

생쥐 초기 배아의 'In Vitro 2-Cell Block' 현상에 관한 연구

I. 2-Cell Block 소멸시기에 관하여

김 해 권 · 공 희 숙 · 조 완 규  
(서울대학교 자연과학대학 동물학과)

Studies on the 'In Vitro 2-Cell Block' Phenomenon of the  
Mouse Early Embryos

I. On the timing of the release from 2-Cell Block

Hae Kwon Kim, Hui Sook Kong and Wan Kyoo Cho  
(Department of Zoology, Seoul National University)  
(1985. 8. 20. 접수)

---

ABSTRACT

In order to investigate the 'In Vitro 2-Cell Block' phenomenon found in certain mouse strains such as ICR, the present studies have been done.

Fertilized eggs (1-cell) and 2-cell embryos recovered from the oviducts of the ICR mouse at the various time intervals after hCG injection to induce ovulation were cultured for 3 or 4 days to examine the capability for further cleavage beyond 2-cell stage. Consequently, it was found that some proportions of the 1-cell or 2-cell embryos recovered at 30 hours post hCG showed their cleaving capability and if the embryos were obtained after 48 hours of hCG injection, they were all at 2-cell stage and most of them developed to the blastocysts *in vitro*. It was also found that the embryos obtained at 27 hours post hCG showed their stronger capacity of further development in the groups cultured for shorter period than 24 hours *in vitro* before transferring to the oviduct.

Based on the results, it can be inferred that mouse fertilized eggs should be remained inside the oviduct for a certain length of period after fertilization, or they should be cultured for a short period than 12 hours before returning back to the oviduct in order to develop to blastocysts.

---

본 연구는 1983년도 문교부 기초과학육성연구비의 지원에 의한 것임.

It was also found that though the embryos under the 2-cell block in culture showed normal feature up to 24 hours under the microscopical observation, they had already lost their capacity for the normal development, and if the culture of the 2-cell embryos was extended to 48 hours, they showed nuclei with heteropyknosis, and the vacuoles were detected in the cytoplasm of embryonic cell if they were cultured for 72 hours.

## 서 론

Whitten (1956)에 의해 생쥐 초기 배아의 체외 배양이 가능하게 된 이래로 많은 사람들이 인간을 포함한 각종 포유동물의 난자 및 초기배아를 재료로 하는 연구를 해왔고, 이와 함께 체외 배양시 요구되는 적절한 배양조건에 관한 연구도 많은 진전을 보았다. 그러나 아직까지도 체외 및 체내에서 수정된 난자를 체외에서 배양할 경우, 자궁에 착상하기 전의 단계인 배낭으로의 발생을 진행할 수 있는 동물의 종류는 사람, 토끼 등 4~5종에 불과하다 (Brackett, 1981).

"Intermitotic 2-Cell Block"으로 알려진 (Biggers, 1971) 생쥐 초기 배아의 불완전한 체외 발생 현상은, late 2-cell embryo를 체외 배양할 경우 정상적인 배낭으로의 발생을 진행하지만 (Whitten, 1957) 수정란을 배양하면 2 세포기에서 발생을 중지하는 (Whittingham and Biggers, 1967) 현상으로써 만일 수정란 혹은 early 2-cell embryo를 수란관에 넣어 이들을 함께 기관배양할 경우에는 배낭을 얻을 수 있으며, 수란관 중에서도 특히 ampullar region에서 발생이 가능하다고 알려져 있다 (Pavlok; 1967; Whittingham, 1968).

비록 C57BL 등 몇몇 strain의 F<sub>1</sub> hybrid로부터 얻은 수정란은 배낭으로의 발생을 진행하나 (Whitten and Biggers, 1968; Biggers, 1971), 대부분의 Swiss albino의 경우에 나타나는 이러한 현상의 원인은 아직 밝혀져 있지 않고 다만 불완전한 배양조건에 의한 것으로만 추측이 되고 있다 (Whittingham, 1975).

