

## 세포외 기질 단백질이 생쥐 분리할구의 체외발달에 미치는 영향

곽대오 · 김선구\* · 김영수 · 박충생\*\*

경상대학교 생물교육과

### Effect of Extracellular Matrix Proteins on the *In Vitro* Development of Isolated Mouse Blastomeres

Kwack, D. O., 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 blastomeres isolated from 2, 4, and 8-cell embryos (termed 1/2, 1/4 and 1/8 blastomeres, respectively) of ICR strain mice, those were cultured in fibronectin, gelatin, or collagen precoated culture dishes containing 1.5 ml of NaHCO<sub>3</sub>-BMO-3 medium at 37°C for 72 hrs. under the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

Fibronectin, gelatin, or collagen significantly ( $P < 0.01$ ) increased and blastocyst formation rate compared with controls in 1/2 (65.3, 59.2, 60.7% vs. 21.6%), 1/4 (63.7, 53.4, 57.1% vs. 26.3%), and 1/8 blastomeres (61.1, 52.3, 53.7% vs. 19.1%).

Both the nuclear number ( $P < 0.05$ ) and diameter of blastocysts ( $P < 0.01$ ) developed from blastomeres were significantly affected by the origin of blastomeres. The nuclear number of blastocysts developed from 1/2, 1/4, and 1/8 blastomeres ranged  $29.3 \pm 1.6$ ,  $24.5 \pm 1.3$ , and  $20.0 \pm 1.2$ , respectively. And the diameter of those blastocysts was  $88.3 \pm 2.4$ ,  $57.6 \pm 2.1$ ,  $39.8 \pm 1.9 \mu$ m, respectively.

#### I. 서론

Nicholas와 Hall(1942)이 흰쥐의 2세포기 배에서 분리된 분리할구가 발생의 전능성을 가지고 있음을 확인한 이래 분리할구의 착상전 발생에 관한 연구가 활발하게 수행되어 왔다. Tarkowski와 Wroblewska(1967)는 생쥐 4세포기와 8세포기 배에서 분리된 할구의 40%와 15%가 각각 배반포까지 발달하였음을 보고하였고, Fiser와 Macpherson(1975)은 생쥐 2세포기 및 4세포기 배에서 얻어진 분리할구를 체외배양한 결과 44.6% 및 34.9%가 각각 배반포로 발달하였

다고 하였다. 또한 Nagashima 등(1984)과 김 등(1986)은 생쥐의 상실배를 양분한 후 체외배양한 결과 각각 79.5% 및 75.0% 배반포로 발달하였다고 보고하였다. 정 등(1988)은 pronase처리 생쥐 2, 4, 8세포기 배의 분리할구를 체외 배양하여 64.7%~87.1%를 배반포까지 발달시켰다고 하였다.

이처럼 분리할구의 발생능과 체외발달에 관하여 많은 검토가 이루어지고 있으며 최근에는 단위발생란과 배의 할구를 재조합하여 개체로의 발달 가능성을 시사하고 있다(이와 이, 1990). 그러나 이에 대한 지금까지의 연구는 주로 할구의 분리방법과 발달 가능성에

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

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

국한되었고(Nagashima와 Ogawa, 1981; Baker와 Shea, 1985; 윤 등, 1990) 체외발달의 증진이나 이식 후의 수태율, 생존율 등에 대해서는 대동물은 물론 실험동물에 있어서도 극히 제한적으로 연구가 이루어져 왔다. 따라서 분리할구의 이용성을 넓히기 위해서는 무엇보다도 체외배양을 통한 배발달 증진에 관한 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다.

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

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

ICR계통의 생쥐 4~6주령의 암컷과, 10~12주령의 수컷을 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 분리할구의 조작용 배양액으로는  $\text{NaHCO}_3$ 가 포함되어 있지 않는 대신 기본 배양액에 5.95 mg/ml의 HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid; Sigma, U.S.A.)가 첨가된 것을, 그리고 체외배양용 배양액으로는 기본 배양액에 2.11 mg/ml의  $\text{NaHCO}_3$ 가 함유된 것을 사용하였다.

모든 배양액은 제조시 0.2  $\mu\text{m}$  millipore filter로써 제균한 다음 4℃의 냉장고에 보관하면서 1주일 내에 사용하였는데 사용시 다시 millipore filter로써 제균하였다.

### 3. 배의 회수 및 할구의 분리

#### 1) 과배란 유도 및 수정

암컷 생쥐에 PMSG(Peamax, Japan) 5 IU를 주

사하고 48시간 후에 hCG(Sigma, U.S.A.) 5 IU를 동일한 방법으로 주사하여 과배란을 유도하였다.

