

## PCR 기법을 이용한 소 체내외수정란의 성 판별을 위한 할구분리

최은주<sup>1</sup>, 김상환<sup>2</sup>, 이호준<sup>1</sup>, 정경섭<sup>3</sup>, 김창희<sup>3</sup>, 김경래<sup>3</sup>, 김희선<sup>2</sup>, 윤종택<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>(주)한경계농텍, <sup>2</sup>한경대학교 동물생명자원학과, <sup>3</sup>한경대학교 유전공학연구소

본 연구는 소의 체내외 수정란의 성 판별을 위한 할구분리 방법에 따른 수정란의 생존율과 이후 PCR을 이용한 체내외 수정란의 성 판별 후 성비를 알아보고자 실시하였다. 소 수정란의 성 판별은 Y chromosome 특이 DNA primer(BOV 97M, 141bp)와 소 특이적 DNA primer(216bp)를 이용한 PCR법으로 판별하였다. 141과 216bp에서 두 band가 확인되면 양성, 216bp에서 한 band만 확인되면 자성으로 판단하였다. Multiplex PCR법으로 Y chromosome 특이적 DNA primer로 먼저 10cycles을 증폭시키고, 이후 20cycles을 소 특이적 DNA primer를 넣어 추가 증폭시켰다. 할구분리는 체외수정 후 5일째 상실배기 수정란의 투명대에 micromanipulation이 장착된 도립현미경에서 투명대에 slit을 낸 후 다시 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하여 배반포 단계로 진행하면서 빠져나오는 할구를 잘라주었다. bisection의 경우 초기 배반포 이상의 형태적으로 정상인 수정란을 광학현미경 하에서 bio-cut blade(Feather, Japan)를 부착시켜 수정란의 ICM은 피하고 TE의 일부 할구를 분리하였다. 할구 분리 후 demi-embryo는 20% FCS가 함유된 TCM-199 배양액으로 2~3회 세정 후 난구세포로 monolayer가 형성된 TCM-199 drop으로 옮겨 24시간 배양하였다. 온전한 수정란의 생존율은 100%였고, bisected와 sliced embryo의 생존율은 각각 80%와 62.5%로 sliced embryo가 생존율이 높았다. PCR을 이용한 체내외 수정란의 성 판별한 결과 체내 수정란은 양성 11.1%, 자성이 88.9%로 자성의 비율이 높았고, 체외수정란 또한 30개의 수정란을 검사한 결과 25.7%가 양성이고 71.4%가 자성으로 나타났다. 한편, 분리한 할구와 match되는 배반포의 성 감별 후 일치되는 율은 90%였다. 따라서, 체내외수정란의 성 판별을 위한 할구분리 방법으로 투명대에 미리 slit을 준 후 pressing-out법을 사용하거나 배양하여 빠져나오는 부분을 절단해 주는 방법이 성 판별 수정란의 생존율 획기적으로 개선할 수 있는 대안으로 사료된다.

Key words) *PCR, embryo sexing, 할구분리*