

染色體 分析에 의한 생쥐 受精卵의 性鑑別

韓龍萬 · 金鍾培 · 朴弘陽 · 鄭吉生 · 李景廣*

建國大學校 畜産大學

Sexing of Mouse Embryos by Chromosomal Analysis

Han, Y. M., J. B. Kim, H. Y. Park, K. S. Chung and K. K. Lee*

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

Summary

These experiments were carried out to obtain basic information necessary for sexing embryos by chromosomal analysis. To observe metaphase chromosomes, all embryos developed to blastocysts were cultured in Hoppe & Pitts' medium containing 0.001% Colcemid under the gas phase of 5% CO₂ in air at 37°C for 2 hours. The sex chromosome of mouse embryos shown normal development after culture in medium containing H-Y antiserum (10%, v/v) and complement (20%, v/v) also was confirmed by chromosomal analysis.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. Among 89 mouse blastocysts, the number of embryos identified to have XX and XY chromosome was 22(25%) and 25(28%), respectively and 42(47%) embryos were not identified.
2. Of total 40 mouse blastocysts cultured in medium containing H-Y antiserum and complement, 23(58%) embryos which were able to be discriminated their sex chromosomes were identified to be XX bearing embryos.
3. Sex chromosomes of a number of embryos subjected to chromosomal analysis were not identified. This result may be due to absence or poor quality of metaphase spreads.

I. 緒 論

受精卵의 性을 鑑別, 必要로 하는 性을 가진 受精卵만을 선택하여 移植할 수 있게 된다면 家畜의 増殖은 현저하게 촉진되고, 畜産經營도 크게 改善될 것이다.

受精卵의 性을 鑑別하려는 研究는 1956年, Glenister에 의하여 처음으로 시도되었다. 즉, 그는 초기 단계의 human embryo를 供試하여 性染色體를 分析함으로써 그 胚의 性을 鑑別하려는 研究를 실시하였다. 그 후 Gardner Edwards(1968)는 토끼의 胚盤胞를 供試, 性染色體를 分析한 다음 그것들을

移植하여 태어난 胎兒의 性을 조사한 결과 염색체 分析결과와 産仔의 性이 일치한다는 사실을 확인한 바 있다. 유사한 研究는 그 후에도 계속되어 Hare 등(1976)은 供試한 牛受精卵의 58.5%에서 染色體 分析에 의한 性鑑別에 성공하였으며 鑑別된 受精卵을 移植하여 37.5%의 임신율을 얻었고, Mitchell (1975)은 holstein受精卵의 性을 鑑別한 후 그것을 移植하여 최초의 송아지를 생산하는데 성공하였다. 최근 Singh과 Hare(1980)는 牛의 桑實胚를 Rottmann(1981)은 토끼의 桑實胚를 供試하여 각각 33%와 14%에서 性을 鑑別하는데 성공함으로써 桑實胚 단계에서도 性을 鑑別할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 생쥐의 受精卵에 관해서도 性染色體를 鑑別

* 韓國科學技術院 遺傳工學센터 (Genetic Engineering Research Center, KAIST)

하려는 연구가 활발하게 진행되어 왔지만(Burkholder & Comings, 1972; Epstein, et al., 1978; Singh & Hare, 1980; Rastan, 1982), 鑑別이 끝난 受精卵을 移植하여 産仔를 얻었다는 보고는 아직 없다. Epstein 등(1980)은 H-Y 抗體의 처리를 받은 후 정상적인 발달을 보인 60個의 생쥐 胚盤胞를 供試하여 그 중 20個에서 性染色體를 分析하는데 성공하였는데, 그것들은 모두 XX型 性染色體를 가지고 있었다고 보고하였다. 그러나 국내의 경우 受精卵의 性染色體를 分析하여 그 性을 鑑別하였다는 보고는 아직 없는 실정이다. 이에 본 研究에서는 家畜 受精卵의 性을 鑑別하기 위한 基礎試驗으로서 생쥐 胚盤胞를 使用하여 性染色體를 分析하는 方法을 개발하려고 試圖하여 약간의 성적을 얻었기에 그 결과를 보고한다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

ICR 系統의 생쥐를 供試하였으며 이들의 연령은 4~8週, 體重은 18~24g이었다.

