

## Polyethylene Glycol 처리에 의한 생쥐 2細胞期胚의 分割球 融合에 관한 研究

梁 富 根

江原大學校 畜産大學

### Studies on the Polyethylene Glycol-induced Fusion of Two-cell Mouse Embryo Blastomeres

Yang, B.K.

College of Animal Agriculture, Kangweon National University

#### SUMMARY

This study was conducted to develop a simple and efficient technique for fusing 2-cell mouse embryos to obtain tetraploid embryos. Various concentration of PEG and exposure times were compared in order to determine the best condition for fusion and subsequent of fused embryos.

The results obtained were follows :

1. The incidence of fusion induction treated with 40% PEG(70.8%) and 45%(62.7%) for 60 sec. exposure were higher than those of 40% and 45% PEG for 30 sec., 90 sec., or 120 sec. exposure group. Also, the highest incidence of fusion induction(76.9%) was achieved with 120 sec. exposure at 50% PEG concentration.

2. Fused embryos after PEG treatment were cleavaged 2-to 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst at 20-24 hr., 30-34 hr., 44-52 hr., respectively, and were not different from those obtained fleshly.

3. The high proportions of the embryos developed to blastocysts after blastomere fusion with 40% PEG for 60 sec., 45% PEG for 60 sec. and 50% for 120 sec. were 66.7%(42/63), 69.0%(29/42) and 32.0%(16/50), respectively, this trend indicated that the fusion rate was similar to the incidence of fused embryos forming blastocysts.

4. The cell number of blastocyst developed from fused embryos(18.7 ± 2.6) was smaller than that of untreated embryos(48.9 ± 1.69)

#### I. 緒 論

家畜을 포함한 哺乳動物에서 遺傳的 組成이 동일한 個體의 生産을 위하여 많은 研究者들은 遺傳子 조작 및 受精卵의 미세조작기법 등을 이용하여 複製個體(clone)의 生産을 시도하고 있다.

자연상태에서 유전적 조성이 동일한 개체의 發生은 一卵性 雙仔(identical twin) 및 三仔(triplets)가 있으나 그 發生빈도는 극히 희박하다. 哺乳動物에서 clone을 生産하기 위한 方法은 初期胚의 分割球 分離(Mullen et al., 1970), 切斷(Moustafa and Hahn, 1978)하여 개개의 분리, 절단한 수정란을 個體發生시키는 方法과 核移植方法(Modlinski, 1978) 등이 있으

나, 이상의 방법은 고도의 기술과 막대한 실험비를 요하고 있어 多數의 複製個體를 생산하는 데에는 한계가 있다.

이상의 방법 이외에 실험실에서 손쉽게 할 수 있는 동형접합성 二倍體(Homozygous diploid)인 四倍體個體(tetraploid)의 작위에 의한 복세계체의 생산에 대한 연구가 진행되고 있다.

자연상태에서 제 2극체를 방출하지 않은 卵子 또는 二卵核卵子(digynic ovum)에 정상적인 2개의 半數體精子, 혹은 二倍體염색체를 가진 정자가 수정되어 발생되는 것으로 추측되는 四倍體個體(tetraploidy)는 자연상태에서 발생빈도가 극히 저조하며 (Beatty & Fischberg, 1952; Baranov, 1976), 발생초기에 사멸된다 (Dyban & Baranov; 1987).

四倍體個體를 生産하기 위한 시도는 비활성화된 sendai virus 를 이용한 分割球融合(Graham, 1971), Cytochalasin B 처리(Snow, 1973; Tarkawski et al., 1977), Polyethylene glycol(PEG) 처리에 의한 分割球의 融合(Eglitis, 1980; Spindle, 1981; 角田 등, 1984), 전기자극에 의한 分割球融合(Eubiak et al., 1985; Kato et al., 1987) 및 현미수술기법(Modlinski, 1978) 등의 예가 보고되었다.

이상의 방법중 Sendai virus 에 의한 방법은 수정란 분할구에 쉽게 독성을 미쳐 생존성에 영향을 미치며, 전기자극법 및 현미 미세수술 기법은 고도의 기술을 필요로 하는 단점을 지니고 있는 반면, Cytochalasin B 처리 및 PEG 처리에 의한 分割球의 融合은 실험실에서 쉽게 할 수 있을 뿐 아니라, 단시간에 分割球의 融合을 할 수 있다.

