

## 생쥐胚 分割球의 in vitro 發達에 關한 研究

鄭德洙 · 李相鎭 · 鄭吉生

建國大學校 畜產大學

## Studies on in vitro Development of Blastomeres Separated from Mouse Embryos

Chung, D.S., S.J. Lee and K.S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

### Summary

These experiments were carried out to examine the development capacity of mouse blastomeres separated from 2 to 8-cell stage mouse embryos.

The female ICR and C3H mice were subjected to superovulation by intraperitoneal injection of PMSG and HCG and then mated with males of the same strain. Embryos were flushed from oviducts and uteri on a proper time after injection of HCG.

After removal of zona pellucida with 0.5% pronase, each embryos were separated into 1/2, 1/4, 2/4, 1/8, 2/8 and 4/8 embryos by pipetting or a fine glass needle in  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  free Hoppe & Pitts medium containing 0.02% EDTA. Splitted embryos were cultured in Hoppe & Pitts medium for 48h to 72h. The embryos developed to blastocyst were transferred to recipients on 2 or 3 days of pseudopregnancy. On the other hand, a monozygotic pairs of 1/2 embryos developed to blastocyst after 48h in vitro culture were transferred to recipients on 2 days of pseudopregnancy or pregnancy.

The results obtained were summarized as follows.

1. Success rates of separation of blastomeres from 2-, 4- and 8-cell embryos were 91.9%, 68.5 - 92.4% and 60.8 - 90.6%, respectively.
2. Development rates of various type of blastomeres to blastocyst after 72h in vitro culture were ranged 64.7 - 87.1%.
3. Blastocysts obtained after 48h in vitro culture were transferred to recipients on 2 or 3 days of pseudopregnancy. The production rates of live fetuses after transfer on 2 days, only 1/2, 2/4 and 4/8 embryos, were 13.2%, 13.5% and 17.2%, respectively and those of embryos transferred on 3 days were 11.8%, 9.6% and 11.5%, respectively. However, the production rates of live fetuses 1/2 embryos following 72h in vitro culture and transfer to recipients on 2 or 3 days of pseudopregnancy were 7.7% and 12.5%, respectively.
4. From 29 and 31 pairs of 1/2 embryos transferred to recipients on 2 days of pseudopregnancy or pregnancy, 4 sets of monozygotic twins were produced from only pregnant recipients.

## I. 緒 論

受精卵에서分離된分割球를 *in vitro*에서培養하여家畜의一卵性雙子나多子を生産하는데利用할수 있다면遺傳形質이優秀한個체를多數 얻을수있어家畜改良과増殖에至大한貢獻을 할수 있게될것이다.

Nicholas와 Hall(1942)이 rat의 二細胞胚에서分離된分割球가發生의全能性を 가지고 있음을確認한以來,各種哺乳動物 즉, mouse(Tarkowski, 1959; Tarkowski와 Wroblewska, 1967; Toshiga 등, 1987), rabbit(Seidel, 1960; Xiangzhong과 Foote, 1987), sheep(Willadsen, 1979·1983) 및 bovine(Willadsen, 1983) 등에서分割球의着床前發生에關한研究가活發하게遂行되어왔다.

初期胚에서 얻은分割球를透明帶없이卵管에移植할 경우卵管壁에附着되거나白血球의食作用으로消失되어個體로發生되기가 어렵다.(Bowman과 McLaren, 1970). 또,分割球를透明帶없이体外에서培養할때桑葉期胚의細胞數가 줄어들어正常的인産子를生産하는데障礙要因이 된다.(角田과 杉江, 1984). 이런理由들 때문에近來에는分割球를同種 혹은異種의空透明帶에 넣어 agar 나 gelatin으로封入한 다음卵管을結締한中間宿主에서生體培養을實施하여受卵動物에移植하는方法이開發되었고, 이方法에 의하여一卵性雙子が生産되었다.(Willadsen, 1979·1980·1981; Allen, 1984; Warfield 등, 1987).