2. 多排卵 誘起와 受精卵의 回收

多排卵 誘起를 위하여 오후 4시에 5 IU의 PMSC를 1회 복강에 주사하였으며, 44~48시간 후에 동일한 方法으로 5 IU의 HCG를 주사하였다. 授精을 위하여 HCG 주사 후 9~11시간에 1:1의 비율로 雄性 생쥐를 ผสม시켰다. 이어 翌日 아침에 腔控의 有無를 확인하여 腔控이 없는 개체는 採卵에서 除外시켰다.

교미 후 3.5~4.5일째에 생쥐를 屠殺, 外科的인 方法으로 子宮을 관류하여 胚盤胞를 回收하였다.

3. 培養液과 受精卵의 培養

受精卵의 培養에는 0.001% Colcemid를 첨가한 Hoppe & Pitts(1973) 培養液을 供試하였다. 이 培養液의 pH는 7.2~7.4로, 參透壓은 300~310 mosmol로 조정하였으며, 사용직전에 millipore filter (pore size; 0.2 μm)를 사용하여 여과시킴으로써 細菌을 除去하였다. 이 培養液을 37°C, 5% CO₂條件下의 培養器에 넣어 2시간 동안 平衡을 실시하였다. 回收된 胚盤胞를 이 培養液에 넣어 同一한 條件에서 다시 2시간 동안 培養하였다.

4. 低張液 처리와 固定

上記 培養液에서 培養이 끝난 胚盤胞를 0.075M의 KCl低張液에 옮겨 상온에서 10분간 방치함으로써 低張液 處理를 실시하였다. 處理 후 胚盤胞를 Slide glass에 하나씩 놓고 固定液(methanol: acetic acid=3:1) 4~5滴을 떨어뜨려 固定시켰다. 제 1차로 滴下한 固定液이 완전히 증발되기 전에 재차 한 방울의 同一固定液을 추가로 滴下한 다음 공기중에서 건조시켰다.

5. Giemsa染色

완전히 건조된 標本을 10%의 Giemsa染色液에 沈漬, 10분간 染色한 다음 증류수로 洗滌하고 공기중에서 건조시켰다. Giemsa染色液은 증류수 50ml에 0.2M의 Na₂HPO₄ 1.5ml를 섞어 pH를 8.5로 조정한 다음 純粹 methanol 1.5ml와 5ml의 Giemsa's stain(Gurr's R66, England)을 첨가하여 제조하였다.

染色이 끝난 標本은 位相差顯微鏡(Ebnst Leitz Co., West Germany)하에서 40, 400 및 1,000倍 順으로 관찰하면서 性染色體를 分析하였다.

6. 染色體型的 製作

생쥐의 染色體型은 Levan 등(1962)과 Schnedl(1971)의 方法에 準하여 製作하였다. 染色體의 배열은 크기에 따라 가장 긴 染色體의 쌍을 No. 1로 하고 가장 짧은 染色體의 쌍을 No. 19로 하였다. XX 染色體로서는 No. 3에 해당하는 쌍을 선택하였고 XY 染色體로서는 5번째에 해당하는 긴 染色體를 X 染色體로 판단하였다.

7. H-Y抗體의 處理와 性鑑別

BSA(Bovine Serum Albumin)가 들어있지 않은 Hoppe & Pitts 培養液에 H-Y 抗血清(10%, v/v)과 補體(20%, v/v)를 혼합한 培養液 50 μl의 小滴을 組織培養用 petri dish에 滴下시킨 다음 液狀 paraffin으로 덮고, 5% CO₂, 37°C의 배양조건하에서 4시간 이상 平衡시켰다. 이어 8~16細胞期의 생쥐 受精卵을 培養液內에 넣어 24~48시간 동안 培養하면서 受精卵의 발달상태를 현미경하에서 관찰하였다. 이어 정상적으로 발달한 胚盤胞만을 골라 그것들의 性染色體를 分析하였다. 이때 性染色體를 分析하는 方法은 상술한 것과 동일한 方法이었다. 또 이때 供試한 H-Y 抗體는 鄭吉生 등(1985)

의 방법에 準하여 만들었으며, 補體로서는 guinea pig serum을 사용하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

本 試驗에서 얻어진 結果를 要約하여 考察하면 다음과 같다.

1. 생쥐 胚盤胞의 染色體型

생쥐 受精卵의 染色體型은 Fig. 1에 제시한 바와 같았다. Fig. 1에 제시된 생쥐 受精卵의 染色體型은 총 40個의 染色體로 구성되어 있는데 그것들은 19쌍의 常染色體와 XX型 性染色體로 되어있다.