그러나 四倍體 受精卵는 체외에서 胚盤胞까지는 정상적으로 發育이 진행되나 착상후 일정시간에 감수된 세포수, 낮은 성숙분열활동 및 비정상적인 많은 세포량 등의 원인에 의하여 발생초기에 사멸되는 것으로 추측된다(Dyban & Baranov, 1987)

본 연구는 哺乳動物 受精卵의 四倍體 個體發生 및 핵이식후 發生의 가능성을 검토하기 위한 실험의 일환으로서, PEG 제제가 생쥐 2細胞期 受精卵의 分割球融合에 미치는 영향을 검토하고자 실시되었다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物과 供試受精卵

본 실험에 사용된 공시동물로서는 생후 5~8주령의, 체중이 25~30g 인 ICR 계통의 생쥐가 사용되었다.

過排卵 誘起를 위하여 雌性생쥐에 PMSG 5단위(IU)를 1회 주사하였으며 48시간후에 hCG 5IU를 복강내 주사하였다. hCG 주사와 동시에 雄性생쥐와 1:1로 교배하여 交尾시킨 후, 40~44시간에 卵管을 분리 절단하여 2細胞期의 수정란을 회수, 실험현미경하에서 發育狀態를 검사한 뒤 형태적으로 정상적인 受精卵을 실험에 供試하였다.

### 2. 2-細胞期 受精卵의 分割球의 融合

PEG(Sigma, 분자량 1,000)를 BSA 가 첨가되지 않은 M<sub>16</sub> 배양액에 40%, 45% 및 50%의 농도(w/v)가 되도록 조정하여 56°C water bath에서 溶解시킨 후, 4%에서 2~3주 동안 보관하면서 실험에 사용하였다.

40%, 45% 및 50% PEG 용액을 각각 조직배양용 petri dish에 1ml씩 담아 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% O<sub>2</sub>의 배양조건으로 2시간 이상 평형시킨 후, hCG 주사 후 40~44시간에 M<sub>2</sub>배양액으로 회수된 2細胞期 受精卵을 PEG(40%, 45%, 50%)용액에 담긴 petri dish 내로 옮겨 30초, 60초, 90초 및 120초 동안 노출시킨 후, 신선한 M<sub>16</sub> 배양액으로 5~6회 세척하여 CO<sub>2</sub>배양기에서 2~3시간 배양한 후, PEG 농도 및 노출시간에 따른 2細胞期 受精卵의 分割球 融合 유무를 검사하였다(Fig. 1).

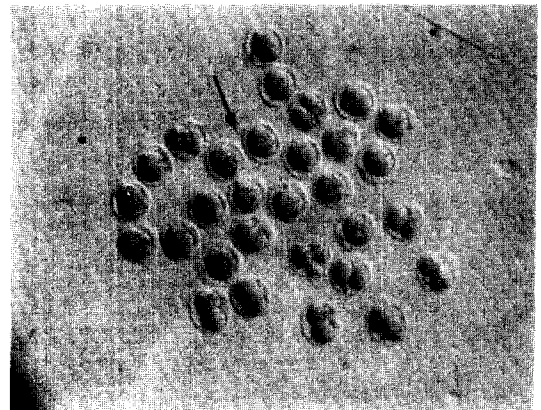


Fig. 1. Complete fusion(arrow) of blastomeres at 2-3 hr. after PEG treatment in mouse 2-cell embryos. (137×).

### 3. 分割球 融合卵의 體外培養

PEG 농도(40%, 45%, 50%) 및 노출시간(30 초, 60 초, 90 초 및 120 초)에 따라 분할구가 융합된 1細胞狀의 四倍體卵을 BSA 가 첨가된  $M_{16}$ 액을 조직배양용 petri dish 의 저면에 부착, 멸균된 paraffin-oil 로 피복하여 小滴培養液을 만들고, 5%  $CO_2$ , 95% air 및 37°C의 배양조건으로 2시간 이상 평형시킨 배양액내로 옮겨 2~3일간 배양(37°C, 5%  $CO_2$  in air)하여 배반포까지의 발육상을 조사하였다(Fig. 2).