한편一卵性雙子を生産하는效果的인方法으로子宮에移植하여 건달수 있는發達段階 즉,桑葉期以後의受精卵을物理的으로兩分하여直接移植하거나短時間体外에서培養한後受卵畜에移植하는方法을開發하여良好한成績을 얻고 있다.(Ozil, 1983; Lambeth 등, 1984; William 등, 1983; Lehn-Jensen 등, 1983; Brem 등, 1984; Suzuki 등, 1986).

本研究는 생쥐 初期胚에서分離된分割球를 *in vitro*에서培養한 다음移植하여産子를生産할수있는可能性 여부를確認할目的으로實施하여 비교적良好한成績을 얻었으므로 그結果를報告한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物

試驗動物로는成熟한 ICR 및 C3H 系統의雌性생쥐를使用하였다. 이들중供卵생쥐는4~6週齡(體重:15~20g)이었고受卵생쥐는8~12週齡(體重:25~30g)이었다. 한편,交尾用雄性생쥐는10~14週齡(體重:30~40g)이었다. 이들생쥐는照明時間14時間(午前7時~午後9時)의飼育室에서飼育하였으며固型飼料과 물을無制限給與하였다.

### 2. 多排卵誘起 및 受精卵의 回收

供卵생쥐의多排卵誘起를 위하여5 I.U.의 PMSG(Serotropin, 帝國臟器, Japan)를腹腔에注射하였으며45~48時間後同一한方法으로5 I.U.의 HCG(Chorulin, Intervet Co., Hlland)를注射하였다. HCG주사직후同一系統의雄性생쥐와合舍시켜翌日아침에陰腔의有無를確認하여질전이있는個體만實驗에供試하였다.

한편2細胞期, 4細胞期 및 8細胞期胚는HCG注射後各各42~44時間, 62~64時間 및 68~70時間에回收하였다. 胚의回收는生쥐의頸樞를脫臼하여屠殺한後切除한卵管을實體顯微鏡(Kyowa Optical Co., Japan)하에서PBI(1982)溶液으로灌流함으로써實施하였다.

### 3. 培養液

分割球의体外培養과移植에使用된培養液은Hoppe & Pitts(1972)培養液으로서PH는7.2~7.4로調整하였다. 그리고培養液은0.2 $\mu$ m의millipore filter로서濾過除菌하였다. 細胞培養用 plastic petri dish(녹십자 Korea)에10~15 $\mu$ 에培養液小滴20~25個를만들고그위에paratlin oil을被覆하여5%CO<sub>2</sub>, 95%空氣, 37°C의CO<sub>2</sub>배양기내에서하룻밤平衡을實施한後培養에使用하였다.

### 4. 分割球의 分離 및 体外培養

正常的인受精卵을選別하여0.5% pronase(Sigma Co., U.S.A.)를含有한常溫의PBI溶液으로3~5分間處理한後實體顯微鏡하에서觀察하면서透明帶가軟化되었을때新鮮한培養液으로3~4회洗滌한 다음 pipetting操作으로透明帶를除去하였다. 이어서2細胞期를0.02% EDTA가添加된Ca<sup>2+</sup>-free 또는Ca<sup>2+</sup>·Mg<sup>2+</sup>-free培養液에서

各各 10分 또는 20~30分間 培養하였다. 時間의 經  
과에 따라 分割球間의 接着面이 적어졌을때 pipett-  
ing을 反復하여 各各 分割球를 分離하였다. 또 4 細胞  
期 및 8 細胞期胚는  $Ca^{2+}$   $Mg^{2+}$ -free培養液에서  
20~30分間 處理한 後 pipetting과 微細硝子棒(直徑  
10 $\mu$ m以下)을 使用하여 4 細胞期胚는 1/4과 2/4胚

로, 8 細胞期胚는 1/8, 2/8 및 4/8胚로 分離하였다.  
(Figure 1.) 分離된 各各의 分割球는 新鮮한 培養  
液小滴으로 옮겨 5%  $CO_2$ 배양기내에서 48~72時  
間동안 培養하면서 胚盤胞까지의 發生過程을 觀察  
하였다.