染色體의 배열은 Levan 등 (1962)과 Schnedl (1971)의 방법에 準하여 크기에 따라 가장 긴 染色體 쌍을 No. 1로 선택하였고 가장 짧은 染色體 쌍을 No. 19로 구분하였으며 常染色體보다 길게 染色된 것을 性染色體로 判定하였다.

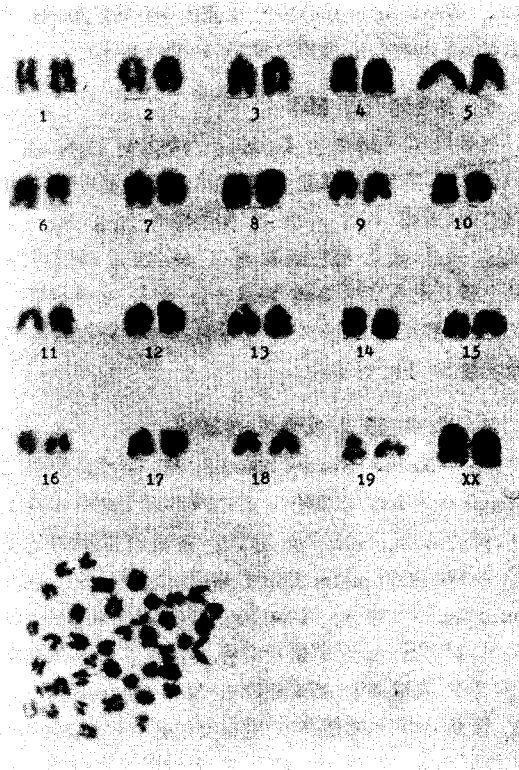


Fig. 1. The karyotype from a mouse blastocyst (XX type)

2. 受精卵의 性鑑別

Fig. 2와 3에 표시된 화살표는 각각 생쥐 胚盤胞의 性染色體인 X染色體와 Y染色體를 보여주고 있다.

牛受精卵에 있어서의 性染色體는 submetacentric이기 때문에 쉽게 鑑別할 수 있으나 (Hare, et al., 1976; Wintenberger-Torres & Popescu, 1980; Singh & Hare, 1980), 생쥐의 常染色體와 性染色體는 모두 acrocentric이기 때문에 性染色體를 分析하는 것은 容易한 일이 아니다 (Levan, et al., 1962; Takag: & Oshimura, 1973).

Park (1957)는 생쥐에 있어서의 性染色體는 후기 胚盤胞期에 가서야 出現한다고 報告하였다. 哺乳動物에서 관찰되는 2개의 X染色體중 하나는 胚盤胞期 후기, 즉 着床期에 이르러 複製되며 遺傳的으로 非活性的인 것으로 推定되고 있다 (Melander, 1962; Hill & Yunis, 1967; Epstein, 1972; Epstein, et al., 1978; Monk & Harper, 1979; Rastan, 1982). 이러한 보고에 따라 性染色體의 判定기준에 관해서는 여러가지 이론이 있으나 本 試驗에서는 Giemsa 染色을 실시하여 짙게 染色되는 染色體를 性染色體로 하였다 (Fig. 2와 3). Takagi (1974)는 일반적으로 Giemsa 染色에서 짙게 染色되는 性染色體가 Quinacrine Mustard 染色에서는 밝게 螢光된다고 보고 하였다. 그러나 本 試驗에서는 Quinacrine Mustard 染色을 실시하지 않았다.

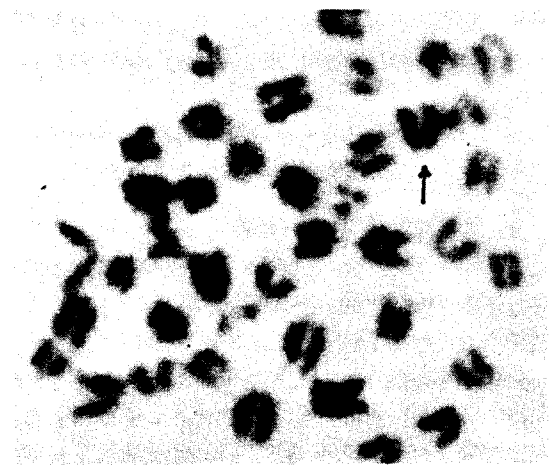


Fig. 2. X chromosome from a mouse blastocyst (arrow)