이를 규명하기 위한 몇몇 연구에 의하면, 배양액에 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)를 첨가함으로써 block현상을 다소 회복시킬 수 있었다는 보고 (Abramczuk *et al.*, 1977)가 있으나 배양액내에서의 EDTA의 역할은 밝혀지지 않고 있으며, 또한 근래에 와서 non-blocking strain embryo의 cytoplasm을 blocking strain embryo에 이식하거나 (Muggleton-Harris *et al.*, 1982) 두 strain의 난자를 융합시켜 단위발생을 시켰을 때 (Gulyas *et al.*, 1984) 이들 egg의 배낭까지의 발생이 진행되는 점으로 미루어 유전물질에 의한 vital component가 이러한 block현상과 관계 있을 것으로 여겨지지만 한편으로는 배양시 요구되는 essential requirements (McLaren, 1982)의 결핍 혹은 'culture-induced cytoplasmic defect'에 의한 가능성 (Goddard and Pratt, 1983)도 배제할 수 없다.

따라서 본 연구는 'In Vitro 2-Cell Block' 현상의 원인을 규명하기 위한 연구의 일환으로 먼저 이러한 현상이 소멸되는 정확한 시기와 'block'에 걸린 배아세포의 구조를 살펴보고 아울러 'block'에 걸린 배아의 발생재개 능력을 조사할 목적으로 수행되었다.

### 실험재료 및 방법

본 실험에 사용된 쥐는 서울대학교 동물사육장에서 사육된 생쥐 ICR Strain이다.

생후 2개월된 생쥐 암컷의 복강에 PMSG 및 hCG (Sigma)를 각각 5 I.U.씩 48시간 간격을 두고 오후 1시에 주사하여 다배란을 유도한 후 수컷과 합사시키고, 다음날 아침 copulation plug가 관찰된 암컷을 분리시켜 필요한 기간동안 사육한 후 사용하였다.

1 세포기 및 2 세포기 배아는 생쥐 암컷을 경추파열로 도살한 후 양쪽 수란관을 빼내어 해부현미경 아래에서 나팔관의 한쪽 끝에 30 gauge needle (Hamilton)을 삽입하여 기본 배양액 0.5 ml을 넣어서 씻어내리는 방법으로 얻었다. 적출한 배아는 필요한 경우 hyaluronidase (Sigma)가 들어있는 배양액 내에 2~3분간 머물러 있게 하여 cumulus cell을 제거한 후, 기본 배양액이 들어있는 petri dish에 옮겨 서너번 씻은 다음 개체 및 발생단계별로 구분하여 Paraffin oil drop method (Brinster, 1963)로 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기 내에서 4일 동안 배양하고 그 결과를 해부 현미경으로 관찰하였다. 24, 48 및 72시간이 경과하여도 발생이 진행되지 않은 2 세포기 배아는 acetic acid와 alcohol로 고정하고 lacmoid로 염색하여 위상차현미경으로 구조를 관찰하였다. 한편 발생 재개 능력을 알아보기 위한 실험에서는, hCG주사 후 27시간째 되는 시각에 임신한 암컷의 나팔관을 씻어내려 얻은 수정란을 2, 6, 12, 18 및 24시간동안 배양한 후 동일한 조건을 갖춘 수란관에 각각 5개씩 이식시켜 3일 동안 기관배양하고 이들을 다시 씻어내려 oil drop method로 1일동안 배양한 후 해부 현미경으로 그 결과를 관찰하였다.

수정란 이식에 사용된 수란관은 각각의 수정란을 이식시키기 27시간 전에 암컷의 복강에 PMSG-primed hCG를 주사한 후, 2시간 전에 수란관을 절제하여 예리한 핀셋으로 지방조직을 제거하고 uncoiling을 한 후 미수정란을 제거하고 1시간 반 동안 pre-equilibration을 시킨 후 수정란을 넣어 Organ culture method (Jensen *et al.*, 1964)로 배양하였다. 기본 배양액으로는 Modified Krebs-Ringer bicarbonate solution을 사용하였고, hyaluronidase (Sigma)는 polyvinyl-pyrrolidone (PVP, Sigma) 200 mg과 함께 20 ml의 Dulbecco's phosphate buffered saline에 녹여 300 U.S.P./ml이 되게 하여 사용하였으며, 수란관은 medium 199 (Gibco)에 0.4%의 BSA (Sigma)를 첨가한 배양액 내에서 배양하였다. 모든 배양액은 사용전에 millipore filter (pore size; 0.45  $\mu$ m)로 멸균하였고 초자 기구는 진열 혹은 고압 멸균기로 멸균하였다. Embryo 배양을 위한 culture dish는 Falcon dish No. 1008을, oviduct의 배양에는 Falcon dish No. 1007을 사용하였다.