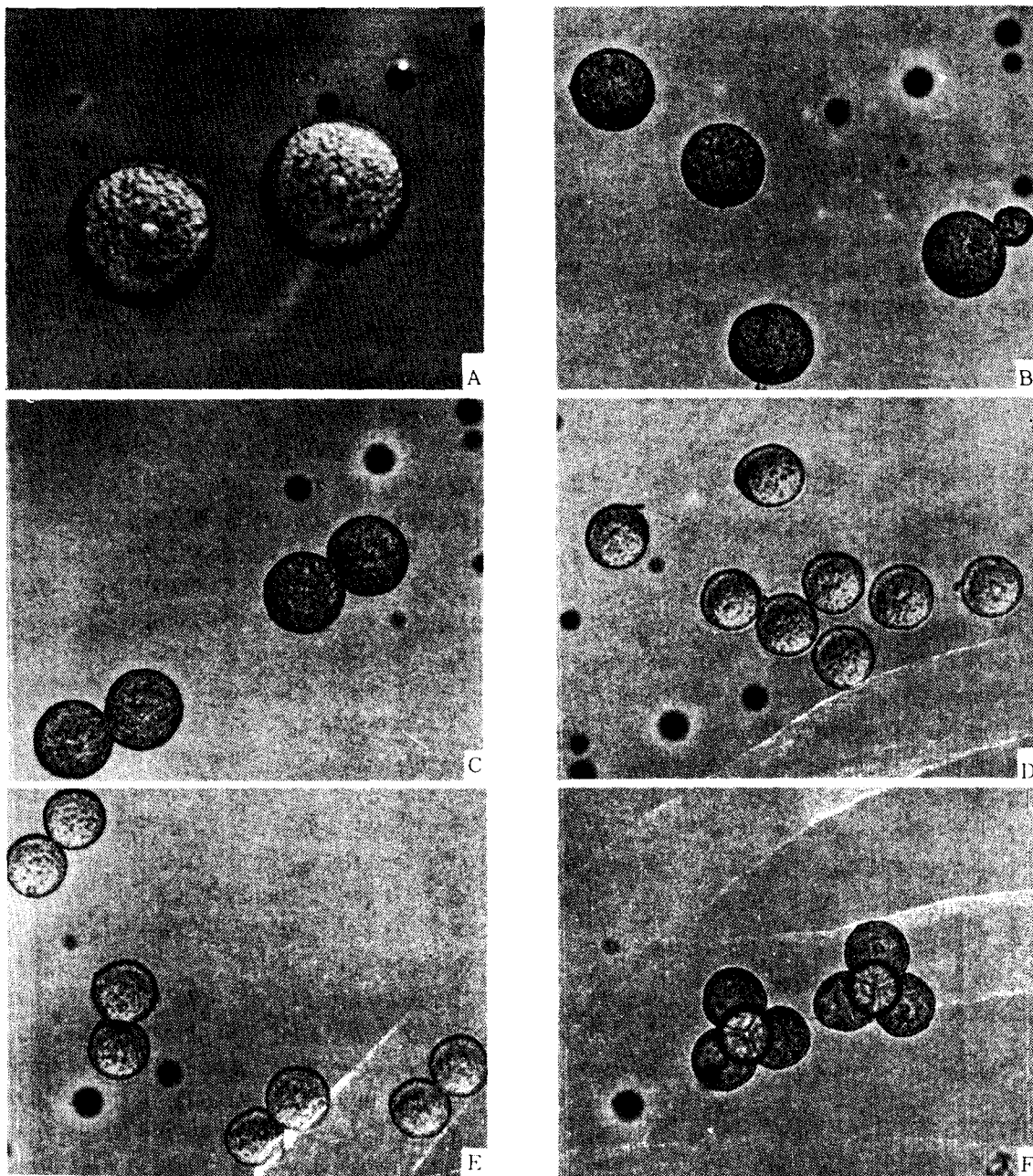


Fig. 1. 1/2(A), 1/4(B), 2/4(C), 1/8(D), 2/8(E) and 4/8(F) blastomeres separated from 2-, 4- and 8-cell stage mouse embryos.