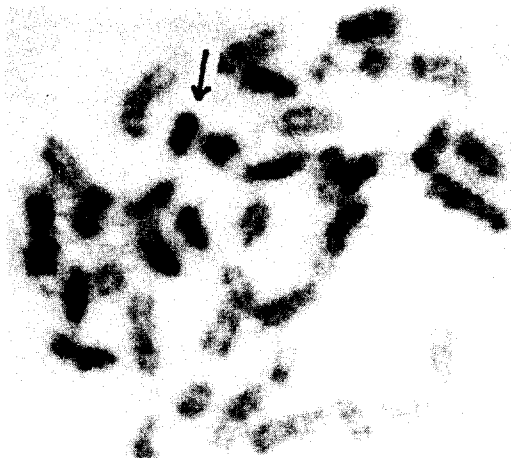


Fig 3 . Y chromosome from a mouse blastocyst (arrow).

한편 前處理를 받지 않은 생쥐 受精卵의 性染色體를 分析한 결과한 결과는 Table 1에서 보는바와 같았다. 供試된 89個의 受精卵중에서 XX형 性染色體와 XY형 性染色體를 含有하고 있는 胚盤胞의 數는 각각 22個와 25個로서 雌性和 雄性的 比率는 각각 47%와 53%였다. 이러한 결과는 供試한 受精卵中 雌雄의 性比가 각각 49.2%대 50.8%라고 한 Foote(1977)의 보고와 48%대 52%라고한 Watchel(1984)의 성적과 대체로 일치하는 것이었다.

그러나 나머지 42個는 性染色體의 識別이 不可能하였는데 그것은 供試受精卵의 발달단계가 meta-phase의 不在나 不完全한 시기였기 때문인 것으로 생각된다.

Table 1. Distribution of XX-chromosome in mouse blastocysts

Exp. No.	No. of embryos	Distribution		
		X X	X Y	Unidentified
1	15	4	4	7
2	17	5	6	6
3	19	4	5	10
4	17	4	5	8
5	21	5	5	11
Total	89	22 (25%)	25 (28%)	42 (47%)

3. H-Y抗體 處理를 받은 胚盤胞의 性染色體 分析

Table 2는 H-Y抗體의 處理를 받은 8~16細胞期의 受精卵中 胚盤胞까지 정상적으로 발달한 것만을 골라 그것들의 性染色體를 分析한 결과이다.

H-Y抗血清과 補體에 의한 처리를 받은 다음에도 胚盤胞段階에까지 정상적으로 발달을 보인 40個의 胚盤胞중에서 性染色體의 分析이 가능했던 것은 23個였으며 그것들은 모두가 XX型 染色體를 가진 것으로 판명되었다. 이러한 결과는 H-Y抗體를 처리하여 정상적인 발달을 보인 수정란의 性染色體 分析을 실시한 여러 연구자들(Epstein, et al., 1980; Watch, 1984)의 결과와 일치하는 것이었다.

이 경우에도 性染色體 分析에 供試된 40個의 受精卵中 42%에 해당하는 17個의 受精卵에서 性染色體의 分析이 不可能하였으며 그 原因은 역시 meta-phase의 不在나 不完全(Hare, et al., 1976; Wintemberger-Torres & Popescu, 1980; Rottmann, 1981)에 기인하는 것으로 생각되었다.

IV. 摘 要

本 試驗은 染色體를 分析하여 受精卵의 性을 鑑別하는데에 필요한 基礎知識을 얻기 위하여 실시하였다. Metaphase의 染色體를 관찰하기 위하여 何等의 처리를 받지 않은 89個의 胚盤胞와 H-Y抗血

Table 2. Sex chromosomes of mouse blastocysts shown normal development after culture in H-Y antiserum and complement.

Exp. No.	No. of embryos developed after culture in H-Y antiserum and complement	Distribution of sex chromosome		
		XX	XY	Unidentified
1	11	6	0	5
2	9	7	0	2
3	5	2	0	3
4	9	4	0	5
5	6	4	0	2
Total	40	23	0	17 (42%)
		(58%)		

清 및 補體處理를 받고 정상적으로 발달한 40개의 胚盤胞를 5% CO₂, 37°C의 培養條件下에서 0.001% Colcemid를 함유한 Hoppe & Pitts 培養液으로 培養한 다음 Giemsa 染色法에 의하여 染色體를 分析하였다.

