

생쥐 초기배 체외발생중 세포분열중지현상에 미치는 첨가물질의 효과*

송해범·김광식
대구대학교 농과대학

Effects of Various Additives Occuring on Cell Block Occuring during Early Development *In Vitro* of Mouse Embryos*

H. B. Song and K. S. Kim

College of Agriculture, Taegu University

SUMMARY

This research was conducted to obtain the basic information on the cell block phenomenon occurring during early development *in vitro* of mouse embryos. Early embryos were recovered at 3h post-hCG injection(hph). Various chemicals (EDTA, EGTA, DTPA, PMA and PHA) were tested to examine the effects of them on the overcoming the 2-cell block phenomenon. One hundreds μ M of the chelating agents were added to the M16 medium containing embryos. The treated embryos were worked and transferd to fresh M16 medium after 1, 3, 6 and 12h of treatment. Development was examined at 58 and 120ph injection, respectively. 44.7~68.9% of the treated embryos developed to 4-cell stages at 58hph. Only 17.6~60.3% of the embyos developed upto blastocyst at 120hph. Whereas control embryos showed slightly lower development in M16 medium alone (38.9~42.4%, 4-cell and 3.8~65.5%, blastocyst). Three mitogenic agents were tested. 51.6~63.8% and 43.4~48.1% of embryos developed upto 2-cell and blastocyst stage, respectively when treated in 5 μ g PHA-M/ml for 5 min, 1, 3 and 6h subsequently cultured in fresh M16 medium. Control embryos only showed 38.8% fo 4-cell and 5.9% fo blastocyst at 58 and 120hph, respectively. 100 μ M PMA was also beneficial for the 2-cell block. Showing better development them that of control (42.4 vs 57.9~59.4% 4cell and 5.9 vs 25.0~55.6% blastocyst, respectively. However 1 μ M butyric acid was toxic to early embryos, thus arresting further development. These result indicate that either chelating or mitogenic agents could be used to overcome the "in vitro 2-cell block" occuring during early development *in vitro* of ICR embryos

Key words: additives, cell block occuring, early development

서론

마우스의 초기배를 체외배양하는 경우 일부 계통에서 2세포기에 난할이 정지되는데 이 같은 현상을 세포분열중지(*in vitro* 2-cell block)현상이라고 보

* 이 논문은 1993학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의한 논문임.

고하였다(Cole 과 Paul, 1965). 다른 포유동물에서도 이러한 현상이 관찰되어 hamster에서는 2, 4세포기(Yanagimachi 와 Chang, 1964 ; Whittingham 과 Bavister, 1975), 쥐 2, 4세포기(Whittingham, 1975), 토끼 상실배(Kane, 1987), 돼지 4세포기(Davis 와 Day, 1984), 소 8, 12세포기(Thibault, 1966), 사람 4, 8세포기(Braude 등, 1988)에 각각 체외배양시 세포분열중지현상이 일어나는 것으로 보고 되었다.

체외배양 마우스초기배의 발생중지현상을 극복하기 위한 연구는 자성생식기에서 분리되는 난관액의 이용(Whittingham, 1975), 난관내의 내분비적 환경변화(George, 1982; 송등, 1992), 세포질의 이식(Muggleton-Harris 등, 1982), Ca^{2+} -chelating 물질의 첨가(Abramczuk 등, 1977 ; Hoshi 와 Toyoda, 1985; Dumoulin 등, 1987) 등이 시도되었으며 상당한 성과를 거둔 것으로 보고되었으나 체외배양에서 세포분열중지현상의 이해와 극복방법으로는 충분한 결과를 얻지 못하고 있다.