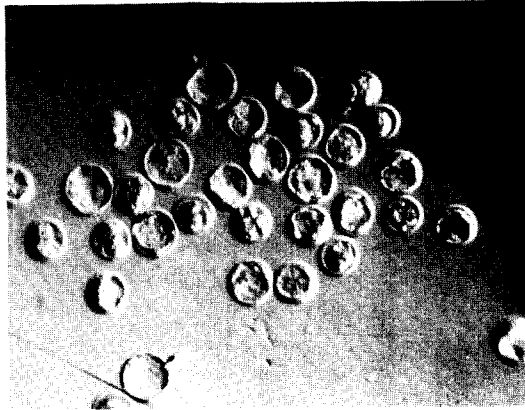


Fig. 2. Blastocysts(arrow) developed from fused blastomeres with PEG treatment. (137 $\times$ ).

### 4. 分割球 融合卵의 染色體 分析 및 核染色

#### (1) 染色體 分析

分割球가 융합되어 정상적으로 상실배와 胚盤胞期까지發育된 受精卵의 일부를 性染色體의 핵형을 分析하여 四倍體의 유무를 조사하였다(梁과 金, 1988). 즉, 分割球가 融合되어 正常發育된 상실배와 배반포기 수정란을 Colcemid의 최종농도가 0.05 $\mu$ g/ml 되도록 조정하여 만든 소적배양액 내에서 2시간배양(37°C 5%  $CO_2$  in air)한 후 저장액(0.88% sodium citrate)에 8~15분간 노출, 고정액(methyl alcohol: glacial acetic acid, 3:1)으로 고정한 후 1% aceto-orcein 염색액으로 염색하여 위상차현미경(400~1,000 $\times$ ) 하에서 염색체 수를 조사하였다(Fig. 3).

#### (2) 分割球 融合卵의 核染色

체외에서 정상적으로 발육된 分割球 融合卵(상실배,

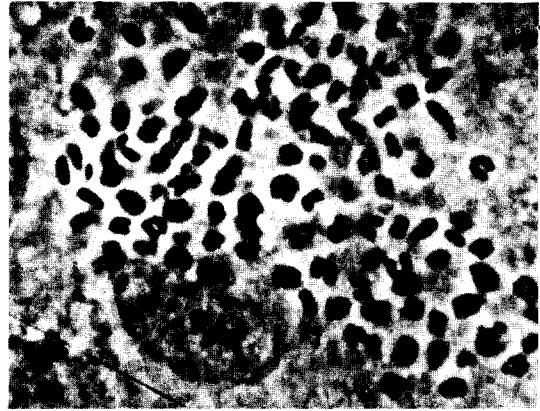


Fig. 3. Metaphase plates of a blastocyst developed from fused blastomeres embryo (3428 $\times$ ).

배반포기)의 細胞數를 조사하기 위하여 Pursel 등(1985)의 核染色方法을 수정 보완하여 실시하였다.

核染色을 위한 보존액은 Hoechst 33342(HO) 1mg을 증류수 1ml에 용해하여 만든 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2.3% sodium citrate dihydrate 0.75ml와 ethanol 0.25ml 및 10 $\mu$ g HO 용액을 혼합하여 제조한 염색액을 매 실험 직전에 만들어 사용하였다.

실험방법은 HO 염색액 10~20  $\mu$ l를 실리칸 처리를 한 slide glass에 떨어뜨려 소적액을 만들고 融合卵을 소적액내로 옮겨 37°C의 slide warmer에서 3~5분간 배양한 후 염색후 수정란보다 작은 pipette를 이용하여 염색액을 제거, 16  $\mu$ l permount 용액을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 200~400 $\times$ 의 형광현미경(Vickers, M<sub>17</sub>)하에서 세포수를 검사하였다(Fig. 4).

## III. 結果 및 考察

### 1. PEG 濃度 및 노출시간에 따른 2細胞期 胚의 分割球融合 성적

PEG 농도(40%, 45% 및 50%)와 노출시간(30 초, 60 초, 90 초 및 120 초)이 mouse 2細胞期 受精卵의 分割球融合에 미치는 영향을 조사하여 Fig.5와 Table 1과 같은 성적을 얻었다.