## 5. 分離胚의 移植

發情期(陰粘液 檢査)에 있는 受卵생쥐를 選別하여 精管結紮 및 非結紮 雄性생쥐와 1:1의 比率로 合券하여 交尾를 誘導하였다. 翌日 아침에 陰栓을 確認(妊娠: 1日)하여 偽妊娠과 妊娠個體를 識別한 다음 그로부터 2~3日째에 分割球로부터 發生한 胚盤胞를 移植하였다. 즉 個體당 0.1~0.2ml의 Entobar(한림제약, Korea)를 腹腔에 注射하여 痲醉를 시킨 後 手術臺에 固定하여 腰樞上의 皮膚를 橫으로 1cm정도 切開, 兩子宮을 摘出한 다음 胚盤胞를 移植하였다.

한편, 一卵性雙子의 生産을 目的으로 하는 實驗에서는 1組의 1/2分離胚를 利用하였고 妊娠한 受卵생쥐(ICR系統)에게는 有色供卵생쥐(C3H, CBA系統)의 1/2分割球로부터 發生한 胚盤胞를 移植하였다.

## Ⅲ. 結果 및 考察

### 1. 分割球의 分離와 体外培養

透明帶를 除去한 그細胞期胚를 pipetting하여 分割球를 分離했을때의 成功率은 Table 1에 나타난 바와 같았다. 2細胞期胚의 分割球分離 成績은 良好하여 培養液의 組成이나 處理時間에 關係없이 90.6%~94.2%였으나 그중에서도  $Ca^{2+}$   $Mg^{2+}$ -free 培養液에서 20~30分間 處理하였을때의 分離率이 94.2%로서 가장 良好하였다. 이러한 結果는 Togashi 등(1987)이 報告한 成績과 대체로 一致하는 것으로 本 實驗에서 採擇한 分離方法이 良好하다는 것을 立證하는 것으로 생각된다.

한편 透明帶가 除去된 4細胞期 및 8細胞期胚의 分割球分離도  $Ca^{2+}$ · $Mg^{2+}$ -free培養하였다. 4細胞

Table 1. Separation of blastomere from 2-cell stage mouse embryos.

Medium	Treatment time(min.)	No. of	No. (%) of
		embryos treated	embryos splitted
$Ca^{++}$ -free	10	53	48(90.6)
	20-30	68	61(91.2)
$Ca^{++}$ · $Mg^{++}$ -free	10	72	66(91.7)
	20-30	467	440(94.2)

期胚는 1/4과 2/4胚로 分離하였다. 4細胞期胚는 1/4과 2/4胚로 分離하였는데 그 成功率은 各各 92.4%와 68.5%였다. 그리고 8細胞期胚는 1/8, 2/8및 4/8胚로 分離하였는데 그 分離率은 各各 90.6%, 63.5% 및 60.8%였다. (Table 2.)

Table 2. Separation of blastomere from 4-and 8-cell stage mouse embryos

Stage of embryos	Type of blastomeres	No. of embryos treated	No. (%) of embryos splitted
4-cell	1 / 4	92	85(92.4)
	2 / 4	168	115(68.5)
8-cell	1 / 8	85	77(90.6)
	2 / 8	95	62(65.3)
	4 / 8	153	93(60.8)

Table 2에서 보는 바와 같이 2/4, 2/8 및 4/8胚로 分離한 경우의 成績은 割球 1個를 分離하는 1/4과 1/8胚의 成績보다 현저하게 낮았는데 그것은 分離上의 難點에 기인하는 것으로 생각된다. 그러므로 受精卵을 2/4, 2/8및 4/8胚의 형태로 分離하는 데에는 分離方法의 새로운 改善이 요청된다고 하겠다. 分離된 分割球를 体外에서 處理時間동안 培養하여 胚盤胞段階에까지 發達시켰을때 發達率은 Figure 2와 Table 3에서 보는 바와 같았다.