본 연구는 체외배양에서 세포분열중지현상을 극복하기 위한 방법을 규명하기 위해 ICR계통의 마우스를 모델로 하여 세포분열중지현상에 관여하는 요소들을 첨가화학물질의 자극을 통하여 정상적인 배발생을 위한 배양액의 조성을 조절하고, 여러가지 화학물질을 소량 첨가하여 마우스의 초기배가 정상적으로 발생할 수 있는지를 관찰하고 분석함으로써 타포유동물 초기배의 유사현상 연구에 기초자료를 제공하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

1. 초기배의 회수

3~4주령의 ICR 계통 암컷과 12주령 이상된 수컷을 선발하여 14시간 점등, 10시간 소등조건에서 사육, 시험 1주일 전에 동물개체 차이를 최소화하기 위하여 수컷 1마리씩, 암컷 3~4마리씩 각각 별개의 cage에 나누어 관리하였다. 오전 12:00에 7.5IU PMS를 복강내 주사하고, 48시간 후에 5.0IU hCG를 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다.

hCG 주사와 동시에 암·수 1:1로 합사시킨후 다음날 아침 10:00에 질진(vaginal piug)을 확인하여

교미여부를 판정하였으며, 교미가 확인된 개체는 hCG 주사 후 34시간(34h post-hCG:hph)에 회색시켜 난관을 분리하였다. 분리된 난관은 혈액 및 지방을 제거한 후 4mg bovine serum albumin(BSA) /ml이 첨가된 M16배양액 (M16+BSA; Quinn 등, 1982)으로 관류하여 초기배를 회수하였다(송 등, 1992).

2. 첨가물질의 조제

ethylenediamine tetra acetic acid(EDTA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U. S. A.)를 2차 증류수에 1.489 mg /ml를 넣은 후 여기에 1 N의 NaOH를 넣으면서 용해시켰으며, 최종 pH를 7.5로 맞추어 0.45 μ m의 membrane filter(Whatman, Maistone, England)로 여과하여 4mM의 stock으로 만들었으며, 최종농도를 M16 + BSA 배양액으로 희석하여 조절하였다. 최종농도 100 μ M로 희석된 EDTA + M16(BSA)배양액을 배양접시(60 × 15mm, Falcon Bacton Dickinson Laware, U. S. A.)에 10 μ l drop을 만들었다. ethyleneglycol-bis-N, N, N', N', -tetra acetic acid(EGTA;Sigma)를 2차 증류수에 1.522mg /ml를 넣은 후 여기에 1 N의 NaOH를 넣으면서 용해시켜 최종 pH를 7.5로 맞추고 0.45 μ m의 membrane filter로 여과하여 4 mM의 stock으로 만들었으며, 최종농도를 M16 + BSA 배양액과 희석하여 조절하였다. 최종농도 100 μ m로 희석된 EGTA + M16(BSA)을 배양접시에 10 μ l drop을 만들었다.

diethylenetiamine penta acetic acid(DTPA ; Sigma)를 2차 증류수에 1.429 mg /ml를 넣은 후 여기에 1 N의 NaOH를 넣으면서 용해시켰으며, 최종 pH를 7.5로 맞추어 0.45 μ m의 membrane filter로 여과하여 4mM의 stock으로 만들었으며, 최종농도를 M16 + BSA 배양액으로 희석하여 조절하였다. 최종농도 100 μ M로 희석된 DTPA + M16(BSA)배양액을 배양접시에 10 μ l drop을 만들었다.

phytohemagglutinin-M(PHA-M;Sigma)을 M₂ 용액에 5mg /ml을 녹여 PHA stock을 만들었으며, 최종농도를 M16 + BSA 배양액으로 희석하여 5 μ g /ml로 맞추어 배양접시에 10 μ l drop을 만들

었다. phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA; Sigma)를 dimethyl sulphoxide(DMSO, 100%)에 0.617mg/ml로 녹여 1mM의 stock을 만들었으며, 최종농도를 M16 + BSA 배양액으로 희석하여 100 μ M으로 맞추어 배양접시에 10 μ l drop을 만들었다. butyric acid(Sigma)를 2차 증류수에 1.101 mg/ml의 농도로 용해시켰으며, 최종농도 1 μ M을 M16 + BSA 배양액으로 희석하여 준비하였다. 1 μ M로 희석된 butyric acid + M16+BSA 배양액을 배양접시에 10 μ l drop을 만들었다.