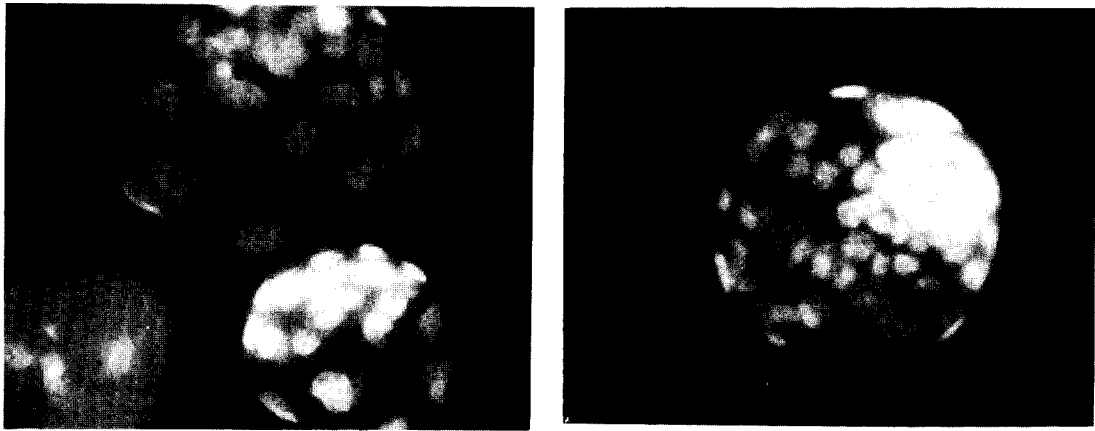


Fig. 4. Fluorescing nuclei of blastocyst(A) developed from fused blastomeres and normal blastocyst embryo(B) stained with Hoechst 33342. (1429 X).

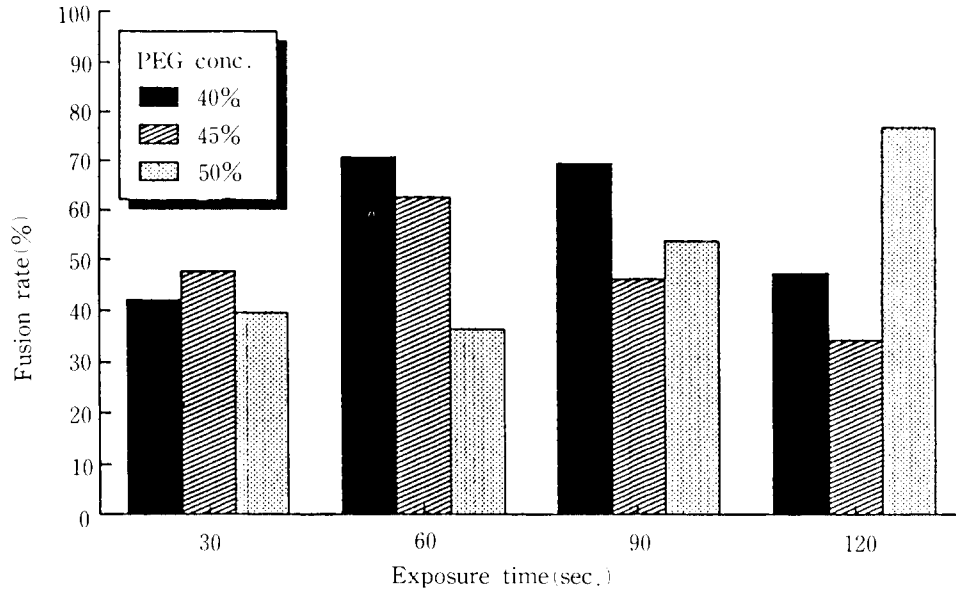


Fig. 5. Incidence of blastomere fusion in mouse 2-cell embryos treated with PEG at varying concentration.

Table 1. Effect of PEG concentration and exposure time on the efficiency of fusion induction

PEG conc. (%)	Exposure time(sec.)			
	30	60	90	120
40	24/65(42.1)	63/89(70.8)	46/66(69.7)	29/61(47.5)
45	21/44(47.7)	42/67(62.7)	30/65(46.2)	22/64(34.4)
50	21/53(39.6)	24/66(36.4)	34/63(53.9)	50/65(76.9)

PEG 농도에 따른 分割球의 融合率은 PEG 농도 40%의 경우 30초, 60초, 90초 및 120초의 노출시간에 따라 각각 42.1%, 70.8%, 69.7% 및 47.5%로서 60초동안 2細胞期 受精卵을 40% PEG 용액에 노출시킨 경우가 30초, 90초 및 120초의 경우보다 分割球融合 성적이 우수하였다.