### 결 과

HCG주사 후 28~49시간까지의 22시간을 Table 1에서와 같이 8군으로 나누어 생쥐 75개 체로부터 얻은 수란관 내의 egg의 배발생상태를 각 군별로 조사한 결과 28~29시간에 얻은 egg중 2세포기 배아는 16.3%, 30~32시간에는 46.0%였으나, 33~35시간 이후에 회수하면 2세포기 배아의 비율이 거의 86%~99%에 이르고 있다. 이들 중 28~29시간에 얻은 1세포기 배아를 3일간 배양하였을 때 2세포기로 발생한 egg는 78.9%였고, 30~32시간

**Table 1.** Development of ICR mouse 1- and 2-cell embryos *in vitro* in relation to the time of removal of the embryos from the oviducts post hCG.

Hours Post hCG	No. of animals examined	No. of *2CE/ No. of eggs recovered	No. of *2CE developed/ No. of *1CE	No. of *Bla developed/No. of 2CE at recovery
28~29	6	21/129(15.3)	85/108(78.7)	0/ 21 (0)
30~32	9	64/ 13(46.0)	49/ 75(65.3)	9/ 64(12.5)
33~35	9	202/225(89.8)	2/ 23 (8.7)	23/202(11.4)
36~38	9	272/302(90.1)	3/ 30(10.0)	37/272(13.6)
39~41	10	281/294(95.6)	4/ 13(30.8)	112/281(39.9)
42~44	17	351/406(86.5)	2/ 55 (3.6)	234/351(66.7)
45~47	9	158/183(86.3)	2/ 25 (8.0)	133/158(84.2)
48~49	6	129/130(99.2)	0/ 1 (0)	125/129(96.9)

\* 1CE, 1-cell embryos; 2CE, 2-cell embryos; Bla, blastocysts

Values in parentheses are percentages.

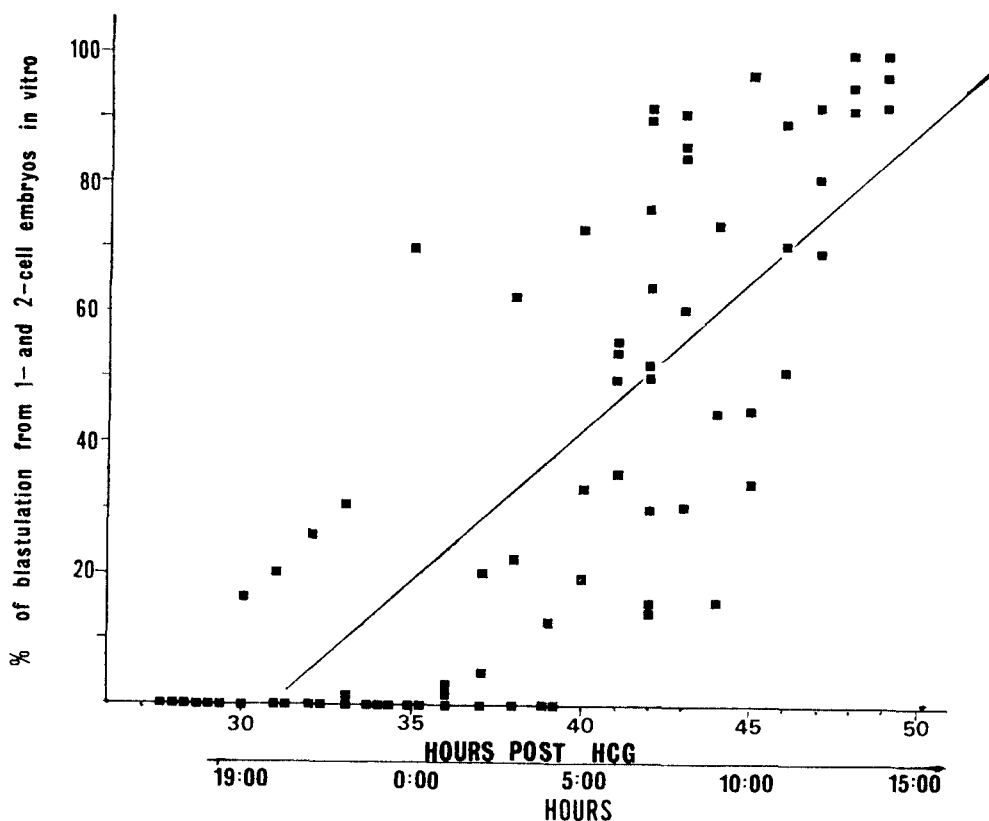
Number of 2-cell embryos was obtained after 3 day culture of 1-cell embryos, and number of blastocysts was obtained after 4 day culture of 2-cell embryos.