3. 초기배의 배양

hCG 주사후 34시간된 초기배는 난관으로부터 회수한 다음 paraffin oil로 덮어 준비해둔 M16용액에 4mg BSA/ml가 함유된 배양액 50 μ l drop으로 옮겨 각각 4~5회씩 세정한 후 EDTA, EGTA, DTPA, butyric acid, PHA-M, PMA를 첨가한 4mg BSA/ml가 함유된 M16 배양액 microdrop에 옮겨 EDTA, EGTA, DTPA 및 butyric acid 첨가액은 1, 3, 6, 12 시간, PHA-M 첨가액은 5분, 1, 3, 6시간, PMA 첨가액은 1, 2, 3시간 동안 각각 처리하였다. 화학물질이 첨가된 배양액에서 일정시간 처리가 끝난 초기배는 4mg BSA/ml가 함유된 신선한 M16 배양액으로 세정한 후 4mg BSA/ml가 함유된 M16배양액 20 μ l drop에 옮겨 5% CO₂, 37°C에서 120시간 배양하였다.

4. 초기배의 발생능력 분석

hCG 주사후 34시간에 채취한 ICR 계통 초기배를 체외배양하면서 hCG 주사후 56시간에 4세포기로의 발달과 120시간에 배반포 발생을 각 화학물질

첨가액간에 비교, 관찰하였다.

결 과

EDTA 100 μ M이 첨가된 EDTA + M16 + BSA 배양액에서 hCG주사 후 34시간(34h post-hCG)에 회수한 초기배를 0, 1, 3, 6, 12시간 동안 배양한 후 신선한 M16 + BSA 배양액에서 120시간(120hph)까지 배양하며 58hph 및 120hph에 관찰한 결과는 Table 1과 같다. 무처리구에서는 76개의 초기배를 배양한 결과 58hph에 4세포기배 36(42.4%)개, 120hph에 배반포배 5(5.9%)개가 각각 발생하였는데 반하여 1시간처리구는 76개의 초기배 중 4세포기배 44(57.9%)개, 배반포배 19(25.0%)개, 3시간처리구는 81개의 초기배중 4세포기배 49(60.5%)개, 배반포배 23(28.4%)개, 6시간처리구는 69개의 초기배중 4세포기배 41(59.4%)개, 배반포배 37(53.6%)개, 12시간처리구는 58개의 초기배 중 4세포기배 40(68.9%)개, 배반포배 35(60.3%)개가 각각 발생하였다.

EGTA 100 μ M이 첨가된 EGTA + M16 + BSA배양액에서 hCG주사 후 34시간에 회수한 초기배를 0, 1, 3, 6, 12시간 동안 배양한 후 신선한 M16 + BSA배양액에서 120시간까지 배양하며 58hph 및 120hph에 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 무처리구에서는 80개의 초기배를 배양한 결과 58hph에 4세포기배 31(38.9%)개, 120hph에 배반포배 3(3.8%)개가 각각 발생하였는데 반하여 1시간처리구는 90개의 초기배중 4세포기배 46(51.1%)개, 배반포배 18(20.0%)개, 3시간처리구는 78개의 초기배중 4세포기배 36(46.2%)개, 배반포 16(20.0%)개

Table 1. Effect of EDTA on early development of ICR mouse embryos recovered at 34h post-hCG

Duration of EDTA treatment (h)	No. of embryos	No. (%) of embryos developed ¹ upto	
		4-cell	blastocyst
Control	85	36(42.4)	5(5.9)
1	76	44(57.9)	19(25.0)
3	81	49(60.5)	23(28.4)
6	69	41(59.4)	37(53.6)
12	58	40(58.9)	35(60.3)

1. The 4-cell and blastocyst were observed at 58 and 120hph, respectively.

Table 2. Effect of EGTA on early development of ICR mouse embryos recovered at 34h post-hCG

Duration of EGTA treatment (h)	No. of embryos	No. (%) of embryos developed ¹ upto	
		4-cell	blastocyst
Control	80	31(38.9)	3(3.8)
1	90	46(51.1)	18(25.0)
3	78	36(46.2)	16(20.0)
6	84	48(57.1)	39(46.4)
12	87	57(65.5)	44(50.6)

1. The 4-cell and blastocyst were observed at 58 and 120hph, respectively.

Table 3. Effect of DTPA on early development of ICR mouse embryos recovered at 34h post-hCG