45% PEG 농도에서는 노출시간이 30초, 60초, 90초, 120초의 경우는 47.7%, 62.7%, 46.2% 및 34.4%의 分割球融合 성적을 나타내어 40% PEG 농도에서와 같이 60초(62.7%)가 30초(47.7%), 90초(46.2%), 120초(34.4%)의 노출시간 성적보다 우수한 경향을 보였다.

한편 50% PEG 농도의 경우에는 30초, 60초, 90초 및 120초동안 노출시킨 경우 分割球의 融合率은 39.6%, 36.4%, 53.9% 및 76.9%로서 노출시간의 증가함에 따라 分割球의 融合成績이 증가되는 경향을 보였다.

이와 같은 성적은 Spindle(1981)이 40% PEG 용액에서 60초동안 노출시킨 후 82.4%의 융합성적을 얻어 30초(72.4%), 90초(77.4%), 120초(66.4%)보다 우수한 결과를 얻은 경우와 같은 경향을 나타냈으나, 45% PEG 용액에서는 120초 노출시킨 성적이 72.0%로서 90초 노출시 융합성적(60.0%) 보다 우수하여 본 실험과 다른 경향을 보였다.

角田등(1984)은 40% PEG 용액에서 30초, 60초, 90초, 120초에서 각각 융합율이 0%, 2.9%, 15.4% 및 20%였으며, 45% PEG 용액의 경우 30초, 60초, 90초, 120초에서도 20%, 26.1%, 44%, 45.2%로서 40%, 45% PEG 용액의 경우 노출시간에 따라 융합율이 증가되는 경향을 보였으나, 50% PEG 용액의 경우 노출시간이 증가함에 따라 융합성적이 증가(18.0%, 49.1%, 58.3%, 64.9%)되어 본 실험 결과와 일치하였다.

이상을 종합하여 볼 때 PEG 처리에 따른 mouse 2細胞期의 分割球 融合에는 40%, 45% PEG 용액에서 60초간과 50% PEG 용액에서는 120초간 노출시켜 융합하는 것이 가장 효과적이라고 생각된다.

## 2. 分割球 融合卵의 體外培養 성적

PEG 농도(40%, 45%, 50%)에 따라 分割球가 融合된 融合卵을 M<sub>16</sub> 배양액내에서 일정시간 배양하여 形態的 正常性과 發育段階를 조사한 성적을 Table 2에 요약하였다.

PEG 농도에 따라 分割球가 融合된 融合卵은 체외배양 후 20~24시간 부터 2~4細胞期로 發育되기 시작하여 30~34시간에 8細胞期, 44~52시간에 桑實胚, 60~72시간에 胚盤胞期까지 발육되었다.

40% PEG 용액에서 30초간 노출시킨 경우 24개 融

Table 2. Developmental rate from the embryos showing blastomere fusion on treatment with PEG in varying concentration and exposure time

Exposure time (sec.)	PEG con. (%)	Embryo stage				
		Deger	2-4 cell	8-cell	morula	blastocyst
30	40	2	6	-	9	7
	45	2	1	1	5	12
	50	10	5	1	3	2
60	40	3	9	7	2	42
	45	4	7	2	-	29
	50	7	14	-	2	3
90	40	3	2	3	12	26
	45	1	4	8	7	10
	50	23	4	-	-	7
120	40	12	3	-	-	14
	45	5	4	-	-	13
	50	11	20	3	-	16

승卵중 2~4細胞期까지 발육된 수정란은 6개(25%), 상실배수정란은 9개(37.5%) 및 배반포기까지 발육된 수정란은 7개(29.2%)였으며, 45% PEG 용액의 경우는 상실배까지 발육된 수정란은 23.8%(5/21), 배반포 수정란은 57.1%(12/21), 50% PEG 용액의 경우 퇴행란 47.6%(10/21), 상실배의 수정란은 14.3%(3/21), 배반포기 수정란은 9.5%(2/21)였다.

이상의 결과를 볼 때 생쥐 2細胞期 수정란을 PEG 용액에서 30초간 노출시켜 分割球를 융합시킨 경우 45% PEG 용액에서 배반포까지 발육된 체외배양율이 57.1%로서 40% PEG 용액(29.2%)과 50% PEG 용액(9.5%)보다 좋은 체외배양성적을 나타냈으며, 50% PEG 용액의 경우 퇴행란의 비율(47.6%)이 증가하는 경향을 보였다.