수정을 위하여 hCG를 주사함과 동시에 수컷과 1:1의 비율로 하루 밤 동안 합사시켜 자연교미를 유도하였으며, 다음날 아침 질전 유무를 확인하여 질전이 형성되어있는 개체만을 골라 실험에 사용하였으며 질전이 확인된 날을 수정 제1일로 정하였다.

#### 2) 배의 회수

각 발달 단계별 즉 2, 4, 8세포기의 배를 회수하기 위하여 hCG주사 후 44~45, 55~56, 65~66시간에 각각 생쥐를 경추탈구법으로 도살하여 난관을 적출한 다음 실체현미경하에서 끝이 무던 30  $\frac{1}{2}$  gauge 주사바늘을 사용하여 5.95 mg/ml의 HEPES가 함유된 BMOC-3(HEPES-BMOC-3)로써 난관을 관류하여 배를 회수하였다. 회수된 배는 HEPES-BMOC-3로써 3~4회 세척한 다음 정상적인 배만을 선별하여 실험에 사용하였다.

#### 3) 투명대 제거 및 할구의 분리

형태적으로 정상적인 배만을 골라 투명대를 연화시키기 위해 300 IU/ml의 pronase(Sigma, U.S.A.) 용액에 3~5분간 노출시켰다. 실체현미경 하에서 관찰하면서 투명대가 연화되었을 때 다른 신선한 용액으로 옮겨가며 4~5회 반복하여 세척하였는데 이때 투명대를 완전히 제거하지 않은 것은 할구에 대한 효소의 직접적인 영향을 피하기 위함이었다. 이어 할구의 분리를 위하여  $\text{Ca}^{2+}$ 과  $\text{Mg}^{2+}$ 이 함유되지 않은 D-PBS에 20~30분간 배양한 다음 HEPES-BMOC-3에서 다시 4~5회 세척하고, 세척시 pipetting조작을 약간 강하게 함으로써 잔존 투명대를 완전히 제거하였는데, 이 때 배로부터 대부분의 할구가 개별적으로 분리되었다. 분리되지 않은 할구에 대해서는 직경 10  $\mu\text{m}$ 이하의 미세 초자봉을 이용하여 물리적으로 분리하였다.

#### 4. 분리할구의 체외배양

세포외 기질 단백질이 분리할구의 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  $\mu\text{g}$ /ml 농도로 희석한 용

액을 배양접시당 200 ml씩 주입하여 공기중 실온에서 45분간 건조시켜 피복하고, gelatin은 증류수로써 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 M의 acetic acid로써 0.01% 용액으로 조제한 다음 실온에서 가끔 저어주면서 완전히 용해시켰다. 이어 0.2  $\mu$ m millipore filter로 여과한 다음 배양접시당 100  $\mu$ l씩 주입하여 실온과 자외선하에서 하루밤 방치시켜 건조시킨 후 배양접시를 증류수로써 세척하였다.

이어서 세포의 기질 단백질이 피복된 배양접시에 1.5 ml의 배양액을 넣고 liquid paraffin oil로써 피복한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기조건하에서 2시간 동안 평형시킨 뒤 15개 내외의 분리할구를 옮겨 37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기조건하에서 72시간 동안 배양하였다.

#### 5. 배반포로 발달한 분리할구의 핵 수와 직경의 측정

배반포로 발달한 분리할구의 핵 수의 측정은 Pusel 등(1985)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 2.3% sodium citrate dihydrate 0.75 ml과 ethanol 0.25 ml 및 1 mg/ml 농도의 hoechst 15  $\mu$ l를 혼합하여 조제한 형광 염색액을 매 실험시 마다 만들어 사용하였다. 먼저 silicon (Sigmacote, U.S.A.) 처리를 한 slide glass에 trypan blue 15  $\mu$ l를 떨어뜨려 소적을 만들어 배반포로 발달한 분리할구를 30~60초간 소적액내에 두었다가 내경이 분리할구보다 적은 피펫으로 trypan blue만 완전히 제거하였다. 이어 hoechst 염색액 15  $\mu$ l를 가하여 3~5분간 배양시킨 후 pippet으로써 형광 염색액만을 제거하여 곧 바로 polymount (Polyscience, U.S.A.) 15  $\mu$ l를 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 Package(Ecosoft Inc., 1984)를 사용하여 분리할구의 체외발달 성적은  $\chi^2$ -test를 실시하였고 배반포로 발