Duration of DTPA treatment(h)	No. of embryos	No. (%) of embryos developed ¹ upto	
		4-cell	blastocyst
Control	93	42(45.2)	6(6.5)
1h	85	38(44.7)	15(17.6)
3h	79	37(46.8)	17(21.5)
6h	82	43(52.4)	25(30.5)
12h	76	46(60.5)	39(51.3)

1. The 4-cell and blastocyst were observed at 58 and 120hph, respectively.

Table 4. Effect of PHA-M on early development of ICR mouse embryos recovered at 34h post-hCG

Duration of PHA-M treatment (h)	No. of embryos	No. (%) of embryos developed ¹ upto	
		4-cell	blastocyst
Control	85	33(38.8)	5(5.9)
1/12	89	54(60.7)	42(47.2)
1	77	49(63.6)	37(48.1)
3	83	51(61.4)	36(43.4)
6	91	47(51.6)	41(45.1)

1. The 4-cell and blastocyst were observed at 58 and 120hph, respectively.

5%)개, 6시간처리구는 84개의 초기배중 4세포기배 48(57.1%)개, 배반포배 39(46.4%)개, 12시간처리구는 87개의 초기배중 4세포기배 57(65.5%)개, 배반포배 44(50.6%)개가 각각 발생하였다.

DTPA 100 μ M이 첨가된 DTPA + M16 + BSA 배양액에서 hCG주사 후 34시간에 회수한 초기배를 0, 1, 3, 12시간 동안 배양한 후 신선한 M16 + BSA배양액에서 120시간까지 배양하며 58hph 및 120 hph에 관찰한 결과는 Table 3 과 같다. 무처리구에서는 93개의 초기배를 배양한 결과 58hph 에 4세포기배 42(45.2%)개, 120hph에 배반포배 6(6.

5%)개가 각각 발생하였는데 반하여 1시간처리구는 85개의 초기배중 4세포기배 38(44.7%)개, 배반포배 15(17.6%)개, 3시간처리구는 79개의 초기배중 4세포기배 37(46.8%)개, 배반포배 17(21.5%)개, 6시간처리구는 82개의 초기배중 4세포기배 43(52.4%)개, 배반포배 25(30.5%)개, 12시간처리구는 76개의 초기배중 4세포기배 46(60.5%)개, 배반포배 39(51.3%)개가 각각 발생하였다.

PHA-M 5 μ g/ml이 첨가된 PHA-M + M16 (BSA)배양액에서 hCG주사 후 34시간에 회수한 초기배를 0, 5분, 1, 3, 6시간 동안 배양한 후 신선한

Table 5. Effect of butyric acid on early development of ICR mouse embryos recovered at 34h post-hCG

Duration of butyric acid treatment (h)	No. of embryos	No. (%) of embryos developed ¹ upto	
		4-cell	blastocyst
Control	83	34(40.9)	4(4.8)
1	73	12(16.4)	0(0.0)
3	86	9(10.5)	0(0.0)
6	81	7(8.6)	0(0.0)
12	70	0(0.0)	0(0.0)

1. The 4-cell and blastocyst were observed at 58 and 120hph, respectively.

Table 6. Effect of PMA on early development of ICR mouse embryos recovered at 34h post-hCG

Duration of PMA treatment (h)	No. of embryos	No. (%) of embryos developed ¹ upto		
		1-cell	4-cell	blastocyst
Control	53		36(42.4)	5(5.9)
1	48	24(50.0)	44(57.9)	19(25.0)
2	60	48(80.0)	49(60.5)	23(28.4)
3	52	45(86.5)	41(59.4)	37(53.6)

1. The 4-cell and blastocyst were observed at 58 and 120hph, respectively.

M16 + BSA배양액에서 120시간까지 배양하며 58hph 및 120hph에 관찰한 결과는 Table 4 와 같다. 무처리구에서는 85개의 초기배를 배양한 결과 58hph 에 4세포기배 33(38.3%)개, 120hph에 배반포배 5(5.9%)개가 각각 발생하였는데 반하여 5분처리구는 89개의 초기배중 4세포기배 54(60.7%)개, 배반포배 42(47.2%)개, 1시간처리구는 77개의 초기배중 4세포기배 49(63.6%)개, 배반포배 37(48.1%)개, 3시간처리구는 83개의 초기배중 4세포기배 51(61.4%)개, 배반포배 36(43.4%)개, 6시간처리구는 91개의 초기배중 4세포기배 47(51.6%)개, 배반포배 41(45.1%)개가 각각 발생하였다.