40%, 45% 및 50% PEG 용액에서 60초간 노출시킨 경우 8細胞期 이상 發育된 수정란은 각각 81.0%(51/63), 73.8%(31/42) 및 19.2%(5/26)로서 40%와 45% PEG 용액보다 50% PEG 용액에서 처리한 경우 매우 낮은 체외발육 성적을 나타냈다.

40%, 45% 및 50% PEG 용액에서 90초간 노출시킨 경우 8細胞期 이상 發育된 수정란은 각각 89.1%, 86.2% 및 20.6%로서 40%와 45% PEG 용액보다 50% PEG 용액에서 처리한 경우 매우 낮은 체외발육

성적을 나타내어 각 농도의 PEG 용액에서 30초와 60초동안 노출시킨 경우와 동일한 성적을 나타냈다.

40%, 45% 및 50% PEG 용액에서 120초간 노출시킨 경우 8細胞期 이상 발육된 수정란은 각각 48.2%(14/29), 59.1%(13/22) 및 38.0%(19/50)로서 각 농도의 PEG 용액에서 30초, 90초 동안 노출시킨 경우와 비슷한 경향을 나타냈다.

한편 50% PEG 용액에서 30초, 60초 및 120초 동안 노출시킨 경우 발육상태가 좋지 않은 퇴행란과 2~4細胞期の 발육율은 각각 71.4%(15/21), 80.8%(21/26), 79.4%(27/34) 및 62.0%(31/50)로서 40% PEG 용액(8.3%, 19.0%, 51.7%)과 45% PEG 용액(14.3%, 26.2%, 17.2%, 40.9%)에서의 처리구보다 상당히 높은 경향을 나타내어, PEG 용액의 증가에 따라 체외발육 성적이 저조한 것으로 나타났다.

### 3. 分割球 融合卵의 體外培養 成績

PEG 농도에 따라 30초, 60초, 90초, 120초동안 처리하여 分割球가 융합된 融合卵을 체외에서 일정시간 배양한 후 胚盤胞期까지 발육된 체외배양 성적을 Fig. 6과 Table 3에 요약하였다.

PEG 처리에 따라 分割球가 融合된 融合卵을 37°C 5% CO<sub>2</sub>와 95% O<sub>2</sub>의 배양조건에서 64~72시간 배양

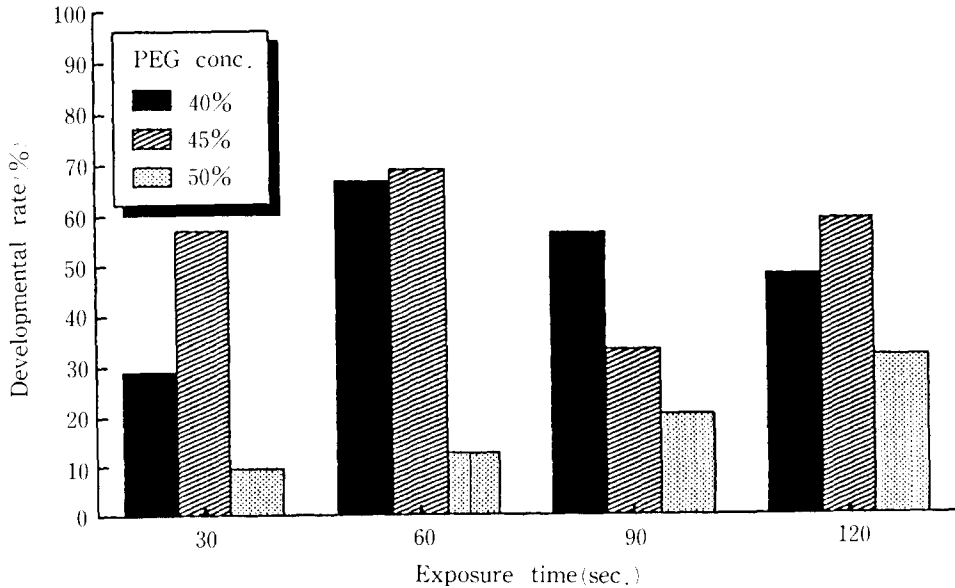


Fig. 6. Incidence of blastocyst developed from the embryos treated with PEG in varying concentration.