달한 분리할구의 핵 수 및 직경은 분산분석을 실시하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 세포의 기질 단백질이 분리할구의 체외발달에 미치는 영향

세포의 기질 단백질인 fibronectin, gellatin, collagen을 배양접시에 피복한 후 NaHCO<sub>3</sub>- BMOC-3 배양액으로 2, 4, 8세포기의 분리할구를 체외배양한 결과는 Table 1와 같다. Fibronectin, gelatin 그리고 collagen 처리구에서 2세포기의 분리할구는 각각 65.3, 59.2, 60.7%, 4세포기 분리할구는 각각 63.7, 53.4, 57.1%, 8세포기 분리할구는 각각 61.1, 52.3, 53.7%가 배반포로 발달하여 대조구에 비해 유의적 (P<0.01)으로 높은 발달율을 보였다. 세포의 기질 단백질 간에는 fibronectin 처리구가 gelatin 이나 collagen 처리구에 비해서 다소 좋은 성적을 보였으나 유의적 (P<0.05)인 차이는 없었다.

Armant 등(1986)은 fibronectin과 laminin이 피복된 배양접시에서 혈청이 함유되지 않은 CMRL 1066 배양액으로써 CF-1 계통 생쥐 배반포를 배양하면 배반포의 부착과 영양세포의 성장이 촉진된다고 하였으며, Wilton과 Trounson(1989)은 fibronectin, gelatin, laminin 등의 세포외 기질 단백질이 CBA×C57 제1세대 교잡종 생쥐 4세포기 분리할구의 체외 증식을 활발하게 하는데 그 중 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 gelatin 이 8, 16세포기 분리할구의 배반포로의 발달을 촉진하였는데 fibronectin 이 gelatin에 비해 보다 좋은 결과를 나타내었다고 하였다.

한편 생쥐 분리할구의 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 기질성분이 분리할구의 체외발달을 촉진하였으며 fibronectin 처리구가 gelatin 및 collagen 처리구에 비해 다소 좋은 성

**Table 1. *In vitro* development of isolated blastomeres in NaHCO<sub>3</sub>-BMOc-3 medium on extracellular matrix proteins**

Blastomeres isolated from	Treatment	No. of Blastomeres cultured	No. & (%) of blastomeres developed to	
			Morula	Blastocyst
2-cell embryos	Control	116	36(31.0) <sup>a</sup>	25(21.6) <sup>a</sup>
	Fibronectin	110	75(74.3) <sup>b</sup>	66(65.3) <sup>b</sup>
	Gelatin	103	73(70.9) <sup>b</sup>	61(59.2) <sup>b</sup>
	Collagen	107	75(70.1) <sup>b</sup>	65(60.7) <sup>b</sup>
4-cell embryos	Control	133	38(28.6) <sup>a</sup>	35(26.3) <sup>a</sup>
	Fibronectin	102	69(67.6) <sup>b</sup>	65(63.7) <sup>b</sup>
	Gelatin	103	63(61.2) <sup>b</sup>	55(53.4) <sup>b</sup>
	Collagen	112	70(62.5) <sup>b</sup>	64(57.1) <sup>b</sup>
8-cell embryos	Control	141	28(19.9) <sup>a</sup>	27(19.1) <sup>a</sup>
	Fibronectin	85	56(65.9) <sup>b</sup>	52(61.1) <sup>b</sup>
	Gelatin	86	51(59.3) <sup>b</sup>	45(52.3) <sup>b</sup>
	Collagen	82	51(62.2) <sup>b</sup>	44(53.7) <sup>b</sup>

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

적을 보임으로써 대체로 이들 연구자들의 보고와 일치하는 경향을 보였다.

Fibronectin 등의 세포의 기질 단백질이 어떠한 양식으로 작용하는지는 아직 불분명한데, 이들 세포의 기질 단백질이 배 세포막 표면부에서 발견되어지고 배양 섬유아세포의 세포막에 fibronectin과 laminin에 대한 수용체가 존재한다는 보고(Armant, 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 세포의 기질 성분의 작용은 분리할구로부터 단백질과 같은 물질을 분비시키거나 배양액으로부터 분리할구로 어떤 물질을 이동시킴으로써 분리할구의 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.