Butyric acid 1 μ M이 첨가된 butyric acid + M16(BSA)배양액에서 hCG주사 후 34시간에 회수한 초기배를 0, 1, 3, 6, 12시간 동안 배양한 후 신선한 M16 + BSA배양액에서 120시간까지 배양하며 58hph 및 120hph에 관찰한 결과는 Table 5 와 같다. 무처리구에서는 83개의 초기배를 배양한 결과 58 hph 에 4세포기배 34(40.9%)개, 120hph에 배반포배 4(4.8%)개가 각각 발생하였는데 반하여 1시간처리구는 73개의 초기배중 12(6.4%)개, 3시간처리구는 86개의 초기배중 9(10.5%)개, 6시간처리구

는 81개의 초기배중 7(8.6%)개가 58hph에 4세포기배로 발생하였을 뿐 그 이상의 발생이 없었고, 12시간처리구는 공시한 70개의 초기배가 배양초기부터 100% 체외분열중지현상을 보였다.

PMA 1 μ g/ml이 첨가된 PHA + M16 + BSA 배양액에서 hCG주사 후 34시간에 회수한 초기배를 0, 1, 2, 3시간 동안 배양한 후 신선한 M16 + BSA 배양액에서 120시간까지 배양하며 58hph 및 120hph에 관찰한 결과는 Table 6 과 같다. 무처리구에서는 53개의 초기배를 배양한 결과 58hph 에 4 세포기배 16(30.2%)개, 120hph에 배반포배 3(5.7%)개가 발생한 반면, 1, 2 및 3 시간처리구에서는 48개의 초기배중 58hph에 24(50.0%)개, 60개의 초기배중 48(80.0%)개 및 52개의 초기배중 45(86.5%)개가 외형적인 1세포기배로 퇴행된 모습으로 각각 관찰되었으며, 그 후의 난할은 전부 정지하였다.

고 찰

IRC계통의 초기배는 체외배양중 *in vitro* 2 - cell block 현상을 관찰할 수 있었는데(송 등, 1992), 마

우스의 1 세포기배 및 2 세포기배의 세포주기는 수정 후 9시간에 자성 및 응성전핵이 방출되고 DNA 합성이 개시되어 4시간까지 지속되고, 이때에 제1 난황이 일어난다고 보고하였으며(Luthardt 와 Donahue, 1973; Abramczuk 와 Sawicki, 1975), 2세포기배는 약 1시간의 G₁기, 6시간의 S기 및 12시간의 G₂기가 진행된다고 보고하였다(Luthardt와 donahue, 1973). 여기서 2 세포기배의 G₂기가 가장 길어 보통 이 시기에 대부분의 초기배에서 체외발생의 중지현상이 일어난다고 보고하였다(Biggers, 1971).

마우스에서 2세포기배가 발생하는 시간은 수정 후 23시간 정도에 일어난다(Biggers, 1971)고 하였으므로 실험에 공시된 배는 2세포로 발생된 후 약 11시간이 지난 post-hCG 34시간에 난관으로부터 회수한 초기배를 이용하였다. post-hCG 34시간에 회수한 ICR(block strain) 초기배를 M16 배양액에서 체외배양 할 경우 대부분의 초기배가 배반포배까지 발생하지 못하고 중간상태에서 멈추게 된다(Hoshi 와 Toyoda, 1985; 송 등, 1992).