의 경우에는 65.3%였으며 이후의 시간에 얻은 1-cell egg들이 2세포기 배아가 되는 비율은 약 10% 정도로 크게 감소되었다 (Table 1). 그러나 1세포기 배아가 배양을 통하여 2세포기의 배아가 된 것들은 어느 하나도 배낭으로 발생하지는 못하였다.

한편, 수란관에서 회수할 때 얻은 2세포기 배아의 배양을 통한 발생능력을 조사한 결과, hCG주사 후 28~29시간이 지나서 얻은 2세포기 배아는 체외에서 배양하더라도 배낭으로 자라지 않았으나, 30~32시간이 지난 개체로부터 얻은 2세포기 배아중 12.5%가 배낭으로 발생하였고 그 시간이 길어짐에 따라, 이들 2세포기 배아의 배낭 발생율은 점차 증가하여 48시간이 지나서 수란관으로부터 회수한 2세포기 배아는 거의 모두가 체외에서 배낭(96.9%)으로 발생하였다 (Table 1). 이들 배아의 배낭으로의 발생율과 hCG 주사후의 시간 즉, 수정란이 모체내에 체류한 시간과의 관계는 개체차가 있긴 하지만 대체로 서로 비례하는 것으로 나타났다 (Figure 1).

한편 hCG 주사 후 27시간이 지난 뒤 수란관으로부터 얻은 수정란을 2시간 내지 24시간을 배양하고 다시 이들을 수란관에 이식하여 수란관 내에서의 발생 여부를 조사한 결과를 Table 2에 실었다. 대체로 2 혹은 6시간을 배양하면 수정란은 그대로 1세포기 배아로 남아 있으며 이들을 다시 수란관에 옮겨서 72시간을 기관배양하고 다시 수란관 밖으로 적출하여 24시간을 배양하면 배낭까지 발생하는 것이 54%와 32.7%가 된다. 만일 수란관으로부터 적출한 수정란을 12시간 배양하면 대부분이 2세포기 배아가 되며 이것들을 수란관에 옮겨 넣고 72시간을 배양한 뒤 다시 수란관 밖에서 24시간을 배양하면, 15.1%가 배낭으로 발생하고 만일 수란관에 옮겨 넣기 전 18, 24시간을 배양한 2세포기 배아는 각각 2.1%, 2%가 배낭까지 발생할 수 있었다. 즉, 배아가 수란관으로부터 벗어나 체외에서 보내는 시간이 길어질 수록 배낭으로 발생할 능력은 감소한다는 것을 알 수 있다 (Table 2).

또한 'In Vitro 2-Cell Block'에 걸린 배아의 세포질 내의 구조상의 이상 유무를 밝히기 위하여 위상차 현미경으로 관찰한 결과 배양 후 24시간이 경과할 때까지는 핵상과 세포질



**Fig. 1.** Percentages of blastocysts developed from ICR mouse 1- or 2-cell embryos which were harvested from the oviducts at different hours post hCG. The embryos were cultured for 4 days. Each point represents the data for an individual donor. The straight line was drawn by straight-line regression,  $Y = -146 + 4.7X$ .

**Table 2.** Developmental capacities of the ICR mouse 1- or 2-cell embryos recovered from the oviduct at 27 hour post hCG in relation to the length of pre-culture period before returning back to the fresh oviducts.