## 2. 분리할구로 부터 발달한 배반포의 핵 수와 직경

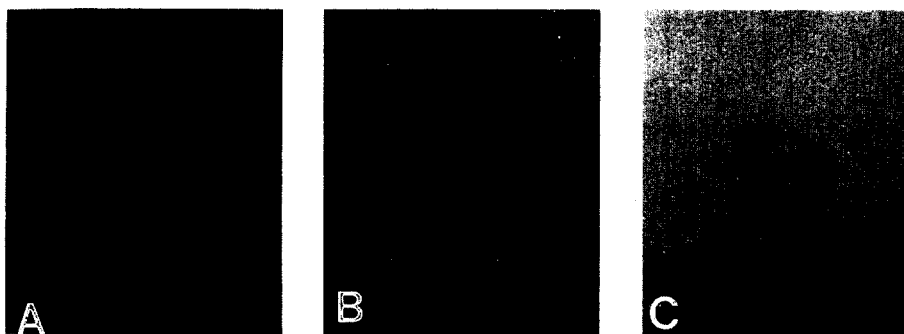
세포의 기질 단백질이 처리된 배양접시에서 2, 4, 8 세포기 분리할구로 부터 발달한 배반포의 핵 수와 직경을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 처리된 세포의 기질 단백질의 종류에 따른 차이는 없었으나 2, 4, 8 세포기 분리할구로 부터 발달한 배반포의 핵 수는 각각  $29.3 \pm 1.6$ ,  $24.5 \pm 1.3$ ,  $20.0 \pm 1.2$ 개, 직경은 각각  $88.3 \pm 2.4$ ,  $57.6 \pm 2.1$ ,  $39.8 \pm 1.9 \mu\text{m}$ 로 나타나 배양전의 분리할구의 기원에 따라 배반포의 핵 수 ( $P < 0.05$ )와 직경 ( $P < 0.01$ )에 유의적인 차이가 있었다.

생쥐 분리할구로 부터 발달한 배반포의 핵 수와 직경에 관해서는 선행 연구를 찾아 볼 수 없고 생쥐 핵 이식란에서 이러한 연구가 일부 이루어져 왔다. Robl 등(1986)은 탈핵한 2세포기의 수핵란에 2, 8세포기의 핵을 이식하여 66시간 동안 체외배양을 실시하여 배반포로 발달한 배의 핵 수는 각각  $39 \pm 4$ ,  $25 \pm 4$ 개 였다고 하였고, Kono와 Tsunoda(1989)도 4, 8세포기의 공핵란을 이식받은 배를 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 이식한후 배반포로 발달시켜 핵 수와 직경을 측정된 결과 세포기에 따라 핵 수는 33.1

**Table 2. The nuclear number and diameter of blastocyst developed *in vitro* from 1/2, 1/4, and 1/8 blastomeres**

Blastomeres isolated from	No. of blastocysts stained	No. of nuclei Mean $\pm$ S. E.	Diameter of blastocysts( $\mu$ m) Mean $\pm$ S. E.
2-cell embryos	40	29.3 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>	88.3 $\pm$ 2.4 <sup>C</sup>
4-cell embryos	42	24.5 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	57.6 $\pm$ 2.1 <sup>B</sup>
8-cell embryos	43	20.0 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	39.8 $\pm$ 1.9 <sup>A</sup>

Mean  $\pm$  S. E. with different small ( $P < 0.05$ ) and capital ( $P < 0.01$ ) superscripts in the same column are significantly different.



**Fig. 1. Blastocysts developed *in vitro* from blastomeres isolated from 2-cell(A), 4-cell(B), and 8-cell(C) embryos ( $\times 200$ ).**



**Fig. 2. Fluorescent staining of blastocysts developed *in vitro* from blastomeres isolated from 2-cell (A), 4-cell(B), and 8-cell(C) embryos ( $\times 200$ ).**

$\pm 1.2$ ,  $27.5 \pm 1.8$ ,  $24.0 \pm 1.3$ 개, 직경은 각각  $100.7 \pm 1.1$ ,  $97.9 \pm 1.9$ ,  $102 \pm 2.1 \mu$ m로 나타나 핵 수는 세포기에 따라 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이가 있었으나 직경은 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이가 없었다고 하여 핵 수에서는 본 연구의 결과가 일치한다.

한편 돼지 4~6세포기 분리할구가 배반포로 발달하

였을 때의 핵 수는 정상 배반포의 핵 수인 G정도였다는 본 연구의 결과와 일치되는 보고(Moore, 1969)가 있는데, 일반적으로 세포기가 늦은 배로부터 얻은 분리할구는 체외에서 배반포까지의 발달은 가능하나 세포수의 부족으로 인하여 이식 후 착상이 어려운 것으로 생각된다.