hCG 주사후 34시간에 난관으로 부터 회수한 초기 2세포기배를 Ca²⁺-chelate물질인 EDTA, EGTA 및 DTPA, 혈구응집물질로 식물성당단백질인 PHA-M, 세포융합물질인 butyric acid와 PMA 등을 2세포기배의 주기중 G₂기에 첨가하여 자극함으로써 세포분열중지현상을 극복하고 배반포배까지의 발생을 촉진시킨 결과 Ca²⁺-chelate물질인 EDTA, EGTA 및 DTPA와 혈구응집물질인 PHA-M에서 발생성적이 가장 좋았다. 특히 Ca²⁺-chelate물질은 Abramczuk등(1977)이 보고한 것과 같이 초기배의 체외발생에 미치는 효과가 있음을 확인하였으며, Hoshi 와 Toyoda(1985)에 의하면 체외수정하여 얻은 마우스의 1세포기배를 EDTA 100 μ M이 첨가된 배양액에서 배양한 결과 48시간에 4~8세포기배 56.3~68.8%, 120시간에 배반포배 27.1~50.0%로 각각 발생되었고, EGTA를 처리한 경우에는 EDTA보다 약간 낮은 배발생율을 얻었다고 보고하였는데 본 실험에서도 EDTA: 25.0~60.3%, EGTA: 20.0~50.6%, DTPA: 17.6~51.3%의 배반포배가 발생되어 Ca²⁺-chelate물질이 초기배의 체외분열중지를 극복하는데 어느 정도 효과적으로

작용한다는 것을 확인하였다.

PHA-M은 혈구를 응집시키는 것으로 알려졌고, 고분자 물질(58,000~128,000)로 aggregated chimeric embryo를 생산하는데 많이 이용되고 있으며 투명대에 의해 선택적으로 PHA-M이 이용되는 것이 인정된다면 세포분열에 작용하는 물질의 분자량의 측정이 가능할 것이다. 박(1988)은 투명대를 제거한 2세포기배를 PHA-M로 처리하여 배양한 결과 39.4~42.5%의 배반포배를 얻었고, 고분자 물질에 의해 배발생이 촉진된다고 Monesi와 Salfi (1967)도 인정하였으며, 본 실험에서도 43.4~48.1%의 배반포배 발생을 보여 PHA-M에 의한 초기배 분열중지 극복효과가 인정된다고 할 수 있다. 즉 분열중지 극복에 고분자물질이 효과적으로 이용되는 것으로 해석될 수 있으며, 초기배가 배발생을 하는데 요구하는 물질의 유해여부를 판단하고 분자량의 대소에 따른 효과를 파악하여 처리시간 및 농도 등을 결정하여 기본배양액에 새롭게 응용되어야 할 것으로 생각된다.

유즙이 발효하면서 발생하는 불순물중의 하나로 알려져 있는 butyric acid를 첨가하여 배양하였을 때 처리시간의 장단에 관계없이 처리한 모든 구에서 배발생이 저해된 것으로 나타났다. PMA는 산성물질로서 세포질에 강하게 작용할 수 있을 것으로 예상해 sea urchin집합체를 100 μ M 의 PMA로 처리하여 발생시킨 결과 세포분열과 초기배의 발생이 억제된다고 보고한 Shen과 Burgart(1986)는 초기배의 분열중지가 염기성에 의하여 발생하는 것으로 추측하였다. 본 실험에서도 동일한 결과로 PMA는 초기배의 발생을 억제하였고, 형태적으로는 핵이 융합된 1세포기배로 관찰되어 분열을 촉진하지 못하는 물질로 판정되었다.

적 요

본 실험은 가축초기배의 체외배양중 발생하는 in vitro 2-cell block을 극복하기 위한 기초자료를 얻고자 hCG주사 후 34시간(34h post-hCG)에 회수한 ICR마우스 초기배를 model로 하여 여러가지 첨가물질을 이용한 초기배의 체외발생효과를 조사하였다. post-hCG 34시간에 회수한 초기배를 EDTA,

EGTA, DTPA가 첨가된 M16 배양액에서 1, 3, 6, 12시간 처리한 다음 체외배양한 결과 hCG주사 후 58시간에 4세포기배 44.7~68.9%, 120시간에 배반포배 17.6~60.3%가 각각 발생되어 완전합성배양액(M16 + BSA)에서 4세포기배 38.9~42.4%, 배반포배 3.8~6.55%보다 발생율이 증가되어 Ca^{2+} -chelate물질에 의해 배발생이 촉진되는 것을 인정할 수 있었다. PHA-M 5 μ g/ml이 첨가된 M16 배양액에 5분, 1, 3, 6시간 처리하여 체외배양한 결과 hCG주사 후 58시간에 4세포기배 51.6~63.6%, 120시간에 배반포배 43.4~48.1%가 각각 발생되어 무처리구의 4세포기배 38.8%, 배반포배 5.9%보다 증가되어 고분자물질에 의한 배발생효과가 있음을 확인하였다. butyric acid, PMA가 첨가된 M16배양액에서 체외배양한 결과 초기배의 발생을 저해하였다. 이같은 결과는 다양한 chelating 또는 유사분열촉진물질들이 세포분열증지현상극복에 이용될 수 있음을 보여준 것이다.