Hours of pre-culture	Cell stage at transfer	No. of eggs recovered	*No. of blastocysts developed	% of blastulation
2	1-cell	50	27	54
6	1-cell	52	17	32.7
12	2-cell	53	8	15.1
18	2-cell	48	1	2.1
24	2-cell	51	1	2

All embryos after pre-culture were transferred into the oviducts and were set for 72 hours in organ culture, then culture of the embryos for additional 24 hours outside of the oviduct was followed by the oil drop method. For details, see Materials and Methods.

\* Number of embryos which developed to blastocysts after additional 24 hours culture.

The above results were obtained by pooling of 3 repeated experiments.

의 형태가 대조군의 것과 별 차이가 없었으나 (Figure 2-a, b) 48시간이 지나면 핵의 이상 응축 (Nuclear Heteropyknosis) 현상이 나타나며 (Figure 2-c, b) 배양 후 72시간이 경과한 2세포기 배아의 세포질에서는 공포가 발견되었다 (Figure 2-e, f). 이로 보아 체외에서 24시간까지 배양된 2세포기배아는 외견상 별 이상이 없다고 하더라도 이미 그 이전에 정상 발생 능력을 잃고 있다는 것을 알 수 있다.

## 고 찰

본 실험의 결과 ICR 생쥐에서는 hCG 주사 후 30~32시간이 지나면 2세포기 배아가 전체의 45%, 33~35시간이 지나면 90%에 달한다. 생쥐는 일반적으로 hCG 주사 후 약 13시간이 경과했을 때 수정이 일어난다 (Rafferty, 1970)고 하는 보고를 근거로 한다면, ICR 생쥐의 난자는 수정 후 17~22시간 (hCG 주사 후 30~35시간)에 제 1차 분할이 일어나므로, 생쥐의 다른 계통인 경우 수정 후 제 1차 분할까지 20~26시간 (Shire and Whitten, 1980)이 걸리는 것보다 비교적 빨리 일어난다.

본 실험에 사용된 배양액 (Standard Egg Culture Medium, SECM; Biggers *et al.*, 1971) 내에서는 330개의 수정란중 147개가 2세포기 배아로 발생하였으나 그 중 어느 하나도 배낭으로까지 발생하지 못하였는데, 이러한 결과는 C57BL strain과 DBA strain의 배아를 동일한 배양액 내에서 배양하였을 때 각각 4.2% 및 0%의 배낭 발생율을 얻은 결과 (Biggers, 1971)와 유사하다. 그러나 Abramczuk *et al.* (1977)이 HEPES-buffered Whitten's medium을 사용하여 C57BL strain의 경우 15~72%, ICR의 경우 20~44% 및 BALB/C의 경우 0~27%의 발생율을 얻은 결과 (Abramczuk *et al.*, 1977)와는 상당한 차이를 보인다. 이런 점으로 미루어 생쥐 초기 배아의 발생 능력은 생쥐계통과 배양액의 조성에 크게 영향을 받는다고 생각된다.

HCG 주사 후 41시간에 회수하여 배양한 2세포기 배아는 50%가, 그리고 48시간 후 모체의 수란관에서 회수한 2세포기 배아는 거의 모두가 배낭으로 발생할 수 있는 것으로 보아, 2-cell block 현상은 비록 개체별로 심한 편이로 보이고 있으나 대체로 모체의 수란관 내에 체류한 시간이 길어질수록 소멸된다는 것을 알 수 있다. 그러나 42시간이 지난 후 수란관에서 회수한 수정란은 배양기간동안 2세포기의 배아로 발생하지만 그 이후 발생은 일어나지 않아 배낭에 이르지 않았다. 이러한 결과로 보아 생쥐 2세포기 배아가 정상적으로 체외 발생을 가능하게 하는 요인이 수란관에 존재할 것으로 여겨지며 특히 2세포기 후기의 배아가 이러한 환경의 혜택을 얻어 발생할 수 있을 것으로 보여진다.