2細胞期胚를 供試하였을 경우, 割球分離時의 處理時間과는 關係없이, 胚盤胞까지의 發生率은 83.8%~87.1%로서 處理時間에 따른 有意差는 認定되지 않았다. 또 4細胞期胚의 1/4과 2/4胚가 胚盤胞까지 發生한 成績은 各各 71.2%와 83.5%로서 2/4胚가 다소 良好한 發生率을 보였다. 그리고 8細胞期胚에서 分離된 1/8, 2/8및 4/8胚가 胚盤胞까지 發生하는 成績은 64.7%~84.4%로서 4/8胚가 가장 良好한 發生率을 보였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 1/4, 1/8 및 2/8胚는 1/2, 2/4및 4/8胚에 비하여 저조한 發生率을 보였는데 이는 分離된 分割球의 細胞數가 적기때문에 일어나는 現象이라고 思料된다. 本 實驗의 結果는 Tarkowski와 Wroblewska(1967)가 報告한 成績보다는 良好한 것이었으나 Togashi 등(1987)의 그것보다는 多少 저조한 것이었다.

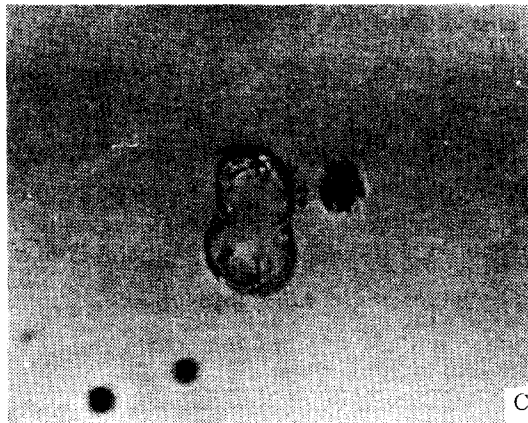
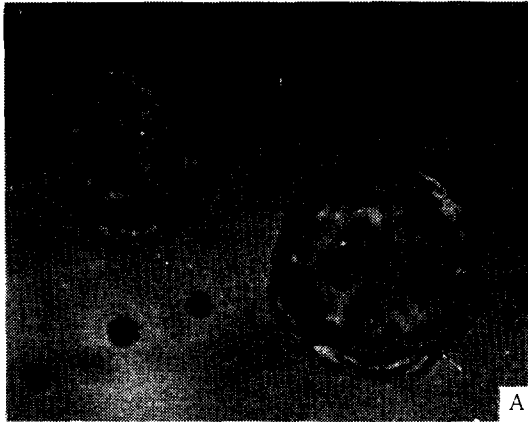


Fig. 2. Blastocysts developed from blastomeres separated from different development stage of mouse embryos.

- A: Blastocysts developed from 1/2 embryos.
- B: Blastocyst developed from 1/4 embryos.
- C: Blastocyst developed from 1/8 embryos.

## 2. 分離胚의 移植成績

Togashi 등 (1987)은 1/2과 2/8胚를 48時間 培養한 다음 偽妊娠 2~3 일째의 子宮에 移植한 結果, 偽妊娠 2 일째의 受卵생쥐에 移植한 경우가 産子의 生産率이 높았다고 報告하였다. 이와같은 사실을 基礎로 하여 本 實驗에서도 in vitro에서 發生한 胚盤胞를 偽妊娠 2~3 일째의 受卵생쥐에 移植하였던 바 그 結果는 Table 4 에서 보는 바와 같았다.

1/2胚를 in vitro에서 48時間동안 培養하여 얻은 胚盤胞를 偽妊娠 2 및 3 일째의 受卵생쥐에 移植하였을 때의 妊娠率은 各各 13.2%와 11.8%로서 偽妊娠 2 일째의 受卵생쥐에게 移植한 成績이 多少 良好하였고 72時間 培養한 胚盤胞를 偽妊娠 2 및 3 일째의 受卵생쥐에게 移植하였을 때 産子生産率은 7.7와 13.5%로서 후자가 良好하였다.