#### IV. 적 요

세포의 기질 단백질인 fibronectin, gellatin 및 collagen이 생쥐 2, 4, 8세포기 배로 부터 유래한 분리할구의 체외발달에 미치는 영향을 밝히기 위하여 이들 세포의 기질 단백질을 피복한 배양접시에서  $\text{NaHCO}_3$ -BMOC-3 배양액으로 분리할구들을 체외 배양한 결과는 다음과 같다.

세포의 기질 단백질은 그들 종류간에는 차이가 없이 생쥐 분리할구의 체외발달을 대조구에 비해 유의적 ( $P < 0.01$ )으로 촉진하였는데 fibronectin, gellatin 및 collagen 처리구에서 2세포기 분리할구 중 각각 65.3, 59.2, 60.7%가, 4세포기 분리할구 중 각각 63.7, 53.4, 57.1%가 그리고 8세포기 분리할구 중 각각 61.1, 52.3, 53.7%가 배반포로 발달하였다.

또한 배반포로 발달한 분리할구의 핵 수와 직경에서는 처리된 세포의 기질 단백질의 종류에 따른 차이는 없었으나 2, 4, 8세포기 분리할구로 부터 발달한 배반포의 핵 수는 각각  $29.3 \pm 1.6$ ,  $24.5 \pm 1.3$ ,  $20.0 \pm 1.2$ 개로, 직경은 각각  $88.3 \pm 2.4$ ,  $57.6 \pm 2.1$ ,  $39.8 \pm 1.9 \mu\text{m}$ 로 나타나 배양전 분리할구의 기원에 따라 배반포의 핵 수( $P < 0.05$ )와 직경( $P < 0.01$ )에 유의적인 차이가 있었다.

#### V. 인용문헌

1. Armant, D. R., H. A. Kaplan and W. J. Lennarz. 1986. Fibronectin and laminin promote *in vitro* attachment and outgrowth of mouse blastocysts. *Dev. Biol.* 116:519~523.
2. Baker, R. D. and B. F. Shea. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenol.* 23(1):3~12.
3. Fiser, P. S. and J. W. Macpherson. 1975. Development embryonic structures from isolated mouse blastomeres. *Can. J. Anim. Sci.* 56:33~36.
4. Kono, T. and Y. Tsunoda. 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.
5. Moor, N. W., C. Polge and L. E. A. Rowson. 1969. The survival of single blastomeres of pig eggs transferred to recipients gilts. *Aust. J. Biol. Sci.* 22:979~982.
6. Nagashima, H., K. Matsui, T. Sawaski and Y. Kano. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morula. *J. Reprod. Fert.* 70:357~362.
7. Nagashima, H. and S. Ogawa. 1981. Studies on the developmental potential and survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 27:12~19.
8. Nicholas, J. S. and B. V. Hall. 1942. Experiments on developing rats II. The development of isolated blastomeres and fused egg. *J. Exp. Zool.* 90:441~459.
9. Nieder, G. L. 1990. Protein secretion by the mouse trophoblast during attachment and outgrowth *in vitro*. *Biol. Reprod.* 43:251~259.
10. Pursel V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad, Jr., R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenol.* 24:687~700.
11. Robl, J. M., B. Gilligan, E. S. Cristser and N. L. First. 1986. Nuclear transplantation in mouse embryos: assessment of recipient cell stage. *Biol. Reprod.* 34:733~739.
12. Saito, S. and H. Niemann. 1991. Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.* 44:927~936.
13. Tarkowski, A. K. and J. Wroblewska. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morph.* 18:155~180.
14. Wilton, L. J. and A. O. Trounson. 1989. Bi-

- opsy of preimplantation mouse embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. Biol. Reprod. 40:145~152.
15. 김남형, 정길생, 노환철, 백운화, 이경광. 1986. 생쥐 수정란의 양분에 의한 일란성 쌍태의 생산. 한국축산학회지. 28:527~534.
  16. 박희성, 이효중, 최상용, 박충생. 1990. 생쥐 수정란의 핵이식 후 체외발달에 관한 연구. 한국가축번식학회지. 14:205~211.
  17. 정덕수, 이상진, 정길생. 1988. 생쥐배 분할구의 *in vitro* 발달에 관한 연구. 한국가축번식연구회보. 12:132~140.
  18. 이철상, 이경광. 1990. 생쥐 8세포기 할구의 발생능. 한국축산학회지. 32(3):131~138.
  19. 윤창현, 강대진, 박충생, 민관식, 오석두, 이은봉. 1990. 생쥐 초기배의 분리 할구와 분할배의 체외배양. 한국축산학회지. 32(2) :781~784.