Table 3. Proportion of blastocysts developed from the embryos showing blastomere fusion on treatment with PEG in varying concentration and exposure time

PEG conc. (%)	Exposure time(sec.)			
	30	60	90	120
40	7/24(29.2)	42/63(66.7)	26/46(56.5)	14/29(48.3)
45	12/21(57.1)	29/42(69.0)	10/30(33.3)	13/22(59.1)
50	2/21(9.5)	3/24(12.5)	7/34(20.6)	16/50(32.0)

하여 胚盤胞期까지 발육된 체외발육 성적은 40% PEG 용액의 경우 30초, 60초, 90초 및 120초동안 배양하여 각각 29.2%, 66.7%, 56.5% 및 48.3%로서 60초동안 40% PEG 용액에서 배양한 구가 가장 좋은 결과를 얻었다.

45% PEG 용액에서 30초, 60초, 90초 및 120초동안 배양하여 배반포기까지 발육된 체외발육 성적은 57.1%, 69.0%, 33.3% 및 59.1%로서, 60초동안 45% PEG 용액에서 배양한 구의 성적이 가장 우수하여 40% PEG 용액 처리와 같은 경향을 보였으나, 30초동안 PEG 용액에서 처리된 구의 경우, 40% PEG 용액 처리구가 45% PEG 용액 처리구보다 극히 저조한 체외배양 성적을 나타냈다.

50% PEG 용액에서 30초, 60초, 90초 및 120초동안 배양한 체외발육 성적은 각각 9.5%, 12.5%, 20.6%, 32.0%로서 노출시간이 증가됨에 따라 체외발육 성적이 우수한 것으로 나타났다. 50% PEG 용액에서 120초동안 배양시킨 결과 융합율은 전체실험구 중에 가장 높았으나(76.19%), 체외배양 성적은 32.0%로서 낮은 결과를 나타냈으며, 50% PEG 용액 처리구가 40% PEG 용액 및 45% PEG 용액 처리구보다 체외배양 성적이 낮은 결과를 얻었다.

이상의 결과는 Snow(1973)가 Cytochalasin B 처리 후 분할구를 융합하여 割球가 融合된 融合卵의 체외에서 배반포기까지 발육된 체외발육 성적을 40.0% 얻은 결과보다 나은 대체로 우수하였으며 Spindle(1981)이 PEG 처리후 分割球가 融合된 融合卵의 체외발육 성적을 80.4%(135/168)의 결과를 얻은 성적에는 미치지 못하였다.

角田 등(1984)은 40% PEG 용액에서 60초, 90초, 120초동안 처리하여, 0%, 100%, 67%의 성적과 45% PEG 용액에서 30초, 60초, 90초, 120초동안 처리하여 50%, 56%, 55%, 52%의 성적 및 45%

PEG 용액에서 30초, 60초, 120초동안 배양하여 33%, 33%, 51%, 35%의 체외발육 성적을 얻어 본 실험과 비슷한 경향을 나타냈다.

한편 分割球融合卵이 체외에서 일정시간 배양한 후 胚盤胞期까지 발육된 融合卵은 감소된 세포수를 나타냈다. 즉 融合卵의 細胞數는  $18.75 \pm 2.59$ 였으며, 체외에서 배반포기까지 발육된 新鮮卵의 경우 細胞數는  $48.9 \pm 1.69$ 로서 PEG 용액에서 일정시간 배양후 융합된 融合卵의 배반포기 수정란의 세포수는 현저히 감소되는 경향을 나타냈다.

이상의 결과는 Snow(1973)가 Cytochalasin B 처리한 후 融合卵의 細胞數가  $19.1 \pm 0.67$ 였고, 대조구의 細胞數가  $49.9 \pm 2.8$ 의 성적을 얻은 결과와 Spindle(1981)이 PEG 용액에서 처리후 融合卵의 細胞數가  $17.3 \pm 0.6$ 였으며, 대조구의 경우  $33.1 \pm 1.5$ 의 세포수를 얻어 신진卵의 경우보다 PEG 또는 Cytochalasin B 처리후 融合卵에서 細胞數가 감소된다는 결과와 일치하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, PEG 처리를 이용한 생쥐 2細胞期 수정란의 分割球융합에는 40%와 45% PEG 농도의 용액에서 60초간 배양하는 것이 가장 바람직하다고 생각된다.