한편 1/4胚와 2/4胚를 48時間培養하여 偽妊娠 2 및 3 일째의 受卵생쥐에 移植하였으나 1/4胚에서는

Table 3. In vitro development of blastomeres separated from 2-to 8-cell stage mouse embryos

Type of blastomeres	Treatment time (min.)	No. of blastomeres cultured	No. (%) of blastomeres developed to blastocyst
1 / 2	10	136	114 (83. 8)
	20-30	816	711 (87. 1)
1 / 4	20-30	312	222 (71. 2)
2 / 4		230	192 (83. 5)
1 / 8	20-30	584	378 (64. 7)
2 / 8		248	177 (71. 4)
4 / 8		186	157 (84. 4)

産子を生産하지 못했으며 2/4胚의 그것은 각각 13.5%와 9.6%로서 2일째의 受卵생쥐에 移植한 成績이 3일째의 受卵생쥐에 移植했을때의 그것보다 良好하게 나타났다. 또 1/8, 2/8 및 4/8胚를 48時間培養하여 偽妊娠 2 및 3일째의 受卵생쥐에 移植하여 産子生産을 試圖하였으나 1/8과 2/8胚에서는 産子を生産하지 못하였고 4/8胚의 그것은 각각 17.3%와 11.5%로서 偽妊娠 2일째의 受卵생쥐에 移植하였을 때가 多少 良好하였다.

Table 4에서 보는 바와 같이 1/4, 1/8 및 2/8胚를 移植하였을 때에는 産子を 얻지 못하였는데 그것은 in vitro에서 發達한 胚盤胞의 細胞數가 적은 것에 기인된다고 思料된다. 또 Table 4의 成績으로 보아 分離胚의 体外發生 速度와 受卵생쥐의 子宮狀態를 完全히 一致만 시킨다면 産子生産率은 더욱 向上될 것으로 생각된다.

本 研究의 成績에서 알 수 있는 바와 같이 分離胚를 移植했을때의 産子率은 매우 낮았는데 그것은 透明帶를 除去한 생쥐의 初期胚에서 分割球를 分離하여 培養할 경우 비록 胚盤胞까지의 發生率은 높

으나 이들을 生体内에서 發達한 胚와 比較해 볼 때 細胞數가 적고(Rands, 1985·Wiley등, 1986·Roblero와 Riffo, 1986) 또 分割球가 發達하는 과정에서 桑實胚段階때 分割球의 配置異常이 發生하여 内部細胞塊가 제대로 形成되지 못하는 것이 많기 때문인 것으로 생각된다. 실제로 角田과 杉江(1984)는 分割球를 空透明帶에 넣어 培養할 경우 正常胚盤胞의 發生率이 현저히 높았다고 報告했다. 이러한 報告와 本 實驗의 結果를 종합하여 考察할 때 正常的인 胚發生과 産子生産에는 역시 透明帶가 必要한 것으로 생각된다.

### 3. 一卵性雙子の 生産

2細胞期胚에서 分離된 分割球를 供試하여 一卵性雙子を 生産할 目的으로 1/2胚 1組를 2日동안 in vitro에서 培養한 다음 偽妊娠과 妊娠 2일째의 受卵생쥐에 移植하여 Table 5에서 보는 바와 같은 結果를 얻었다. 偽妊娠受卵생쥐로 부터는 産子を 生産하지 못하였으나 妊娠受卵생쥐로 부터는 12.9%의 一卵性雙子を 生産하는데 成功하였다.

Table 4. Transfer results of various type of blastomeres following in vitro culture

Type of blastomeres	Culture time (h)	Day of pseudo-pregnancy of recipients	No. of embryos transferred	No. of pregnant recipients/No. of recipients	No. (%) of live fetuses obtained
1 / 2	48	2	68	2 / 10	9(13.2)
		3	68	2 / 10	8(11.8)
	72	2	52	1 / 7	4( 7.7)
		3	64	2 / 8	8(12.5)
1 / 4	48	2	52	0 / 7	0(0)
2 / 4	48	2	52	2 / 7	7(13.5)
		3	52	1 / 7	5(9.6)
1 / 8	48	2	52	0 / 7	0(0)
2 / 8	48	2	52	0 / 7	0(0)
4 / 8	48	2	52	2 / 7	9(17.3)
		3	52	1 / 7	6(11.5)

Table 5. Production of monozygotic twins after transfer of 1/2 embryos

Condition of recipients	No. of recipients	Pair of 1/2 embryos	No. (%) of monozygotic twins produced
Pseudopregnancy	29	29	0(0)
Pregnancy	31	31	4(12.9)

Table 5에서 볼수 있는 바와 같이 偽妊娠 생쥐를 受卵생쥐로 使用하였을 경우에는 産子を 生産하지 못하였는데 이러한 結果를 가져온 구체적인 理由에 關해서는 今後 再檢討가 必要하다고 思料된다.