참고문헌

- Abramczuk J and Sawicki J. 1975. Pronuclear synthesis of DNA in fertilized and parthenogenetically activated mouse eggs. *Exp. Cell Res.* 92, 361-372.
- Abramczuk J, Solter D and Koprowski H. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev. Biol.* 61, 378-383.
- Biggers SJD. 1971. New observations on the nutrition of the mammalian oocyte and preimplantation embryo. In: "The Biology of the Blastocyst" (Blandau RL, ed.) The Chicago University Press. pp. 319-327.
- Braude PR, Bolton VN and Moore S. 1988. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stage of preimplantation development. *Nature* 332, 459-461.
- Cole RJ and Paul J. 1965. Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos and cell strains derived from them. In: Preimplantation Stage of Pregnancy (Wolstenholme GEW and O'Connor M, eds.). Churchill, London, UK. pp. 82-123.
- Davis DL and Day BN. 1984. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 46, 1043-1053. 7.
- Dumoulin JCM, Bras M, Petrij F and Geraedts JPM. 1987. The '2-cell block' in the development of mouse embryos of a randombred strain obtained by IVF can be overcome by supplementing the culture medium with EDTA or DTPA. The Proceedings of the third Meeting of the Europ, ESHRE. Cambridge, UK. (Abstr. No. 323)
- George MA. 1988. An analysis of the effect of the PMSG-hCG interval on the 2-cell block. *Hum. Reprod.* 3, 249-250.
- Hoshi T and Toyoda Y. 1985. Effect on the preimplantation development of mouse embryos fertilized *in vitro*. *Jap. J. Zootech. Sci.* 56, 931-937.
- Kane MT. 1987. In vitro growth of preimplantation of rabbit embryos. In: The Mammalian Preimplantation Embryos. (Bavister BD ed.) Plenum Press, U. S. A. pp. 193-217.
- Luthardt FW and Donahue RP. 1973. Pronuclear DNA synthesis in mouse eggs. An autoradiographic study. *Exp. Cell Res.* 82, 143-151
- Monesi V and Salfi V. 1967. Macromolecular syntheses during early development in the mouse embryo. *Exp. Cell Res.* 46, 632-635.
- Muggleton-Harris A and Brown JJG. 1982. Cytoplasmic factors influence mitochondrial reorganization and resumption of cleavage during culture of early mouse embryos. *Hum. Reprod.* 3, 1020-1028.
- Quinn P, Barros C and Whittingham DG. 1982. Preservation of hamster oocyte to assay the fertilization capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 66, 161-168.
- Shen SS and Burgart LJ. 1986. 1, 2-diacylgly-

- cerols mimic phorbol 12-myristate 13-acetate activation of the sea urchin egg. J. Cell. Physiol. 127, 330-340.
- Thibault C. 1966. La culture *in vitro* de l'oeuf de vache. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 6, 159-164.
- Whittingham DG. 1975. Fertilization, early development and storage of mammalian ova. In : The Early Development of Mammals (Balls M and Wilds AE, eds.), Cambridge University Press, London, pp. 1-24.
- Whittingham DG and Bavister BD. 1974. Development of hamster eggs fertilization *in vitro* and *in vivo*. J. Reprod. Fert. 38, 489-492.
- Yamagimachi R and Chang MC. 1964. *In vitro* fertilization of golden hamster ova. J. Exp. Zool. 156, 361-376.
- 박흥대. 1988. 마우스 초기배의 배양액조성에 관한 연구. 神戶大學. 박사학위논문.
- 송해범, 서병부, 김광식, 박성은, 이상호. 1992. 난관체류시간에 따른 생쥐초기배의 체외발생능력. 대한불임학회지 19, 117-123.