“*In Vitro* 2-Cell Block”에 걸린 2세포기 배아는 24시간이 경과할 때까지는 외견상 핵과 세포질이 정상이지만 48시간이 지나면 핵은 이상응축하고 세포질에는 다수의 공포가 발견되는 등 이상현상을 나타내는 것으로 보아 이미 이 때의 배아들은 정상적인 발생능력을 상실한 것이라 볼 수 있다. 그러나 체외에서 18시간 이상을 보낸 2세포기 배아는 비록 그 외견이 정상적이라 하더라도 다시 수란관에 이식하였을 때 배낭으로까지 발생하는 비율은 낮은 것이다. 이런 점으로 보아 48시간까지 2세포기 배아가 정상을 유지하며 발생 정지 상태에 있다는 주장 (Goodard and Pratt, 1983)과는 달리 18시간 후 체외에서 배양된 2세포 배아는 이미 퇴화 과정에 들어가고 있다고 할 수 있다. 체외 배양의 연장으로 인한 퇴화현상에

대해서는 hamster를 재료로 한 최근의 연구 결과에서도 보고되고 있다 (Farrell and Bavister, 1984). 다만 hamster의 2세포기 배아의 경우에는 체외 배양 시간이 1시간 이상일 경우에는 2-cell block 현상이 일어나서 배 발생 능력이 상실되는 것으로 알려져 있어서 본 실험에 있어서의 생쥐 배아와 같이 12시간을 배양하여도 배 발생 능력을 가지는 것과는 상당한 차이를 보여준다.

수정란의 정상 배 발생을 가능하게 하는 수란관 내의 요인에 관해서는 현재까지 별로 밝혀진 바가 없으나 다만 수란관의 점막상피 세포의 분비물질의 작용에 의할 것이라는 보고 (Pauerstein and Eddy, 1979)가 있을 뿐이다.

결국 “*In Vitro* 2-Cell Block”현상의 기작을 밝히기 위하여는 첫째 수정란의 체외 배 발생에 영향을 줄 배양액내 구성 성분의 분석이 바람직하며 또한 “*In Vitro* 2-Cell Block”이 없이 배 발생이 가능한 생쥐의 계통 또는 F<sub>1</sub>잡종에 대한 유전학적인 연구와 수란관의 영향 (McLaren, 1981)에 관한 연구가 행해져야 할 것이다.

## 요 약

특정 계통의 생쥐 초기 배아의 체외 배양때에 나타나는 “*In Vitro* 2-Cell Block” 현상을 규명할 것을 목적으로 하고 본 실험이 행해졌다. 먼저 이 현상이 발생하는 ICR 계통의 생쥐의 수정란 또는 2세포기의 배아를 일정시간 대(배란을 유도하기 위한 hCG주사시간을 기준)를 두고 수란관으로부터 회수한 뒤 이를 3~4일간 배양하면서 배낭으로까지의 발생능력을 알아보았다. 그 결과 hCG주사 후 약 30시간이 지난뒤 수란관에서 회수한 수정란이나 2세포기의 배아의 일부가 배낭으로까지 발생하였으며 만일 48시간이 지나면 수란관 내에서 회수된 배아는 대부분이 2세포기 배아이며 이것들은 거의가 배낭으로 발생하였다.

HCG주사 후 27시간이 지난 수란관으로부터 회수한 수정란을 2시간에서 24시간을 배양한 뒤 이들을 다시 수란관에 이식하여 기관배양법에 의해 72시간 배양하고 다시 수란관 밖에서 배아를 24시간 배양해 본 결과, 배아들이 수란관 밖의 환경에서 배양된 시간이 길수록 이것들을 다시 수란관내에 되돌려 준다 하더라도 배낭으로까지 발생할 능력을 크게 상실하였다. 이같은 실험 결과로 보아 생쥐의 수정란이 “2-Cell Block” 현상을 극복하기 위해서는 수정후 일정시간 이상을 수란관이라는 환경내에 머물러 있어야 한다는 것을 알게 되었다. 즉, 배아는 수란관에 오래 머물러 있을수록, 그리고 수란관으로부터 축출되더라도 다시 수란관으로 돌려보내질 때까지 밖에 머물러 있는 시간이 짧을 수록, 수정란 혹은 2세포기 배아의 배낭으로의 발생능력은 정상에 가깝게 유지되는 것이다.

“2-Cell Block”에 걸려있는 2세포기의 배아는 배양 후 24시간까지는 광학현미경적인 관찰 결과 정상적인 형태를 보여주고 있었으나 48시간이 되면 핵의 이상응축이 나타나며 72시간이 경과하면 세포질 내에 비정상적인 공포들이 나타나고 있었다.

## REFERENCES

- Abramczuk, J., D. Solter and H. Koprowski, 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Devel. Biol.* 61:378-383.