#### IV. 摘 要

本 實驗은 생쥐 初期胚에서 分離된 分割球의 發生能을 觀察하기 위하여 實施하였다.

多排卵處理에 의하여 얻어진 2細胞期, 4細胞期 및 8細胞胚로부터 分離된 1/2, 1/4, 2/4, 2/8 및 4/8胚를 in vitro에서 培養하여 胚盤胞로 發達시킨 다음 偽妊娠 또는 正常妊娠 2~3 일째의 受卵생쥐에 移植하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 2, 4 및 8細胞期胚의 分割球의 分離率은 各 各 91.9, 68.5~92.4 및 60.8%~90.6%였다.
2. 分離된 여러형태의 分割球를 in vitro에서 72時間 培養했을때 胚盤胞段階에 까지 發生하는 比率은 64.7%~87.1%였다.
3. 1/2, 2/4 및 4/8胚를 in vitro에서 48時間培養하여 얻은 胚盤胞를 偽妊娠 2 일째의 受卵생쥐에 移植했을때의 産子生産率은 各 各 13.2%, 13.5% 및 17.3%였고, 偽妊娠 3 일째의 受卵생쥐에 移植하였을때의 그것은 各 各 11.8%, 9.6% 및 11.5%였다. 또, 1/2胚를 72時間培養하여 얻은 胚盤胞를 偽妊娠 2 일째와 3 일째의 受卵생쥐에 移植했을때 産子生産率은 各 各 7.7%와 12.5%였다.
4. 2細胞期胚에서 유래한 1/2胚의 쌍을 in vitro에서 胚盤胞段階에 까지 發達시킨 다음 偽妊娠 및 正常妊娠 受卵생쥐에 移植한 結果, 正常妊娠 受卵생쥐에서만 4組(11.4%)의 一卵性雙子가 生産되었다.

#### References

1. Allen, W. R. and R. L. Pashen. Production of monozygotic horse twins by embryo micro-manipulation. *J. Reprod. Ferttil.*, 71, 607-613. (1984)
2. Bowman, P. and McLaren. Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. *J. Embryol. Exp. Morph.*,

- 23, 693-704. (1970).
3. Brem, G., B. Kruff, B Szilvassy and Tem-humberg. Identical simmental twins through microsurgery of embryo. *Theriogenology*, 21, 231. (1984)
4. Fisher, D. L. and M. Smithberg. Host-transplant relationship of cultured mouse embryos. *J. Exp. Zool.*, 183, 263-266. (1978).
5. Fisher, P. S. and J. W. Macpherson. Development of embryonic structures from isolated mouse blastocysts. *Can. J. Anim. Sci.*, 56, 33-36. (1976)
6. Gatica, K., M. P. Boland, T. F. Crosby and I. Gordon. Micromanipulation of sheep morula to produce monozygotic twin. *Theriogenology*, 21, 555-560. (1984)
7. Hoppe, R. W. and B. D. Bavister. Effect of removing the zona pellucida on development of hamster and bovine embryos in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 19, 391-404. (1983)
8. Hoppe, P. C. and S. Pitts. Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol. Reprod.*, 8, 402-426. (1973)
9. Kelly, S. Studies of the developed potential of 4 and 8-cell stage mouse blastomeres. *J. Exp. Zool.*, 26, 283-290. (1977)
10. Konwinski, M., D. Solter and H. Kopproski. Effect of removal of the zona pellucida on supplement development of mouse blastocyst in vitro. *J. Reprod. Ferttil.*, 54, 137-143. (1978)
11. Lambeth, V.A., C. R. Looney, S.A. Voikel, D. A. Jackson, K. G. Hill and P. A. Gadke. Microsurgery on bovine embryos at the morula stage to produce monozygotic twin calves. *Theriogenology*, 20, 85-95. (1983)
12. Mintz, B. Experimental study of the developing mammalian eggs. Removal of the zona pellucida. *Science*, 138, 594-595. (1962)