本 試驗에 의하여 얻어진 결과를 要約하면 다음과 같았다.

1. 性染色體 分析에 供試된 89개의 생쥐 胚盤胞 중 XX형 性染色體와 XY형 性染色體를 가지고 있는 胚盤胞의 數는 각각 22個 (25%)와 25個 (28%)였으며 나머지 42個 (47%)는 性染色體의 識別이 不可能하였다.

2. H-Y 抗體 처리를 받은 후 정상적인 발달을 보인 40개의 생쥐 胚盤胞 중, 23個 (58%)에 있어서 性染色體의 識別이 可能하였는데 그것들은 다같이 XX형 性染色體를 가진 것으로 판명되었다.

3. 상당수의 胚盤胞에서 性染色體의 識別이 不可能하였는데, 그것은 供試胚의 발달단계가 metaphase의 不在나 不完全한 시기에 있었기 때문인 것으로 판단되었다.

REFERENCES

- Burkholder, G.D. and D.E. Comings. 1972. Do the Giemsa banding patterns of chromosomes change during embryonic development? *Exp. Cell Res.*, 75:268-271.
- Edwards, R.G. and R.L. Gardner. 1967. Sexing of live rabbit blastocysts. *Nature*, 214:576-577.
- Epstein, C.J. 1972. Expression of the mammalian X-chromosome before and after fertilization. *Science*, 175:1467-1468.
- Epstein, C.J., S. Smith and B. Travis. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigens*, 15: 63-67.
- Epstein, C.J., S. Smith, B. Travis and G. Tucker. 1978. Both X-chromosome inactivation in female mouse embryos. *Nature*, 274:500-502.
- Foot, R.H. 1977. Sex ratios in dairy cattle under various conditions. *Theriogenology*, 8:349-355.
- Gardner, R.L. and R.G. Edwards. 1968. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature*, 218:345-348.
- Glenister, T.W. 1956. Determination of sex in early human embryos. *Nature (Lond.)*, 177:1135-1136.
- Hare, W.C.D., D. Mitchell, K.J. Betteridge, M.D. Eaglesome and G.C.B. Randall. 1976. Sexing two-week old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical

- transfer Preliminary methods and results. *Theriogenology*, 5:243-253.
10. Hill, R.N. and J.J. Yunis. 1967. Mammalian X-chromosomes: Change in patterns of DNA replication during embryogenesis. *Science*, 155:1120-1121.
 11. Levan, A., T.C. HSU and H.F. Stich. 1962. The idiogram of the mouse. *Hereditas*, 48: 677-687.
 12. Melander, Y. 1967. Chromosomal behaviour during the origin of sex chromatin in the rabbit. *Hereditas*, 48:645-661.
 13. Mitchell, D. 1975. Sexing of embryos. Embryos transfer in the farm animals. pp. 26-27.
 14. Monk, M. and M.I. Harper. 1979. Sequential X-chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. *Nature*, 281:311-313.
 15. Park, W.W. 1957. The occurrence of sex chromatin in early human and macaque embryos. *J. Anat.*, 91:369-373.
 16. Rastan, S. 1982. Timing of X-chromosome inactivation in post-implantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 71:11-24.
 17. Rottmann, O.J. 1981. Chromosome preparation from single blastomeres after colcemid treatment and removal from rabbit morulae- Unsuitable for sexing in routine embryo transfer. *Theriogenology*, 15:321-326.
 18. Schnedl, W. 1971. The karyotype of the mouse. *Chromosoma*, 35:111-116.
 19. Singh, E.L. and W.C.D. Hare. 1970. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. *Theriogenology*, 14:421-427.
 20. Takagi, N. and M. Oshimura. 1973. Fluorescence and Giemsa banding studies of the allocyclic X-chromosome in embryonic and adult mouse cells. *Exp. Cell Res.*, 78:127-135.
 21. Watchel, S.S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*, 21:18-28.
 22. Wintenberger-Torres, S. and P.C. Popescu. 1980. Transfer of cow blastocysts after sexing. *Theriogenology*, 14:309-318.
 23. 鄭吉生·朴世必·崔炳相. 1985. H-Y抗體處理를 받은 생쥐 胚의 試驗管内 發達. 建大附設畜産經營研究所 論文集 10 : 37 - 46.