- Biggers, J.D., 1971. New observations on the nutrition of the mammalian oocyte and the preimplantation embryo. *In: The Biology of the Blastocyst* (Blandau R.J., eds.). Univ. Chicago Press, Chicago, pp. 319-327.
- Biggers, J.D., W.K. Whitten and D.G. Whittingham, 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. *In: Methods in Mammalian Embryology* pp. 86-116.
- Brackett, B.G., 1981. *In vitro* culture of the zygote and embryo. *In: Fertilization and Embryonic Development In Vitro* (Mastroianni, L. Jr. and J.D. Biggers, eds.). Plenum Press, New York, pp. 61-79.
- Brinster, R.L., 1963. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp. Cell Res.* 32:205-208.
- Farrell, P.S. and B.D. Bavister, 1984. Short-term exposure of two cell hamster embryos to collection media is detrimental to viability. *Biol. Reprod.* 31:109-114.
- Goddard, M.J. and H.P.M. Pratt, 1983. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block'. *J. Embryol. Exp. Morph.* 73:111-133.
- Gulyas, B.J., M. Wood and D.G. Whittingham, 1984. Fusion of oocytes and development of mouse oocyte fusion products in the mouse. *Devel. Biol.* 101:246-250.
- Jensen, F.C., R.B.L. Gwatkin and J.D. Biggers, 1964. A simple organ culture method which allows simultaneous isolation of specific types of cells. *Exp. Cell Res.* 34:440-447.
- McLaren, A., 1981. Analysis of maternal effects on development in mammals. *J. Reprod. Fert.* 62: 591-596.
- McLaren, A., 1982. The embryo. *In: Reproduction in Mammals* (Austin, C.R. and R.V. Short, FRS, eds.). Cambridge Univ. Press, London, pp. 1-25.
- Muggleton-Harris, A.L., D.G. Whittingham and L. Wilson, 1982. Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse. *Nature* 299:460-462.
- Pauerstein, C.J. C.A. Eddy, 1979. The role of the oviduct in reproduction; our knowledge and our ignorance. *J. Reprod. Fert.* 55:223-229.
- Pavlok, A., 1967. Development of mouse ova in explanted oviducts: fertilization, cultivation, and transplantation. *Science* 157:1457-1458.
- Rafferty, K.A. Jr., 1970. *In: Methods in Experimental Embryology of the mouse*. Johns Hopkins Press, London, pp. 4-5.
- Shire, J.M. and W.K. Whitten, 1980. Genetic variation in the timing of the first cleavage in mice: effect of maternal genotype. *Biol. Reprod.* 31:109-114.
- Whitten, W.K., 1956. Culture of mouse ova. *Nature* 177:96-98.
- Whitten W.K., 1957. Culture of tubal ova. *Nature* 179:1081-1082.
- Whitten, W.K. and J.D. Biggers, 1968. Complete development *in vitro* of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.* 17:399-401.
- Whittingham, D.G., 1968. Development of zygotes in cultured mouse oviducts.: I. The effects of varying oviductal conditions. *J. Exp. Zool.* 169:391-397.
- Whittingham, D.G., 1975. Fertilization, early development and storage of mammalian ova *in vitro*. *In: The Early Development of Mammals* (Balls, M. and A.E. Wild, eds.). Cambridge Univ. Press, London, pp. 1-24.
- Whittingham, D.G. and J.D. Biggers, 1967. Fallopian tube and early cleavage in the mouse. *Nature* 213:942-943.



**Fig. 2.** Phase contrast micrographs of mouse 2-cell embryos collected from the oviducts at 30 hours post hCG (1,100 $\times$ ).

- a. Freshly collected 2-cell embryos. Short arrows indicate the normal nuclei of each blastomeres and long arrows indicate several nucleoli.
- b. 2-Cell embryos cultured *in vitro* for 24 hours, showing normal appearance as in a.
- c, d. 2-Cell embryos cultured *in vitro* for 48 hours. Arrows indicate the heteropyknotic nuclei in blastomeres.
- e, f. 2-Cell embryos cultured *in vitro* for 72 hours. Short arrows indicate condensed nuclei. Long arrows indicate the abnormal cytoplasmic vacuoles.