#### IV. 摘 要

PEG 濃度(40%, 45%, 50%)와 노출시간(30초, 60초, 90초 및 120초)에 따라 생쥐 2細胞期 受精卵의 分割球融合에 미치는 영향을 조사하고, 分割球融合卵을 體外에서 일정시간 배양한 후 體外發育率의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. PEG 농도에 따른 分割球의 融合率은 40%, 45% 및 50%, PEG 용액에서 50초, 60초 및 120초동

- 안 노출시킨 경우가 각각 70.8%(63/89), 62.7%(42/67) 및 76.9%(50/65)로서 가장 우수하였다.
2. PEG 용액 처리후 分割球가 융합된 融合卵은 체외배양후 20~24 시간부터 2~4 세포기로 발육되기 시작하여 30~34 시간에 8細胞期, 44~52 시간에 桑實胚 및 60~72 시간에 胚盤胞期로 발육되어 新鮮卵과 차이가 없었다.
  3. 分割球融合卵의 體外發育率은 40% 45% 및 50% PEG 용액에서 60초, 60초 및 120초동안 노출시킨 경우가 각각 66.7%(42/63), 69.0%(29/42) 및 32.0%(16/50)로서 分割球融合率과 동일한 성적을 얻었다.
  4. 分割球融合率을 체외에서 胚盤胞期까지 발육시킨 후 細胞數를 조사한 결과 融合卵의 세포수는  $18.75 \pm 2.59$ 였으며, 新鮮卵은  $48.9 \pm 1.69$ 로서 融合卵의 세포수가 현저히 감소되는 경향을 나타냈다.

## V. 引用文獻

1. Baranov, V.S. 1976. Spontaneous polyploidy in laboratory mice. An embryological and cytological analysis ontogenez. 7: 229-238.
2. Beatty, R.A. and M. Fischberg. 1952. Heteroploidy in mammals. III Induction of tetraploidy in preimpoantation mouse eggs, J. Genet. 50: 471-475.
3. Dyban, A.P. and V.S. Baranov. 1978. Tetraploidy, in "Cytogenetics of mammalian embryonic development". pp.60-67.
4. Eglitis, M.A. 1980. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. J. Exp. Zoo. 213: 309-313.
5. Granham, C.F. 1971. Virnoassceted fusion of embryonic cells. Karolinska Symposium of Research Methods in Reproductive Stockholm. pp. 154-165.
6. Kono, T., S. Iwasaki and T. Nakahara. 1989. Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology. 32: 569-576.
7. Kubiak, J.Z. and A.K. Iarkowski. 1985. Electrofusion of mouse blastomeres Exp. Cell Res. 157: 561-566.
8. Modlinski, J.A. 1978. Transfer of embryonic nuclei to fertilized mouse eggs and development of tetraploid blastocysts, Nature. 273: 466-467.
9. Moustafa, L.A. and J. Hahn. 1978. Experimentelle Erzeugung von identischen, Mäusezwillingen. Dtsch Tieraerztl Wochenschr. 85: 242-244.
10. Mullen, R.J., W.K. Whitten and S.C. Carter. 1970. Studies on chimeric mice and half-embryos. pp. 67-68.
11. Pursel, V.G., R.J. Wall, C.E. Rexroad, R.E. Hammer and R.L. Brinster. 1985. A rapid whole mount procedure for nuclei of mammalian embryos, Theriogenology. 24: 687-691.
12. Snow, M.H.L. 1973. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage, Nature. 244: 513-514.
13. Spindle, A. 1981. Polyethylene glycol-induced fusion of two cell mouse embryo blastomeres. Exp. Cell, Res. 131: 465-470.
14. Tarkowski, A.K., A. Witkowska and J. Opas. 1977. Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos, J. Embryol. Exp. Morph. 41: 47-64.
15. 角田幸生, 若洲政彦, 杉江信. 1984. ホリエチレングリコールによるスウス2細胞期の 割球融合. 日本家畜繁殖誌 30卷: 98-102.
16. 梁富根, 金正翊. 1988. H-Y抗體에 의한 생쥐 初期胚의 性判別에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌 12: 31-36.