상, 박흥대, 정길생, 이경광 : 핵치환 생쥐의 생산. *한축지*(1989)31 : 69~74.
  36. 정덕수, 이상진, 정길생 : 생쥐배 분할구의 *in vitro* 발달에 관한 연구. *한국가축번식학회지* (1988)12 : 132~140.
  37. 조남기 : 생쥐 및 소 수정란의 분할방법에 관한 연구. *한국가축번식학회지*(1987)11 : 127~131.

## Production of Identical Multiplets from Deep-Frozen Embryos

**Sang-Tae Shin, D.V.M., Ph.D.**

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

### Abstract

Although plenty of experiments for production of genetically identical twins have been reported, most of these reports were focused on microsurgical bisection of morula stage embryos, and little research has been performed for the production with frozen embryos. The objective of these experiments were to assess the *in vitro* and *in vivo* developmental potential of blastomeres isolated from frozen-thawed 4-cell and 8-cell mouse embryos and to produce the identical multiplets from those embryos.

The percentages of isolated 1/4, 2/4, 4/4(control), 1/8, 2/8, 3/8, 4/8 and 8/8(control) blastomeres of 4-cell and 8-cell mouse embryos which developed to normal blastocyst were 38.7%, 73.6%, 96.2%(control), 15.1%, 40.1%, 65.9%, 88.3%, and 98.5%(control), respectively.

The percentages of isolated 1/4, 2/4, 4/4(control), 1/8, 2/8, 3/8, 4/8 and 8/8(control) blastomeres of frozen-thawed 4-cell and 8-cell mouse embryos which developed to normal blastocyst were 35.6%, 68.5%, 100.0%(control), 16.1%, 50.6%, 71.7%, 90.9% and 100.0%(control), respectively.

Normal 26 pups were obtained by transfer of 240 blastocysts developed from 1/4 to 8/8 blastomeres. Those 26 pups obtained, 4 identical twins were produced from 2/4, 2/8, 3/8 and 4/8 blastomeres.