13. McEvoy, T. G. and J. M. Sreenan. The survival of bisected cattle embryos without zona pellucida. *Theriogenology*, 27, 253. (1987)
14. Modlinski, J. A. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *J. Embryo. Exp. Morph.*, 23, 539-547. (1970)
15. Nullen, R. J., W. K. Whitten and S. G. Carter. "Annual report of the Jackson laboratory," Bar harbor, Maine. pp. 67-68. (1970)
16. Nagashima, H. and S. Ogawa. Studies on the development of potential and the survival after deep freezing of micro surgically dicotomized morula embryos in rats and rabbits. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 27, 539-547. (1981)
17. Nagashima, H., A. Fujicura and S. Ogawa. Studies on the developmental ability and the viability after deep freezing of the blastomeres isolated from 2-cell stage embryos in mice and rabbits. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 28, 20-23. (1982)
18. Nagashima, H., K. Mathsui, T. Sawasaki and Y. Kano. Production of monozygotic mouse twins from micro surgically bisected. *J. Reprod. Fertil.*, 70, 357-362. (1984)
19. Nicholas, J.S. and B. V. Hall. Experiments on developing rat. II. the development of isolated blastomeres and fused eggs. *J. Exp. Zool.*, 90, 355-356. (1942)
20. Ozil, J. P. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 69, 463-468. (1983)
21. Rand, G. F. Cell allocation in half and quadruple-size preimplantation mouse embryos. *J. Exp. Zool.*, 236, 67-70. (1985)
22. Roblero, L. S. and M. D. Riffo. High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos in vitro *Fertil. sterill.*, 45, 412-416. (1986)
23. Rossant, J. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 36, 283-290. (1976)
24. Rottman, O. J. and W. W. Lamper. Development of early mouse and rabbit embryos without zona pellucida, *J. Reprod. Fertil.*, 6, 303-306. (1981)
25. Tarkowski, A. K. Experiments on the developments isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature*, 184, 1286-1287. (1959)
26. Tarkowski, A. K. and J. Wroblewska. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4-and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morpho.*, 18, 155-180. (1967)
27. Togashi, M., H. Suzuki, T. Miyai and M. Ogamoto. Production of monozygotic twins by splitting of 2-cell stage embryos in mice. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33, 51-57. (1987)
28. Trounson, A. O. and N. W. Moore. The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.*, 41, 97-105. (1974).
29. Tsunoda, Y., K. Toshiyagi, S. Tagashi, O. Norihiki and S. Tagasi. The survival of half embryos produced by separation of bisection in the goat. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 29, 154-157. (1983)
30. Tsunoda, Y. and A. Maclaren. Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomere. *J. Reprod. Fertil.*, 69, 315-322. (1983)
31. Warfield, S. J., G. E. Seidel and R. P. Elasciden. Transfer of bovine demi-embryos with and without the zona pellucida, *J. Anim. Sci.*, 29, 198-207. (1987)
32. Wiley, L. M., S. Yamami and D. V. Myyden. Effect of potassium concentration, type of protein subsequent and embryo density on mouse preimplantation development



- in vitro. *Fertil. Steril.*, 45, 119. (1986)
33. Willadson, S. M. A method for culture of micromanuplated sheep embryos and its use to produce monozygotio, twins. *Nature*, 227, 1007-1014. (1979)
34. Willadson, S. M. The Viability of eary cleavage stages containing half the normal number of blastomere in the sheep. *J. Reprod. Fert.*, 59, 357-362. (1980)
35. Willadson, T. J., R. P. Elsdén and G. E. Seidel. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 22, 521-531. (1984)
36. Willadson, S. M. and L. C. Polge. Attempt to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Rec.* 108, 211-213. (1981)
37. Xianzhong, Y. and R. H. Foote. Production of identical twins rabbits by micromanipulation of embryos. *Biol. Reprod.*, 37, 1007-114. (1987)